



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I677507 B

(45)公告日：中華民國 108 (2019) 年 11 月 21 日

(21)申請案號：102122318

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 06 月 21 日

(51)Int. Cl. : **C07K16/46 (2006.01)** **A61K39/395 (2006.01)**
A61P11/06 (2006.01) **A61P37/00 (2006.01)**

(30)優先權：2012/06/22 美國 61/663,431
 2012/06/25 美國 61/663,969
 2012/12/11 美國 61/735,799
 2013/03/11 美國 61/776,234
 2013/04/01 美國 61/807,135

(71)申請人：達特茅斯學院基金會(美國) TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE (US)

美國

英國倫敦國王學院(英國) KING'S COLLEGE LONDON (GB)

英國

(72)發明人：諾伊里 藍道夫 J NOELLE, RANDOLF J. (US)；席瑞茲 薩布里納 CEERAZ,
 SABRINA (US)；拉莫契爾 伊沙貝爾 LEMERCIER, ISABELLE (US)；諾渥克
 伊莉沙白 NOWAK, ELIZABETH (US)；萊恩斯 珍尼特(露易斯) LINES, JANET
 (LOUISE) (GB)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

US 2004/0259209A1 US 2011/0223188A1
 US 2011/0243942A1 WO 2011/120013A2
 Wang L et al, "VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that
 negatively regulates T cell responses.", J Exp Med. 2011 Mar 14;208
 (3):577-92.

審查人員：林奕萍

申請專利範圍項數：12 項 圖式數：63 共 359 頁

(54)名稱

新穎之 V I S T A - I G 構築體及 V I S T A - I G 用於治療自體免疫、過敏及發炎病症之用途

(57)摘要

本發明係關於一種融合蛋白質，其包含調節性 T 細胞蛋白質 VISTA(T 細胞活化之 V 域免疫球蛋白抑制因子(PD-L3))及免疫球蛋白蛋白質(Ig)，較佳亦含有介於 VISTA 與 Ig Fc 多肽之間的柔性連接子。本發明亦提供 VISTA 多肽、多聚 VISTA 多肽、VISTA 結合物(例如 VISTA-Ig)及 VISTA 拮抗劑之用途，其用於治療自體免疫疾病、過敏及發炎病狀，尤其狼瘡、多發性硬化症、牛皮癬、牛皮癬性關節炎、多發性硬化症、克羅恩氏病、發炎性腸病及 1 型或 2 型糖尿病。

The present invention relates to a fusion proteins comprising regulatory T cell protein, VISTA (V-domain Immunoglobulin Suppressor of T cell Activation (PD-L3) and an immunoglobulin protein (Ig), preferably also containing a flexible linker intervening the VISTA and Ig Fc polypeptide. The invention also provides the use of VISTA polypeptides, multimeric VISTA polypeptides, VISTA-conjugates (e.g., VISTA-

Ig), and VISTA antagonists for the treatment of autoimmune disease, allergy, and inflammatory conditions, especially lupus, multiple sclerosis, psoriasis, psoriatic arthritis, multiple sclerosis, Crohn’s disease, inflammatory bowel disease and type 1 or type 2 diabetes.

指定代表圖：

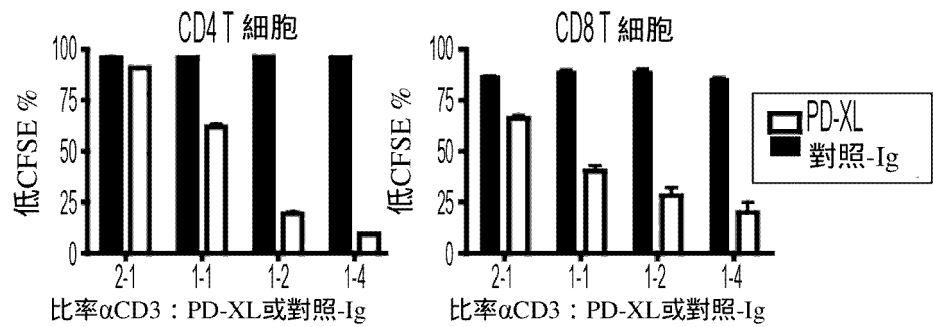


圖9B

I677507

發明摘要

※ 申請案號：

※ 申請日：

※IPC 分類：C07K

【發明名稱】

新穎之VISTA-IG構築體及VISTA-IG用於治療自體免疫、過敏及發炎病症之用途

NOVEL VISTA-IG CONSTRUCTS AND THE USE OF VISTA-IG
FOR TREATMENT OF AUTOIMMUNE, ALLERGIC AND
INFLAMMATORY DISORDERS

【中文】

本發明係關於一種融合蛋白質，其包含調節性T細胞蛋白質VISTA(T細胞活化之V域免疫球蛋白抑制因子(PD-L3))及免疫球蛋白蛋白質(Ig)，較佳亦含有介於VISTA與Ig Fc多肽之間的柔性連接子。本發明亦提供VISTA多肽、多聚VISTA多肽、VISTA結合物(例如VISTA-Ig)及VISTA拮抗劑之用途，其用於治療自體免疫疾病、過敏及發炎病狀，尤其狼瘡、多發性硬化症、牛皮癬、牛皮癬性關節炎、多發性硬化症、克羅恩氏病、發炎性腸病及1型或2型糖尿病。

【英文】

The present invention relates to a fusion proteins comprising regulatory T cell protein, VISTA (V-domain Immunoglobulin Suppressor of T cell Activation (PD-L3) and an immunoglobulin protein (Ig), preferably also containing a flexible linker intervening the VISTA and Ig Fc polypeptide. The invention also provides the use of VISTA polypeptides, multimeric VISTA polypeptides, VISTA-conjugates (e.g., VISTA-Ig), and VISTA antagonists for the treatment of autoimmune disease, allergy, and inflammatory conditions, especially lupus, multiple sclerosis, psoriasis, psoriatic arthritis, multiple sclerosis, Crohn's disease, inflammatory bowel disease and type 1 or type 2 diabetes.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（9B）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

（無）

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

（無）



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

新穎之 VISTA-IG 構築體及 VISTA-IG 用於治療自體免疫、過敏及發炎病症之用途

NOVEL VISTA-IG CONSTRUCTS AND THE USE OF VISTA-IG
FOR TREATMENT OF AUTOIMMUNE, ALLERGIC AND
INFLAMMATORY DISORDERS

相關申請案

本申請案主張以下之優先權：2012年6月22日申請之名為「VISTA-Ig for Treatment of Autoimmune and Inflammatory Disorders」之美國臨時申請案第61/663,431號；2012年6月25日申請之名為「VISTA-Ig for Treatment of Autoimmune and Inflammatory Disorders」之美國臨時申請案第61/663,969號；2012年12月11日申請之名為「VISTA-Ig for Treatment of Autoimmune and Inflammatory Disorders」之美國臨時申請案第61/735,799號；2013年3月11日申請之名為「VISTA-Ig for Treatment of Autoimmune and Inflammatory Disorders」之美國臨時申請案第61/776,234號；及2013年4月1日申請之亦名為「VISTA-Ig for Treatment of Autoimmune and Inflammatory Disorders」之美國臨時申請案第61/807,135號，所有該等臨時申請案之內容以其全文引用之方式併入。

【技術領域】

VISTA[T細胞活化之含有V區免疫球蛋白之抑制因子(VISTA)或PD-L3]為一種負向調節免疫性之分子。本發明係關於VISTA之可溶形式(例如VISTA-Ig)、包括VISTA-Ig之最佳化形式、包括具有增強之效

力之包含連接多肽之多聚型式的用途，其可以全身方式投與以用於治療及/或預防有需要之個體之自體免疫、過敏及發炎病狀。例示性病狀包括多發性硬化症；類風濕性關節炎；牛皮癬性關節炎；狼瘡病症，諸如全身性紅斑性狼瘡(SLE)、盤狀狼瘡、藥物誘導之狼瘡及新生兒狼瘡；及過敏或發炎呼吸病症，諸如哮喘、過敏性鼻炎、枯草熱、蕁麻疹、血管炎及徹奇-斯全司症候群(Churg-Strauss syndrome)以及諸如下文所揭示之其他過敏、發炎及自體免疫病狀。

【先前技術】

免疫系統係由協同刺激性及協同抑制性配位體及受體嚴密控制的。此等分子不僅提供用於T細胞活化之第二信號，而且提供正向及負向信號之平衡網路，從而使針對感染之免疫反應最大化，同時限制對自身之免疫性。

免疫反應之誘導需要T細胞擴增、分化、刪減及T細胞記憶之建立。T細胞必須遇到抗原呈現細胞(APC)且經由APC上之T細胞受體(TCR)/主要組織相容性複合體(MHC)相互作用來通信。一旦建立TCR/MHC相互作用，即需要T細胞與APC之間的其他受體-配位體組接觸，亦即經由CD154/CD40及CD28/B7.1-B7.2協同刺激。此等接觸之間的協同作用引起富有成效的免疫反應能夠清除病原體及腫瘤，且可能能夠誘導自體免疫。

另一控制層面已經鑑別，亦即調節性T細胞(T_{reg})。T細胞之此特定子集產生於胸腺中，傳遞至周邊，且能夠持續且可誘導的控制T細胞反應。Sakaguchi (2000) *Cell* 101(5):455-8；Shevach (2000) **Annu. Rev. Immunol.** 18:423-49；Bluestone 及 Abbas (2003) **Nat. Rev. Immunol.** 3(3):253-7。 T_{reg} 由CD4+CD25+表型代表，且亦表現較高含量之細胞毒性T淋巴細胞相關抗原-4(CTLA-4)、OX-40、4-1BB及糖皮質激素誘導性TNF受體相關蛋白質(GITR)。McHugh等人 (2002)

Immunity 16(2):311-23 ; Shimizu等人 (2002) **Nat. Immun.** 3(2):135-42。藉由5天新生兒胸腺切除術或使用抗CD25之抗體剔除來消除T_{reg}細胞引起自體免疫病理之誘導及T細胞對外來及自身抗原之反應的加劇(包括增高之抗腫瘤反應)。Sakaguchi等人 (1985) **J. Exp. Med.** 161(1):72-87 ; Sakaguchi等人 (1995) **J. Immunol.** 155(3):1151-64 ; Jones等人 (2002) **Cancer Immun.** 2:1。另外，T_{reg}亦與移植耐受性之誘導及維持有關，因為使用抗CD25單株抗體剔除T_{reg}引起移植耐受性之消除及快速移植物排斥。Jarvinen等人 (2003) **Transplantation** 76:1375-9。在由T_{reg}表現之受體中，GITR似乎為重要組分，因為用促效性單株抗體將GITR接合在T_{reg}表面上引起T_{reg}活性之快速終止，引起自體免疫病理及移植耐受性之消除。

協同刺激性及協同抑制性配位體及受體不僅提供用於T細胞活化之「第二信號」，而且提供正向及負向信號之平衡網路，從而使針對感染之免疫反應最大化，同時限制對自身之免疫性。經最佳表徵之協同刺激性配位體為B7.1及B7.2，其由專職性APC表現，且其受體為CD28及CTLA-4。Greenwald等人 (2005) **Annu Rev Immunol** 23, 515-548 ; Sharpe及Freeman (2002) **Nat Rev Immunol** 2, 116-126。CD28由原態及活化T細胞表現，且為最佳T細胞活化之關鍵。相比之下，CTLA-4在T細胞活化時經誘導，且藉由結合至B7.1/B7.2而抑制T細胞活化，由此削弱CD28介導之協同刺激。CTLA-4亦經由其細胞質ITIM基元轉導負向信號傳導。Teft等人 (2006). **Annu Rev Immunol** 24, 65-97。B7.1/B7.2 KO小鼠之應變性免疫反應受損(Borriello等人 (1997) **Immunity** 6, 303-313 ; Freeman等人 (1993) **Science** 262, 907-909)，而CTLA-4 KO小鼠無法充分地控制發炎且發生全身性自體免疫疾病。Chambers等人 (1997) **Immunity** 7, 885-895 ; Tivol等人 (1995) **Immunity** 3, 541-547 ; Waterhouse等人 (1995) **Science** 270, 985-

988。B7家族配位體已擴大至包括協同刺激性B7-H2(ICOS配位體)及B7-H3以及協同抑制性B7-H1(PD-L1)、B7-DC(PD-L2)、B7-H4(B7S1或B7x)及B7-H6。參見Brandt等人 (2009) **J Exp Med** 206, 1495-1503；Greenwald等人 (2005) **Annu Rev Immunol** 23: 515-548。

誘導性協同刺激性(ICOS)分子表現在活化T細胞上且結合至B7-H2。參見Yoshinaga等人 (1999) **Nature** 402, 827-832。ICOS對於T細胞活化、分化及功能很重要，以及對輔助T細胞誘導之B細胞活化、Ig類別轉換及生發中心(GC)形成為必需的。Dong等人 (2001) **Nature** 409, 97-101；Tafuri等人 (2001) **Nature** 409, 105-109；Yoshinaga等人 (1999) **Nature** 402, 827-832。另一方面，計畫式死亡1(PD-1)負向調節T細胞反應。PD-1 KO小鼠視遺傳背景而定，發生狼瘡樣自體免疫疾病或自體免疫性擴張型心肌病。Nishimura等人 (1999) **Immunity** 11, 141-151。Nishimura等人 (2001) **Science** 291: 319-322。自體免疫很可能由利用配位體PD-L1及PD-L2兩者之信號傳導損失引起。近來，CD80已鑑別為將抑制性信號轉導至T細胞中之PD-L1之第二受體。Butte等人 (2007) **Immunity** 27: 111-122。B7-H3及B7-H4之受體仍為未知的。

經最佳表徵之協同刺激性配位體為B7.1及B7.2，其屬於Ig超家族且表現在專職性APC上，且其受體為CD28及CTLA-4。Greenwald等人 (2005) **Annu Rev. Immunol.** 23: 515-548。CD28由原態及活化T細胞表現且為最佳T細胞活化之關鍵。相比之下，CTLA-4在T細胞活化時經誘導，且藉由結合至B7.1/B7.2而抑制T細胞活化，削弱CD28介導之協同刺激。B7.1/B7.2 KO小鼠之應變性免疫反應受損(Borriello等人 (1997) **Immunity** 6, 303-313)，而CTLA-4 KO小鼠無法充分地控制發炎且發生全身性自體免疫疾病。Tivol等人 (1995) **Immunity** 3: 541-547；Waterhouse等人 (1995) **Science** 270: 985-988；Chambers等人

(1997) **Immunity** 7: 885-895。

B7家族配位體已擴大至包括協同刺激性B7-H2(誘導性T細胞協同刺激因子[ICOS]配位體)及B7-H3以及協同抑制性B7-H1(PD-L1)、B7-DC(PD-L2)、B7-H4(B7S1或B7x)及B7-H6。Greenwald等人 (2005) **Annu Rev. Immunol.** 23: 515-548；Brandt等人 (2009) **J. Exp. Med.** 206: 1495-1503。因此，已鑑別其他CD28家族受體。ICOS表現在活化T細胞上且結合至B7-H2。ICOS為正向協同調節因子，其對T細胞活化、分化及功能很重要。Yoshinaga等人 (1999) **Nature** 402: 827-832；Dong等人 (2001) **J. Mol. Med.** 81: 281-287。相比之下，PD-1(計畫式死亡1)負向調節T細胞反應。PD-1 KO小鼠發生狼瘡樣自體免疫疾病或自體免疫性擴張型心肌病。Nishimura等人 (1999) **Immunity** 11: 141-151；Nishimura等人 (2001) **Science** 291: 319-322。自體免疫很可能由利用配位體PD-L1及PD-L2兩者之信號傳導損失引起。近來，CD80已鑑別為將抑制性信號轉導至T細胞中之PD-L1之第二受體。Butte等人 (2007) **Immunity** 27: 111-122。

兩種抑制性B7家族配位體PD-L1及PD-L2具有獨特的表現模式。PD-L2以誘導方式表現在DC及巨噬細胞上，而PD-L1廣泛表現在造血細胞及非造血細胞兩種類型上。Okazaki及Honjo (2006) **Trends Immunol.** 27(4): 195-201；Keir等人 (2008) **Ann Rev Immunol.** 26: 677-704。與PD-1受體之免疫抑制性作用一致，使用PD-L1^{-/-}及PD-L2^{-/-}小鼠之研究已顯示兩種配位體在抑制T細胞增殖及細胞激素產生方面具有重疊作用。Keir等人 (2006) **J Immunol.** 175(11): 7372-9。PD-L1缺乏在自體免疫糖尿病之非肥胖糖尿病模型及多發性硬化症之小鼠模型(實驗性自體免疫性腦脊髓炎[EAE])兩者中增強疾病進展。Ansari等人 (2003) **J. Exp. Med.** 198: 63-69；Salama等人 (2003) **J. Exp. Med.** 198: 71-78；Latchman等人 (2004) **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 101:

10691-10696。PD-L1^{-/-} T細胞在兩種疾病模型中產生較高含量之促炎性細胞激素。另外，BM嵌合體實驗已展示PD-L1之組織表現(亦即在胰臟內)獨特地有助於其區域性控制發炎之能力。Keir等人 (2006) **J. Exp. Med.** 203: 883-895；Keir等人 (2007) **J. Immunol.** 179: 5064-5070；Grabie等人 (2007) **Circulation** 116: 2062-2071。PD-L1亦在胎盤融合細胞滋養層上高度表現，其決定性地控制母體對同種異體胎兒之免疫反應。Guleria等人 (2005) **J. Exp. Med.** 202: 231-237。

與其免疫抑制性作用一致，PD-L1有力地抑制抗腫瘤免疫反應且幫助腫瘤避開免疫監視。PD-L1可誘導浸潤性細胞毒性CD8⁺ T細胞之細胞凋亡，該等CD8⁺ T細胞表現較高含量之PD-1。Dong等人 (2002) **Nat. Med.** 8: 793-800；Dong及Chen (2003) **J. Mol. Med.** 81: 281-287。阻斷PD-L1-PD-1信號傳導路徑結合其他免疫療法可藉由增強抗腫瘤CTL活性及細胞激素產生而預防腫瘤進展。Iwai等人 (2002) **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 99: 12293-12297；Blank等人 (2004) **Cancer Res.** 64: 1140-1145；Blank等人 (2005) **Cancer Immunol. Immunother.** 54: 307-314；Geng等人 (2006) **Int. J. Cancer** 118: 2657-2664。DC上之PD-L1表現促進應變性Foxp3⁺CD4⁺調節性T細胞(T_{reg}細胞)之誘導，且PD-L1為腫瘤微環境內T_{reg}細胞之強力誘導因子。Wang等人 (2008) **Proc Natl. Acad. Sci. USA** 105: 9331-9336。在靶向B7家族調節性分子方面之近期進展展示在治療免疫相關疾病(諸如自體免疫及癌症)方面的希望。Keir等人 (2008) **Annu. Rev. Immunol.** 26: 677-704；Zou及Chen (2008) **Nat. Rev. Immunol.** 8: 467-477。

自體免疫疾病

自體免疫病症為一種在免疫系統錯誤地攻擊及破壞健康身體組織時出現之病狀。存在超過80種不同類型之自體免疫病症。通常，免

疫系統之白血球幫助保護身體免受稱為抗原之有害物質影響。抗原之實例包括細菌、病毒、毒素、癌細胞及來自另一人或物種之血液或組織。免疫系統產生抗體，其破壞此等有害物質。然而，在患有自體免疫病症之患者體內，免疫系統不能區分自身與非自身(例如健康組織與外來抗原)。結果為免疫反應破壞正常身體組織。此反應為類似於過敏性病狀中之反應的過敏反應。在過敏中，免疫系統對其在正常情況下將忽略之外部物質起反應。在自體免疫病症情況下，免疫系統對其在正常情況下將忽略之正常身體組織起反應，其原因尚未知。

自體免疫病症可引起一或多種類型之身體組織之破壞、器官之異常生長及器官功能之改變，且可影響一或多種器官或組織類型。通常受自體免疫病症影響之器官及組織包括血管、結締組織、內分泌腺(例如甲狀腺或胰腺)、關節、肌肉、紅血球及皮膚。人可能同時患有一種以上自體免疫病症。

自體免疫疾病之症狀基於疾病及異常免疫反應之位置而不同。自體免疫疾病常出現之共同症狀包括疲勞、發熱及一般生病感覺(不適)。可用以診斷自體免疫病症之測試可包括：抗核抗體測試、自體抗體測試、CBC、C-反應蛋白(CRP)及紅血球沈降速率(ESR)。

常開立藥物處方來控制或減輕免疫系統反應。其常被稱為免疫抑制藥物。該等藥物可包括皮質類固醇(諸如強的松(prednisone))及非類固醇藥物，諸如硫唑嘌呤、環磷醯胺、黴酚酸酯、西羅莫司(sirolimus)或他克莫司(tacrolimus)。

併發症為常見的且視疾病而定。用於抑制免疫系統之藥物的副作用可能為重度的，諸如可能難以控制之感染。「Autoimmune disorders」。MedlinePlus-美國國家醫學圖書館(U.S. National Library of Medicine)(2012年4月19日)。

發炎病狀

發炎為血管組織對有害刺激物(諸如病原體、受損細胞或刺激物)之複雜生物反應之一部分。發炎為生物體試圖移除有害刺激物及引發癒合過程之保護性反應。在無發炎之情況下，創口及感染決不會痊癒。同樣，對組織之進行性破壞將危及生物體之存活。然而，慢性發炎亦會導致許多疾病，諸如枯草熱、牙周炎、動脈粥樣硬化、類風濕性關節炎及甚至癌症(例如膽囊癌)。

發炎可分類為急性發炎或慢性發炎。急性發炎為身體對有害刺激物之初始反應且藉由增強血漿及白血球(尤其顆粒球)自血液向受損組織中移動而達成。生物化學事件級聯使發炎反應擴散且成熟，涉及局部血管系統、免疫系統及受損組織內之各種細胞。長期發炎稱作慢性發炎，其引起存在於發炎部位之細胞類型發生進行性轉換且特徵在於由發炎過程同時破壞組織及使組織癒合。Kindt等人 (2006) **Kuby Immunology** [第6版]。

T細胞與發炎散播有關。原態T細胞分化引起產生T細胞子集，各子集具有不同細胞激素表現圖譜以發揮不同免疫功能。經由活化各別信號傳導路徑，此過程產生分化之輔助T(Th)細胞(稱作Th1、Th2及Th17)以及誘導之調節性T細胞(其抑制Th細胞)。此等不同細胞對於對抗感染性疾病及癌症為重要的；然而，在異常時，其可能導致慢性發炎疾病。一種此類疾病為發炎性腸病(IBD)，其中各T細胞子集在疾病中可能起作用。Zenewicz等人 (2009) **Trends in Molecular Medicine** 15(5): 199-207。因此，T細胞參與自體免疫病症及發炎病狀兩者，且此項技術中存在對可調節T細胞活性以治療自體免疫病症及發炎病狀之新穎分子的需求。

【發明內容】

本發明係關於VISTA之可溶形式(例如VISTA-Ig)、包括VISTA-Ig之最佳化形式、包括具有增強之效力之包含連接多肽之多聚型式的用

途，其可以全身方式投與以用於治療及/或預防有需要之個體之自體免疫、過敏及發炎病狀。例示性病狀包括多發性硬化症；類風濕性關節炎；牛皮癬性關節炎；狼瘡病症，諸如全身性紅斑性狼瘡(SLE)、盤狀狼瘡、藥物誘導之狼瘡及新生兒狼瘡；及過敏或發炎呼吸病症，諸如哮喘、過敏性鼻炎、枯草熱、蕁麻疹、血管炎及徹奇-斯全司症候群以及諸如下文所揭示之其他過敏、發炎及自體免疫病狀。

本發明亦提供改良之VISTA融合蛋白質，其包含一或多個(亦即，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12個或12個以上複本之與SEQ ID NO: 2、4、5、16至25、36或37之多肽序列之胞外域、或至少50、100、150、200、250、275或300個胺基酸之片段具有至少約90%序列一致性的多肽、及一或多個免疫球蛋白(Ig)蛋白質及視情況選用之連接肽，該連接肽介於融合多肽中之VISTA多肽與另一多肽(較佳Ig多肽，諸如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc區或片段)之間，該Ig多肽視情況可經誘變處理以改變(增加、改變或減少)補體結合及/或FcR結合。

在一個實施例中，多肽可與SEQ ID NO: 2、4、5、16至25、36或37之多肽序列或至少50、100、150、200、250、275或300個胺基酸之片段具有至少約95%序列一致性。

在一個實施例中，Ig蛋白可為IgG、IgG1、IgG2、IgG2a、IgM、IgE或IgA，其視情況可經誘變處理以改變(增加、改變或減少)補體結合及/或FcR結合。在一個實施例中，Ig蛋白可為人類IgG1之恆定區及鉸鏈區，其視情況可經誘變處理以改變(增加、改變或減少)補體結合及/或FcR結合。

在一個實施例中，融合多肽中VISTA之胞外域包含多肽，該多肽與胺基酸殘基32至190或與可包含胺基酸16至194之VISTA之胞外IgV域至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致。在一個實施

例中，融合蛋白質包含至少兩個複本之VISTA蛋白質或至少50、100、150、200、250、275或300個胺基酸之片段及IgG1或IgG2a。在另一實施例中，融合蛋白質包含至少三個或四個複本之VISTA蛋白質及IgG1或IgG2a，視情況插入肽連接子，例如包含絲胺酸及/或甘胺酸殘基之連接子，該連接子增強所得融合多肽之效力。

在一個實施例中，融合蛋白質包含至少兩個複本之VISTA蛋白質及IgG1 Fc或非FcR結合IgG1。在一個實施例中，融合蛋白質包含至少四個、五個或六個複本之VISTA蛋白質及IgG1或IgG2a。在一個實施例中，融合蛋白質包含至少四個複本之VISTA蛋白質及IgG1 Fc或非FcR結合IgG1。

在一個實施例中，經分離之多聚VISTA蛋白質可包含至少兩個複本之多肽，該多肽之至少約90%序列與可包含SEQ ID NO: 2、4或25之多肽序列之胞外域或至少50、100、150、200、250、275或300個胺基酸的片段一致。在另一實施例中，多肽可與SEQ ID NO: 2、4、5、16至25、36或37之多肽序列或至少50、100、150、200、250、275或300個胺基酸之片段具有至少約95%序列一致性。在另一實施例中，多肽可與可為至少50個胺基酸長之該VISTA多肽之胞外域的片段或至少75、100、150、200、250、275或300個胺基酸之片段具有至少約90%序列一致性。

在另一實施例中，該VISTA多肽之胞外域之片段可為至少約75個胺基酸長。在另一實施例中，該VISTA多肽之胞外域之片段可為至少約100個胺基酸長。在另一實施例中，該VISTA多肽之胞外域之片段可為至少約125個胺基酸長。

在另一實施例中，多聚VISTA蛋白質包含至少三個複本之該胞外域或其片段。在另一實施例中，多聚VISTA蛋白質包含至少四個複本之該胞外域或其片段。在另一實施例中，多聚VISTA蛋白質包含至少

五個複本之該胞外域或其片段。在另一實施例中，多聚VISTA蛋白質包含至少六個複本之該胞外域或其片段。

在另一實施例中，VISTA之胞外域或片段可連接至寡聚合域之N端上。在另一實施例中，寡聚合域可為GCN4、COMP、SNARE、CMP、MAT、含有LLR之1 NLRC、NOD2核苷酸結合NLRC2、含有LRR之1 NLRC、NOD2核苷酸結合NLRC2或PSORAS1。

在一個實施例中，組合物可包含VISTA融合蛋白質。在一個實施例中，組合物可包含多聚VISTA蛋白質。在另一實施例中，組合物可為醫藥組合物。在另一實施例中，醫藥組合物可包含醫藥學上可接受之載劑、賦形劑、佐劑或溶液。在另一實施例中，組合物可進一步包含至少一種其他免疫抑制劑。在另一實施例中，免疫抑制劑可為PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、ICOS蛋白質或至少50、100、150、200、250、275或300個胺基酸之片段，或對前述中之任一者具有特異性之抗體。

在一個實施例中，治療或預防有需要之個體之發炎之方法可包含投與有效量之VISTA融合蛋白質、視情況為VISTA-Ig或多聚VISTA蛋白質。

在一個實施例中，用於治療或預防發炎之組合物可包含投與有效量之VISTA融合蛋白質、視情況為VISTA-Ig或多聚VISTA蛋白質。

在另一實施例中，有效量之VISTA融合蛋白質、視情況為VISTA-Ig或多聚VISTA蛋白質用於製造供治療發炎用之藥物的用途。

在另一實施例中，個體可患有發炎病狀。

在另一實施例中，發炎病狀可為酸逆流/胃灼熱；痤瘡；尋常痤瘡；過敏及敏感；阿茲海默氏病(Alzheimer's Disease)；哮喘；動脈粥樣硬化及血管阻塞性疾病，視情況為動脈粥樣硬化、缺血性心臟病、心肌梗塞、中風、周邊血管疾病或血管支架再狹窄；自體免疫疾病；

支氣管炎；癌症；心臟炎；白內障；乳糜瀉；慢性疼痛；慢性前列腺炎；肝硬化；結腸炎；結締組織病，視情況為全身性紅斑性狼瘡症、全身性硬化症、多發性肌炎、皮肌炎或休格連氏症候群(Sjogren's Syndrome)；角膜病；克羅恩氏病(Crohn's Disease)；結晶性關節病，視情況為痛風、假性痛風、焦磷酸鈣沈積病；癡呆；皮炎；糖尿病；乾眼症；濕疹；水腫；氣腫；肌肉纖維疼痛；胃腸炎；齒齦炎；絲球體腎炎；心臟病；肝炎；高血壓；過敏；發炎性腸病；發炎病狀，包括創傷或局部缺血之後果；胰島素抗性；間質性膀胱炎；虹膜睫狀體炎；虹膜炎；關節疼痛；關節炎；類風濕性關節炎；萊姆病(Lyme Disease)；代謝症候群(症候群X)；多發性硬化症；肌炎；腎炎；肥胖症；眼部疾病，包括葡萄膜炎；骨量減少；骨質疏鬆症；帕金森氏症(Parkinson's Disease)；骨盆發炎性疾病；牙周病；多動脈炎；多軟骨炎；風濕性多肌痛；牛皮癬；再灌注損傷；風濕性關節炎；風濕性疾病，視情況為類風濕性關節炎、骨關節炎或牛皮癬性關節炎；類風濕性關節炎；類肉瘤病；硬皮病；竇炎；休格連氏症候群；結腸痙攣；脊椎關節病，視情況為僵直性脊椎炎、反應性關節炎或萊特爾氏症候群(Reiter's Syndrome)；全身性念珠菌病；肌腱炎；移植排斥反應；UTI；陰道炎；血管疾病，包括動脈粥樣硬化性血管疾病；血管炎病，視情況為結節性多動脈炎；韋格納氏肉芽腫病(Wegener's Granulomatosis)；徹奇-斯全司症候群；或血管炎。

在一個實施例中，治療自體免疫疾病之方法可包含投與有效量之VISTA融合蛋白質、視情況為VISTA-Ig或多聚VISTA蛋白質。

在一個實施例中，用於治療自體免疫疾病之組合物可包含投與有效量之VISTA融合蛋白質、視情況為VISTA-Ig或多聚VISTA蛋白質。

在另一實施例中，有效量之VISTA融合蛋白質、視情況為VISTA-

Ig或多聚VISTA蛋白質用於製造治療自體免疫疾病之藥物的用途。

在另一實施例中，自體免疫疾病可為細胞介導之自體免疫疾病。

在另一實施例中，細胞介導之自體免疫疾病可為多發性硬化症、I型糖尿病、卵巢炎或甲狀腺炎。

在另一實施例中，自體免疫疾病可為後天性免疫不全症候群(AIDS)；後天脾萎縮；急性前葡萄膜炎；急性播散性腦脊髓炎(ADDEM)；急性痛風性關節炎；急性壞死性出血性腦白質炎；急性或慢性竇炎；急性化膿性腦膜炎(或其他中樞神經系統發炎病症)；急性嚴重發炎；艾迪森氏病(Addison's disease)；腎上腺炎；成人發作型糖尿病(II型糖尿病)；成人發作型特發性副甲狀腺低能症(AOIH)；無 γ 球蛋白血症；顆粒球缺乏症；血管炎病，包括血管炎，視情況為大血管血管炎；視情況為風濕性多肌痛及巨細胞性(高安氏(Takayasu's))關節炎；過敏病狀；過敏性接觸性皮炎；過敏性皮炎；過敏性肉芽腫性血管炎；過敏性過敏病症；過敏性神經炎；過敏反應；斑禿；全禿；阿爾波特氏症候群(Alport's syndrome)；肺泡炎，視情況為過敏性肺泡炎及纖維化肺泡炎；阿茲海默氏病；澱粉樣變性；肌萎縮性側索硬化(ALS；葛雷克氏病(Lou Gehrig's disease))；嗜伊紅血球相關病症，視情況為嗜伊紅血球增多；全身性過敏反應；僵直性脊椎炎；血管擴張；抗體介導之腎炎；抗GBM/抗TBM腎炎；抗原-抗體複合物介導之疾病；抗腎小球基底膜病；抗磷脂抗體症候群；抗磷脂症候群(APS)；口瘡；口瘡性口炎；再生不能性貧血；心律不整；動脈硬化；動脈硬化病症；關節炎，視情況為類風濕性關節炎，諸如急性關節炎或慢性類風濕性關節炎；慢性漸進性關節炎；變形性關節炎；蛔蟲病；麩黴腫；含有嗜伊紅血球之肉芽腫；麩菌病；無精液症；哮喘，視情況為支氣管哮喘(asthma bronchiale、bronchial asthma)或自

體免疫哮喘；共濟失調毛細管擴張症；共濟失調硬化；動脈粥樣硬化；自閉症；自體免疫血管性水腫；自體免疫再生不能性貧血；自體免疫萎縮性胃炎；自體免疫糖尿病；睪丸及卵巢之自體免疫疾病，包括自體免疫睪丸炎及卵巢炎；與膠原病有關之自體免疫病症；自體免疫自主神經障礙；自體免疫耳部疾病，視情況為自體免疫內耳疾病(AIED)；自體免疫內分泌疾病，包括甲狀腺炎，諸如自體免疫甲狀腺炎；自體免疫腸病症候群；自體免疫性腺衰竭；自體免疫聽力損失；自體免疫溶血；自體免疫肝炎；自體免疫肝臟病症；自體免疫高脂質血症；自體免疫性免疫缺乏症；自體免疫內耳疾病(AIED)；自體免疫心肌炎；自體免疫嗜中性球減少症；自體免疫胰臟炎；自體免疫多內分泌病；I型自體免疫多腺體病症候群；自體免疫視網膜病變；自體免疫血小板減少性紫癜(ATP)；自體免疫甲狀腺病；自體免疫蕁麻疹；自體免疫介導之胃腸疾病；軸突及神經元神經病變；巴婁病(Balo disease)；白塞氏病(Behcet's disease)；良性家族性及缺血再灌注損傷；良性淋巴細胞性血管炎；伯格氏病(Berger's disease)(IgA腎病變)；養鳥者肺；失明；伯克氏病(Boeck's disease)；阻塞性細支氣管炎(非移植)伴有NSIP；支氣管炎；支氣管肺炎黴菌病；布魯頓氏症候群(Bruton's syndrome)；大皰性類天疱瘡；卡普蘭氏症候群(Caplan's syndrome)；心肌病變；心血管缺血；卡斯曼氏症候群(Castleman's syndrome)；乳糜瀉；口炎性腹瀉(麩質性腸病)；小腦退化；大腦缺血及伴有血管形成之疾病；恰加斯氏病(Chagas disease)；通道病，視情況為癲癇症、CNS通道病；脈絡膜視網膜炎；脈絡膜炎；自體免疫血液學病症；慢性活動性肝炎或自體免疫慢性活動性肝炎；慢性接觸性皮炎；慢性嗜伊紅血球肺炎；慢性疲勞症候群；慢性肝炎；慢性過敏性肺炎；慢性發炎性關節炎；慢性發炎性髓鞘脫失多發性神經病變(CIDP)；慢性難治發炎；慢性黏膜與皮膚性念珠菌病；慢性神經病

變，視情況為IgM多發性神經病變或IgM介導之神經病變；慢性阻塞性氣管疾病；慢性肺部發炎疾病；慢性復發性多灶性骨髓炎(CRMO)；慢性甲狀腺炎(橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto's thyroiditis))或亞急性甲狀腺炎；徹奇-斯全司症候群；癍痕性類天庖瘡/良性黏膜類天庖瘡；CNS發炎病症；CNS血管炎；腹腔病；柯剛氏症侯群(Cogans syndrome)；冷凝集素病；息肉狀結腸炎；結腸炎，諸如潰瘍性結腸炎(ulcerative colitis、colitis ulcerosa)、膠原性結腸炎；涉及T細胞浸潤及慢性發炎反應之病狀；先天性心臟傳導阻滯；先天性風疹感染；庫姆氏陽性貧血(Coombs positive anemia)；冠狀動脈疾病；科沙奇病毒性心肌炎(Coxsackie myocarditis)；CREST症候群(鈣質沉著、雷諾氏症候群(Raynaud's phenomenon))；克羅恩氏病；冷球蛋白血症；庫欣氏症候群(Cushing's syndrome)；睫狀體炎，視情況為慢性睫狀體炎、異時性睫狀體炎、虹膜睫狀體炎或福斯氏睫狀體炎(Fuch's cyclitis)；囊腫性纖維化；細胞激素誘發之毒性；聾症；退化性關節炎；髓鞘脫失疾病，視情況為自體免疫髓鞘脫失疾病；髓鞘脫失神經病變；登革熱；疱疹樣皮炎及異位性皮炎；皮炎，包括接觸性皮炎；皮肌炎；具有急性發炎組分之皮膚病；德維克氏病(Devic's disease)(視神經脊髓炎)；糖尿病性大動脈病症；糖尿病性腎病變；糖尿病性視網膜病變；戴-布二氏貧血(Diamond Blackfan anemia)；彌漫性間質性肺纖維化；擴張型心肌病；盤狀狼瘡；涉及白血球滲出之疾病；卓斯勒氏症候群(Dressler's syndrome)；杜普伊特倫氏攣縮(Dupuytren's contracture)；埃可病毒感染(echovirus infection)；濕疹，包括過敏性或異位性濕疹；腦炎，諸如羅氏腦炎(Rasmussen's encephalitis)及邊緣葉及/或腦幹腦炎；腦脊髓炎，視情況為過敏性腦脊髓炎(allergic encephalomyelitis或encephalomyelitis allergica)及實驗性過敏性腦脊髓炎(EAE)；動脈內膜增生；心內膜炎；內分泌性眼病

變；子宮內膜異位症；心肌內膜纖維化；晶狀體過敏性眼內炎；眼內炎；過敏性腸炎；嗜伊紅血球增多-肌痛症候群；嗜伊紅血球性筋膜炎；流行性角膜結膜炎；後天性大皰性表皮鬆懈(EBA)；鞏膜外層；鞏膜外層炎；EB病毒感染(Epstein-Barr virus infection)；持久性隆起性紅斑；多形紅斑；麻風結節性紅斑；結節性紅斑；胎兒紅血球母細胞增多症；食道蠕動功能障礙；原發性混合型冷球蛋白血症；篩骨病；伊文氏症候群(Evan's syndrome)；實驗性過敏性腦脊髓炎(EAE)；因子VIII缺乏症；農民肺；風濕熱；費爾提氏症候群(Felty's syndrome)；肌肉纖維疼痛；纖維化肺泡炎；絲蟲病；局部區段性腎小球硬化症(FSGS)；食物中毒；額葉萎縮；胃萎縮；巨細胞性關節炎(顳關節炎)；巨細胞性肝炎；巨細胞性多肌痛；絲球體腎炎；伴有及不伴有腎病症候群之絲球體腎炎(GN)，諸如慢性或急性絲球體腎炎(例如原發性GN)；古德帕斯徹氏症候群(Goodpasture's syndrome)；痛風性關節炎；顆粒球輸注相關症候群；肉芽腫病，包括淋巴瘤樣肉芽腫病；伴有多血管炎之肉芽腫病(GPA)；肉芽腫性葡萄膜炎；格雷氏病(Grave's disease)；古立安-白瑞症候群(Guillain-Barre syndrome)；點狀牛皮癬；陣發性血紅素尿；黑-里二氏病(Hamman-Rich's disease)；橋本氏病；橋本氏腦炎；橋本氏甲狀腺炎；血色病；溶血性貧血或免疫性溶血性貧血，包括自體免疫溶血性貧血(AIHA)；溶血性貧血；A型血友病；亨-舍二氏紫癍(Henoch-Schonlein purpura)；妊娠疱疹；人類免疫缺乏病毒(HIV)感染；痛覺過敏；低 γ 球蛋白血症；性腺低能症；副甲狀腺低能症；特發性糖尿病尿崩症；特發性面神經麻痺；特發性甲狀腺功能低下；特發性IgA腎病變；特發性膜性GN或特發性膜性腎病；特發性腎病症候群；特發性肺纖維化；特發性脂肪瀉；特發性血小板減少性紫癍(ITP)；IgA腎病變；IgE介導之疾病，視情況為全身性過敏反應及過敏性或異位性鼻炎；IgG4相關硬

化性疾病；侷限性迴腸炎；免疫複合物腎炎；與由細胞激素及T淋巴細胞介導之急性及遲發型過敏症有關之免疫反應；免疫介導之GN；免疫調節性脂蛋白，包括成人或急性呼吸窘迫症候群(ARDS)；包涵體肌炎；感染性關節炎；由抗精子抗體所致之不孕症；全部或部分葡萄膜發炎；發炎性腸病(IBM)發炎性過度增殖性皮膚疾病；發炎性肌病；胰島素依賴型糖尿病(1型)；胰島炎；間質性膀胱炎；間質性肺病；間質肺纖維化；虹膜炎；缺血再灌注病症；關節發炎；青少年關節炎；青少年皮肌炎；青少年糖尿病；青少年發作型(I型)糖尿病，包括兒童胰島素依賴型糖尿病(IDDM)；青少年發作型類風濕性關節炎；川崎氏症候群(Kawasaki syndrome)；乾躁性角膜結膜炎；錐蟲病；藍伯-伊頓症候群(Lambert-Eaton syndrome)；利什曼體病(leishmaniasis)；麻風病；白血球減少症；白血球黏附缺乏症；白血球破碎性血管炎；白血球減少症；扁平苔癬；硬化性苔癬；木質性結膜炎；線性IgA皮膚病；線性IgA疾病(LAD)；呂弗勒氏症候群(Löffler's syndrome)；類狼瘡性肝炎；狼瘡(包括腎炎、大腦炎、兒童、非腎、腎外、盤狀、脫髮)；狼瘡(SLE)；播散性紅斑狼瘡；萊姆關節炎(Lyme arthritis)；萊姆病；淋巴間質性肺炎；瘧疾；男性及女性自體免疫不孕症；上頷骨病；中血管血管炎(包括川崎氏病及結節性多動脈炎)；膜狀增生性或膜增生性GN(MPGN)(包括I型及II型)及快速進行性GN；膜性GN(膜性腎病)；美尼爾氏病(Meniere's disease)；腦膜炎；顯微性結腸炎；顯微性多血管炎；偏頭痛；微小腎病變；混合型結締組織病(MCTD)；感染性單核細胞增多症；莫倫氏潰瘍(Mooren's ulcer)；穆-哈二氏病(Mucha-Habermann disease)；多灶性運動神經病變；多發性內分泌衰竭；多器官損傷症候群，諸如繼發於敗血症、創傷或出血之多器官損傷症候群；多器官損傷症候群；多發性硬化症(MS)，諸如脊髓-眼MS；多發性硬化症；流行性腮腺炎；肌肉

病症；重症肌無力，諸如胸腺瘤相關重症肌無力；重症肌無力；心肌炎；肌炎；發作性睡病；壞死性小腸結腸炎；及透壁性結腸炎；及自體免疫發炎性腸病；壞死性、皮膚性或過敏性血管炎；新生兒狼瘡症候群(NLE)；腎病；腎病症候群；神經疾病；視神經脊髓炎(德維克氏)；視神經脊髓炎；神經性肌強直；嗜中性球減少症；非癌性淋巴細胞增多症；非肉芽腫性葡萄膜炎；非惡性胸腺瘤；眼部及眼眶發炎症候群；眼部癍痕性類天疱瘡；卵巢炎；交感神經性眼炎；眼陣攣肌陣攣症候群(OMS)；眼陣攣或眼陣攣肌陣攣症候群(OMS)；及感覺神經病變；視神經炎；肉芽腫性睪丸炎；骨關節炎；復發性風濕病；胰臟炎；全血球減少症；PANDAS(與鏈球菌有關之兒童自體免疫神經精神病症)；腫瘤伴生小腦退化；腫瘤伴生症候群；腫瘤伴生症候群，包括神經腫瘤伴生症候群，視情況為藍伯-伊頓肌無力症候群或伊頓-藍伯症候群；寄生物疾病，諸如利什曼原蟲(*Leishmania*)；陣發性夜間血紅素尿(PNH)；帕-羅二氏症候群(Parry Romberg syndrome)；睫狀體平坦部炎(周邊葡萄膜炎)；帕-特二氏症候群(Parsonnage-Turner syndrome)；小病毒感染；類天疱瘡，諸如大疱性類天疱瘡及皮膚類天疱瘡；天疱瘡(包括尋常天疱瘡)；紅斑性天疱瘡；落葉狀天疱瘡；天疱瘡黏膜類天疱瘡；天疱瘡；消化性潰瘍；週期性麻痺；周邊神經病變；靜脈周邊性腦脊髓炎；惡性貧血(pernicious anemia/anemia perniosa)；惡性貧血；晶狀體抗原性葡萄膜炎；肺硬化；POEMS症候群；結節性多動脈炎，I型、II型及III型；原發性慢性多發性關節炎；多軟骨炎(例如難治或復發性多軟骨炎)；多內分泌腺自體免疫疾病；多內分泌不足；多腺體症候群，視情況為自體免疫多腺體症候群(或多腺體內分泌病症候群)；風濕性多肌痛；多發性肌炎；多發性肌炎/皮肌炎；多發性神經病變；急性多神經根炎；心切開術後症候群；後葡萄膜炎；或自體免疫葡萄膜炎；心肌梗塞後症候群；心包切

開術後症候群；鏈球菌感染後腎炎；疫苗接種後症候群；早老性癡呆；原發性膽汁性肝硬化；原發性甲狀腺功能低下；原發性特發性黏液水腫；原發性淋巴細胞增多症，其包括單株B細胞淋巴細胞增多症，視情況為良性單株 γ 球蛋白病及意義未明之單株 γ 球蛋白病(MGUS)；原發性黏液水腫；原發性進行性MS(PPMS)及復發-緩解型MS(RRMS)；原發性硬化性膽管炎；孕酮皮炎；進行性全身性硬化；增生性關節炎；牛皮癬，諸如斑塊型牛皮癬；牛皮癬；牛皮癬性關節炎；肺泡蛋白沈積症；肺部浸潤性嗜伊紅血球增多；純紅血球貧血或再生不良(PRCA)；純紅血球再生不良；化膿性或非化膿性竇炎；膿皰性牛皮癬及指甲牛皮癬；腎盂炎；壞疽性膿皮病；奎汶氏甲狀腺炎(Quervain's thyroiditis)；雷諾氏症候群；反應性關節炎；反覆流產；血壓反應降低；反射性交感神經失養症；難治型脂肪瀉；萊特爾氏病或症候群；復發性多軟骨炎；心肌或其他組織再灌注損傷；再灌注損傷；呼吸窘迫症候群；腿不寧症候群；視網膜自體免疫；腹膜後纖維化；雷諾氏症候群；風濕性疾病；風濕熱；風濕病；類風濕性關節炎；類風濕性脊椎炎；風疹病毒感染；塞氏症候群(Sampter's syndrome)；類肉瘤病；血吸蟲病；施密特症候群(Schmidt syndrome)；SCID及EB病毒相關疾病；鞏膜；鞏膜炎；指硬皮病；硬皮病，視情況為全身性硬皮病；硬化性膽管炎；播散性硬化；硬化，諸如全身性硬化；感覺神經性聽力損失；血清反應陰性脊椎關節炎；席漢氏症候群(Sheehan's syndrome)；夏爾曼氏症候群(Shulman's syndrome)；矽肺病；休格連氏症候群；精子及睪丸自體免疫；蝶竇炎；斯-約二氏症候群(Stevens-Johnson syndrome)；僵人症候群；亞急性細菌性心內膜炎(SBE)；亞急性皮膚紅斑狼瘡；突發性聽力損失；蘇薩克氏症候群(Susac's syndrome)；西登哈姆氏舞蹈病(Sydenham's chorea)；交感神經性眼炎；全身性紅斑性狼瘡症(SLE；systemic

lupus erythematosus或systemic lupus erythematoses)；皮膚SLE；全身性壞死性血管炎；ANCA相關血管炎，視情況為微奇-斯全司血管炎或症候群(CSS)；運動失調；高安氏動脈炎；毛細血管擴張；顱動脈炎/巨細胞性動脈炎；血栓閉塞性脈管炎；血小板減少症，包括血栓性血小板減少性紫癰(TTP)，及自體免疫或免疫介導之血小板減少症，諸如特發性血小板減少性紫癰(ITP)，包括慢性或急性ITP、血小板減少性紫癰(TTP)；甲狀腺中毒症；組織損傷；托-亨二氏症候群(Tolosa-Hunt syndrome)；中毒性表皮壞死溶解；中毒性休克症候群；輸血反應；嬰兒期短暫性低 γ 球蛋白血症；橫貫性脊髓炎(transverse myelitis、traverse myelitis)；熱帶肺性嗜伊紅血球增多；結核病；潰瘍性結腸炎；未分化型結締組織病(UCTD)；蕁麻疹，視情況為慢性過敏性蕁麻疹及慢性特發性蕁麻疹，包括慢性自體免疫蕁麻疹；葡萄膜炎；前葡萄膜炎；葡萄膜視網膜炎；瓣膜炎；血管功能障礙；血管炎；脊椎關節炎；水皰性皮膚病；白斑病；韋格納氏肉芽腫病(伴有多血管炎之肉芽腫病(GPA))；維斯科特-奧爾德里奇症候群(Wiskott-Aldrich syndrome)及x性聯高IgM症候群。

在另一實施例中，方法、用途或組合物可進一步包含投與另一免疫調節劑及/或抗原。在另一實施例中，免疫調節劑可為TLR促效劑(TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、TLR11促效劑)，可為I型干擾素，視情況為 α 干擾素或 β 干擾素，或為CD40促效劑，或IL-6拮抗劑或TNF拮抗劑，諸如對前述中之任一者具有特異性之抗體或抗體片段。

在一個實施例中，治療發炎病症之方法可包含投與有效量之VISTA融合蛋白質、視情況為VISTA-Ig或多聚VISTA蛋白質。

在一個實施例中，用於治療發炎病症之組合物可包含有效量之VISTA融合蛋白質、視情況為VISTA-Ig或多聚VISTA蛋白質。

在一個實施例中，有效量之VISTA融合蛋白質、視情況為VISTA-Ig或多聚VISTA蛋白質用於製造供治療發炎病症用之藥物的用途。

在一個實施例中，所治療之病症可選自1型糖尿病、多發性硬化症、類風濕性關節炎、牛皮癬性關節炎、全身性紅斑性狼瘡症、風濕性疾病、過敏病症、哮喘、過敏性鼻炎、皮膚病症、克羅恩氏病、潰瘍性結腸炎、移植排斥反應、移植物抗宿主疾病、鏈球菌感染後及自體免疫腎衰竭、敗血性休克、全身性發炎反應症候群(SIRS)、成人呼吸窘迫症候群(ARDS)及蟄刺毒作用、自體發炎疾病、骨關節炎、結晶性關節炎、囊炎、關節病、肌腱炎、韌帶炎或創傷性關節損傷。

在一個實施例中，所治療之病症可為多發性硬化症、狼瘡病狀(諸如SLE)、呼吸病症(諸如哮喘)、蕁麻疹、血管炎、徹奇-斯全司症候群、牛皮癬性關節炎或類風濕性關節炎。

在一個實施例中，治療移植物抗宿主疾病(GVHD)之方法可包含投與有效量之VISTA融合蛋白質、視情況為VISTA-Ig或多聚VISTA蛋白質。

在一個實施例中，用於治療移植物抗宿主疾病(GVHD)之組合物可包含投與有效量之VISTA融合蛋白質、視情況為VISTA-Ig或多聚VISTA蛋白質。

在一個實施例中，有效量之VISTA融合蛋白質、視情況為VISTA-Ig或多聚VISTA蛋白質用於製造供治療移植物抗宿主疾病(GVHD)用之藥物的用途。

在一個實施例中，移植物抗宿主疾病可為急性移植物抗宿主疾病、慢性移植物抗宿主疾病、與幹細胞移植相關之急性移植物抗宿主疾病、與幹細胞移植相關之慢性移植物抗宿主疾病、與骨髓移植相關之急性移植物抗宿主疾病、與同種異體造血幹細胞移植(HSCT)相關之急性移植物抗宿主疾病或與骨髓移植相關之慢性移植物抗宿主疾

病。

在一個實施例中，所治療之患者可具有移植物抗宿主疾病(GVHD)之至少一種症狀，視情況其中該患者展現急性GVHD，包括(但不限於)腹痛、腹部抽筋、腹瀉、發熱、黃疸、皮疹、嘔吐及體重損失。在一個實施例中，所治療之患者可具有慢性移植物抗宿主疾病(GVHD)之至少一種症狀，包括(但不限於)乾眼症、口乾燥、脫髮、肝炎、肺病症、胃腸道病症、皮疹及皮膚增厚。在一個實施例中，患者已或將接受同種異體幹細胞或骨髓移植。

在一個實施例中，患者可能已或將接受自體性幹細胞或骨髓移植。

在一個實施例中，治療患有過敏、發炎或自體免疫病症之個體之方法可包含投與有效量之VISTA融合蛋白質、視情況為VISTA-Ig或多聚VISTA蛋白質。

在一個實施例中，用於治療患有過敏、發炎或自體免疫病症之個體之組合物可包含投與有效量之VISTA融合蛋白質、視情況為VISTA-Ig或多聚VISTA蛋白質。

在一個實施例中，有效量之VISTA融合蛋白質、視情況為VISTA-Ig或多聚VISTA蛋白質用於製造供治療過敏、發炎或自體免疫病症用之藥物的用途。

在另一實施例中，過敏、發炎或自體免疫病症可選自牛皮癬、皮膚炎、異位性皮炎；全身性硬皮病、硬化；克羅恩氏病、潰瘍性結腸炎、呼吸窘迫症候群、成人呼吸窘迫症候群(ARDS)；皮膚炎；腦膜炎；腦炎；葡萄膜炎；結腸炎；絲球體腎炎；濕疹、哮喘、動脈粥樣硬化；白血球黏附缺乏症；類風濕性關節炎；全身性紅斑性狼瘡症(SLE)；糖尿病，視情況為I型糖尿病或胰島素依賴型糖尿病；多發性硬化症；雷諾氏症候群；自體免疫甲狀腺炎；過敏性腦脊髓炎；休格

連氏症候群；青少年發作型糖尿病；結核病、類肉瘤病、多發性肌炎、肉芽腫病及血管炎；惡性貧血(艾迪森氏病)；移植物排斥疾病、GVHD、中樞神經系統(CNS)發炎病症；多器官損傷症候群；溶血性貧血、冷球蛋白血症或庫姆氏陽性貧血；重症肌無力；抗原-抗體複合物介導之疾病；抗腎小球基底膜病；抗磷脂症候群；過敏性神經炎；格雷氏病；藍伯-伊頓肌無力症候群；大皰性類天疱瘡；天疱瘡；自體免疫多內分泌病；萊特爾氏病；僵人症候群；白塞氏病；巨細胞性動脈炎；免疫複合物性腎炎；IgA腎病變；IgM多發性神經病變；免疫血小板減少性紫癜(ITP)及自體免疫血小板減少症。

在另一實施例中；疾病可選自關節炎；類風濕性關節炎；急性關節炎；慢性類風濕性關節炎；痛風性關節炎；急性痛風性關節炎；慢性發炎性關節炎；退化性關節炎；感染性關節炎；萊姆關節炎；增生性關節炎；牛皮癬性關節炎；脊椎關節炎；及青少年發作型類風濕性關節炎；骨關節炎；慢性漸進性關節炎；變形性關節炎；原發性慢性多發性關節炎；反應性關節炎；及僵直性脊椎炎；發炎性過度增殖性皮膚疾病；牛皮癬，諸如斑塊型牛皮癬、點狀牛皮癬、膿皰性牛皮癬及指甲牛皮癬；皮膚炎，包括接觸性皮炎、慢性接觸性皮炎、過敏性皮炎、過敏性接觸性皮炎、疱疹樣皮炎及異位性皮炎；x性聯高IgM症候群；蕁麻疹，諸如慢性過敏性蕁麻疹及慢性特發性蕁麻疹，包括慢性自體免疫蕁麻疹；多發性肌炎/皮肌炎；青少年皮肌炎；中毒性表皮壞死溶解；硬皮病；全身性硬皮病；硬化；全身性硬化症；多發性硬化症(MS)；脊髓-眼MS；原發性進行性MS(PPMS)；復發-緩解型MS(RRMS)；進行性全身性硬化；動脈粥樣硬化；動脈硬化；播散性硬化；及共濟失調硬化；發炎性腸病(IBD)；克羅恩氏病；結腸炎；潰瘍性結腸炎；顯微性結腸炎；膠原性結腸炎；息肉狀結腸炎；壞死性小腸結腸炎；透壁性結腸炎；自體免疫發炎性腸病；壞疽性膿

皮病；結節性紅斑；原發性硬化性膽管炎；鞏膜外層炎；呼吸窘迫症候群；成人或急性呼吸窘迫症候群(ARDS)；腦膜炎；全部或部分葡萄膜發炎；虹膜炎；脈絡膜炎；自體免疫血液學病症；類風濕性脊椎炎；突發性聽力損失；IgE介導之疾病，諸如全身性過敏反應及過敏性及異位性鼻炎；腦炎；羅氏腦炎；邊緣葉及/或腦幹腦炎；葡萄膜炎；前葡萄膜炎；急性前葡萄膜炎；肉芽腫性葡萄膜炎；非肉芽腫性葡萄膜炎；晶狀體抗原性葡萄膜炎；後葡萄膜炎；自體免疫葡萄膜炎；絲球體腎炎(GN)；特發性膜性GN或特發性膜性腎病；膜狀增生性或膜增生性GN；快速進行性GN；過敏病狀；自體免疫心肌炎；白血球黏附缺乏症；全身性紅斑性狼瘡症(SLE)，諸如皮膚SLE；亞急性皮膚紅斑性狼瘡、新生兒狼瘡症候群(NLE)、播散性紅斑狼瘡、狼瘡(包括腎炎、大腦炎、兒童、非腎、腎外、盤狀、脫髮)；青少年發作型(I型)糖尿病，包括兒童胰島素依賴型糖尿病(IDDM)；成人發作型糖尿病(II型糖尿病)；自體免疫糖尿病；特發性糖尿病尿崩症；與由細胞激素及T淋巴細胞介導之急性及遲發型過敏症有關之免疫反應；結核病；類肉瘤病；肉芽腫病；淋巴瘤樣肉芽腫病；韋格納氏肉芽腫病；顆粒球缺乏症；血管炎病，包括血管炎、大血管血管炎；風濕性多肌痛；巨細胞(高安氏)動脈炎；中血管血管炎；川崎氏病；結節性多動脈炎；顯微性多動脈炎；CNS血管炎；壞死性、皮膚性、過敏性血管炎；全身性壞死性血管炎；及ANCA相關血管炎，諸如徹奇-斯全司血管炎或症候群(CSS)；顱動脈炎；再生不能性貧血；自體免疫再生不能性貧血；庫姆氏陽性貧血；戴-布二氏貧血；溶血性貧血或免疫性溶血性貧血，包括自體免疫溶血性貧血(AIHA)；惡性貧血；艾迪森氏病；純紅血球貧血或再生不全(PRCA)；因子VIII缺乏症；A型血友病；自體免疫嗜中性球減少症；全血球減少症；白血球減少症；涉及白血球滲出之疾病；CNS發炎病症；多器官損傷症候

群，諸如繼發於敗血症、創傷或出血之多器官損傷症候群；抗原-抗體複合物介導之疾病；抗腎小球基底膜病；抗磷脂抗體症候群；過敏性神經炎；白塞氏(Bechet's或Behcet's)病；卡斯曼氏症候群；古德帕斯徹氏症候群；雷諾氏症候群；休格連氏症候群；斯-約二氏症候群；類天疱瘡，諸如大疱性類天疱瘡及皮膚類天疱瘡；天疱瘡，視情況為尋常天疱瘡、落葉狀天疱瘡、天疱瘡黏膜類天疱瘡、紅斑性天疱瘡；自體免疫多內分泌病；萊特爾氏病或症候群；免疫複合物性腎炎；抗體介導之腎炎；視神經脊髓炎；多發性神經病變；慢性神經病變；IgM多發性神經病變；IgM介導之神經病變；血小板減少症；血栓性血小板減少性紫癜(TTP)；特發性血小板減少性紫癜(ITP)；自體免疫睪丸炎及卵巢炎；原發性甲狀腺功能低下；副甲狀腺低能症；自體免疫甲狀腺炎；橋本氏病；慢性甲狀腺炎(橋本氏甲狀腺炎)；亞急性甲狀腺炎；自體免疫甲狀腺病；特發性甲狀腺功能低下；格雷氏病；多腺體症候群，諸如自體免疫多腺體症候群(或多腺體內分泌病症候群)；腫瘤伴生症候群，包括神經腫瘤伴生症候群，諸如藍伯-伊頓肌無力症候群或伊頓-藍伯症候群；僵人症候群；腦脊髓炎；過敏性腦脊髓炎；實驗性過敏性腦脊髓炎(EAE)；重症肌無力；胸腺瘤相關重症肌無力；小腦退化；神經性肌強直；眼陣攣或眼陣攣肌陣攣症候群(OMS)；及感覺神經病變；多灶性運動神經病變；席漢氏症候群；自體免疫肝炎；慢性肝炎；類狼瘡性肝炎；巨細胞性肝炎；慢性活動性肝炎或自體免疫慢性活動性肝炎；淋巴間質性肺炎；阻塞性細支氣管炎(非移植)伴有NSIP；古立安-白瑞症候群；伯格氏病(IgA腎病變)；特發性IgA腎病變；線性IgA皮膚病；原發性膽汁性肝硬化；肝硬化；自體免疫腸病症候群；乳糜瀉；腹腔病；口炎性腹瀉(麩質性腸病)；難治型脂肪瀉；特發性脂肪瀉；冷球蛋白血症；肌萎縮性側索硬化(ALS；葛雷克氏病)；冠狀動脈疾病；自體免疫耳部疾病，諸

如自體免疫內耳疾病(AIED)、自體免疫聽力損失；眼陣攣肌陣攣症候群(OMS)；多軟骨炎，諸如難治性或復發性多軟骨炎；肺泡蛋白沈積症；澱粉樣變性病；鞏膜炎；非癌性淋巴細胞增多症；原發性淋巴細胞增多症，其包括單株B細胞淋巴細胞增多症，視情況為良性單株 γ 球蛋白病或意義未明之單株 γ 球蛋白病；MGUS；周邊神經病變；腫瘤伴生症候群；通道病，諸如癲癇症、偏頭痛、心律不整、肌肉病症、聾症、失明、週期性麻痺及CNS通道病；自閉症；發炎性肌病；局部區段性腎小球硬化症(FSGS)；內分泌眼病；葡萄膜視網膜炎；脈絡膜視網膜炎；自體免疫肝臟病症；肌肉纖維疼痛；多發性內分泌衰竭；施密特症候群；腎上腺炎；胃萎縮；早老性癡呆；髓鞘脫失疾病，諸如自體免疫髓鞘脫失疾病；糖尿病性腎病變；卓斯勒氏症候群；斑禿；CREST症候群(鈣質沉著、雷諾氏症候群、食道蠕動功能障礙、指硬皮病及毛細血管擴張)；男性及女性自體免疫不孕症；混合型結締組織病；恰加斯氏病；風濕熱；反覆流產；農民肺；多形紅斑；心切開術後症候群；庫欣氏症候群；養鳥者肺；過敏性肉芽腫性血管炎；良性淋巴細胞性血管炎；阿爾波特氏症候群；肺泡炎，諸如過敏性肺泡炎及纖維化肺泡炎；間質性肺病；輸血反應；麻風病；瘧疾；利什曼體病；錐蟲病；血吸蟲病；蛔蟲病；麴菌病；塞氏症候群；卡普蘭氏症候群；登革熱；心內膜炎；心肌內膜纖維化；彌漫性間質性肺纖維化；肺間質纖維化；特發性肺纖維化；囊腫性纖維化；眼內炎；持久性隆起性紅斑；胎兒紅血球母細胞增多症；嗜伊紅血球性筋膜炎；夏爾曼氏症候群；費爾提氏症候群；絲蟲病；睫狀體炎，諸如慢性睫狀體炎、異時性睫狀體炎、虹膜睫狀體炎或福斯氏睫狀體炎；亨-舍二氏紫癍；人類免疫缺乏病毒(HIV)感染；埃可病毒感染；心肌病變；阿茲海默氏病；小病毒感染；風疹病毒感染；疫苗接種後症候群；先天性風疹感染；EB病毒感染；流行性腮腺炎；伊文氏症候

群；自體免疫性腺衰竭；西登哈姆氏舞蹈病；鏈球菌感染後腎炎；血栓閉塞性脈管炎；甲狀腺中毒症；運動失調；脈絡膜炎；巨細胞性多肌痛；內分泌性眼病變；慢性過敏性肺炎；乾燥性角膜結膜炎；流行性角膜結膜炎；特發性腎病症候群；微小腎病變；良性家族性及缺血再灌注損傷；視網膜自體免疫；關節發炎；支氣管炎；慢性阻塞性氣管疾病；矽肺病；口瘡；口瘡性口炎；動脈硬化病症；無精液症；自體免疫溶血；伯克氏病；冷球蛋白血症；杜普伊特倫氏攣縮；晶狀體過敏性眼內炎；過敏性腸炎；麻風結節性紅斑；特發性面神經麻痺；慢性疲勞症候群；風濕熱；黑-里二氏病；感覺神經性聽力損失；陣發性血紅素尿；性腺低能症；侷限性迴腸炎；白血球減少症；感染性單核細胞增多症；橫貫性脊髓炎；原發性特發性黏液水腫；腎病；交感神經性眼炎；肉芽腫性睪丸炎；胰臟炎；急性多神經根炎；壞疽性膿皮病；奎汶氏甲狀腺炎；後天脾萎縮；由抗精子抗體所致之不孕症；非惡性胸腺瘤；白斑病；SCID及EB病毒相關疾病；後天性免疫不全症候群(AIDS)；寄生物疾病，諸如利什曼原蟲；中毒性休克症候群；食物中毒；涉及T細胞浸潤之病狀；白血球黏附缺乏症；與由細胞激素及T淋巴細胞介導之急性及遲發型過敏症有關之免疫反應；涉及白血球滲出之疾病；多器官損傷症候群；抗原-抗體複合物介導之疾病；抗腎小球基底膜病；過敏性神經炎；自體免疫多內分泌病；卵巢炎；原發性黏液水腫；自體免疫萎縮性胃炎；交感神經性眼炎；風濕性疾病；混合型結締組織病；腎病症候群；胰島炎；多內分泌不足；周邊神經病變；I型自體免疫多腺體症候群；成人發作型特發性副甲狀腺低能症(AOIH)；全禿；擴張型心肌病；後天性大皰性表皮鬆懈(EBA)；血色病；心肌炎；腎病症候群；原發性硬化性膽管炎；化膿性或非化膿性竇炎；急性或慢性竇炎；篩竇炎、額竇炎、上頷竇炎或蝶竇炎；嗜伊紅血球相關病症，諸如嗜伊紅血球增多；肺部浸潤

性嗜伊紅血球增多；嗜伊紅血球增多-肌痛症候群；呂弗勒氏症候群；慢性嗜伊紅血球肺炎；熱帶肺性嗜伊紅血球增多；支氣管肺炎麴菌病；麴黴腫，或含有嗜伊紅血球之肉芽腫；全身性過敏反應；血清反應陰性脊椎關節炎；多內分泌腺自體免疫疾病；硬化性膽管炎；鞏膜；鞏膜外層；慢性黏膜與皮膚性念珠菌病；布魯頓氏症候群；嬰兒期短暫性低 γ 球蛋白血症；維斯科特-奧爾德里奇症候群；共濟失調毛細管擴張症；與膠原病有關之自體免疫病症；風濕病；神經疾病；缺血再灌注病症；血壓反應降低；血管功能障礙；血管擴張；組織損傷；心血管缺血；痛覺過敏；大腦缺血；及伴有血管形成之疾病；過敏性過敏病症；絲球體腎炎；再灌注損傷；心肌或其他組織再灌注損傷；具有急性發炎組分之皮膚病；急性化膿性腦膜炎或其他中樞神經系統發炎病症；眼部及眼眶發炎病症；顆粒球輸注相關症候群；細胞激素誘發之毒性；急性嚴重發炎；慢性難治發炎；腎盂炎；肺硬化；糖尿病性視網膜病變；糖尿病性大動脈病症；動脈內增生；消化性潰瘍；瓣膜炎；及子宮內膜異位症。

在一個實施例中，製造抗體之方法可包含用VISTA抗原決定基免疫接種動物，移除該動物之脾臟且製備單細胞懸浮液，使脾臟細胞與骨髓瘤細胞融合，在雜交瘤選擇培養基中培養融合後細胞，培養所得雜交瘤，針對特異性抗體產生進行篩選，且選擇產生所需抗體之雜交瘤。

在另一實施例中，一種抗VISTA或其抗體片段，其利用包含以下之方法產生：用VISTA抗原決定基免疫接種動物，移除該動物之脾臟且製備單細胞懸浮液，使脾臟細胞與骨髓瘤細胞融合，在雜交瘤選擇培養基中培養融合後細胞，培養所得雜交瘤，針對特異性抗體產生進行篩選，且選擇產生所需抗體之雜交瘤。

在另一實施例中，抗VISTA或其抗體片段可為人類化、嵌合或單

鏈變異體。

在一個實施例中，經分離之VISTA拮抗劑可為抗體或其抗體片段、肽、配醣生物鹼、反義核酸、核酶、類視黃素、艾維米(avemir)、小分子或其任何組合。

在一個實施例中，治療或預防有需要之個體之發炎之方法可包含投與有效量之經分離之VISTA拮抗劑，其中該拮抗劑可為抗體或其抗體片段、肽、配醣生物鹼、反義核酸、核酶、類視黃素、艾維米、小分子或其任何組合。

在一個實施例中，治療或預防自體免疫疾病之方法可包含投與有效量之經分離之VISTA拮抗劑，其中該拮抗劑可為抗體或其抗體片段、肽、配醣生物鹼、反義核酸、核酶、類視黃素、艾維米、小分子或其任何組合。

在一個實施例中，治療發炎病症之方法可包含投與有效量之經分離之VISTA促效劑或拮抗劑，其中該促效劑或拮抗劑可為抗體或其抗體片段、肽、配醣生物鹼、反義核酸、核酶、類視黃素、艾維米、小分子或其任何組合。

在一個實施例中，治療移植物抗宿主疾病(GVHD)之方法可包含投與有效量之經分離之VISTA促效劑或拮抗劑，其中該促效劑或拮抗劑可為抗體或其抗體片段、肽、配醣生物鹼、反義核酸、核酶、類視黃素、艾維米、小分子或其任何組合。

在一個實施例中，治療患有過敏、發炎或自體免疫病症之個體之方法可包含投與有效量之經分離之VISTA促效劑或拮抗劑，其中該促效劑或拮抗劑可為抗體或其抗體片段、肽、配醣生物鹼、反義核酸、核酶、類視黃素、艾維米、小分子或其任何組合。

在一個實施例中，用於治療或預防有需要之個體之發炎的組合物可包含投與有效量之經分離之VISTA促效劑或拮抗劑，其中該促效

劑或拮抗劑可為抗體或其抗體片段、肽、配醣生物鹼、反義核酸、核酶、類視黃素、艾維米、小分子或其任何組合。

在一個實施例中，用於治療自體免疫疾病之組合物可包含投與有效量之經分離之VISTA促效劑或拮抗劑，其中該拮抗劑可為抗體或其抗體片段、肽、配醣生物鹼、反義核酸、核酶、類視黃素、艾維米、小分子或其任何組合。

在一個實施例中，用於治療發炎病症之組合物可包含投與有效量之經分離之VISTA促效劑或拮抗劑，其中該拮抗劑可為抗體或其抗體片段、肽、配醣生物鹼、反義核酸、核酶、類視黃素、艾維米、小分子或其任何組合。

在一個實施例中，用於治療移植物抗宿主疾病(GVHD)之組合物可包含投與有效量之經分離之VISTA促效劑或拮抗劑，其中該拮抗劑可為抗體或其抗體片段、肽、配醣生物鹼、反義核酸、核酶、類視黃素、艾維米、小分子或其任何組合。

在一個實施例中，用於治療患有過敏、發炎或自體免疫病症之個體的組合物可包含投與有效量之經分離之VISTA促效劑或拮抗劑，其中該拮抗劑可為抗體或其抗體片段、肽、配醣生物鹼、反義核酸、核酶、類視黃素、艾維米、小分子或其任何組合。

在一個實施例中，有效量之經分離之VISTA促效劑或拮抗劑用於製造供治療或預防發炎用之藥物的用途，其中該拮抗劑可為抗體或其抗體片段、肽、配醣生物鹼、反義核酸、核酶、類視黃素、艾維米、小分子或其任何組合。

在一個實施例中，有效量之經分離之VISTA促效劑或拮抗劑用於製造供治療自體免疫疾病用之藥物的用途，其中該拮抗劑可為抗體或其抗體片段、肽、配醣生物鹼、反義核酸、核酶、類視黃素、艾維米、小分子或其任何組合。

在一個實施例中，有效量之經分離之VISTA促效劑或拮抗劑用於製造供治療發炎病症用之藥物的用途，其中該拮抗劑可為抗體或其抗體片段、肽、配醣生物鹼、反義核酸、核酶、類視黃素、艾維米、小分子或其任何組合。

在一個實施例中，有效量之經分離之VISTA促效劑或拮抗劑用於製造供治療移植物抗宿主疾病(GVHD)用之藥物的用途，其中該促效劑或拮抗劑可為抗體或其抗體片段、肽、配醣生物鹼、反義核酸、核酶、類視黃素、艾維米、小分子或其任何組合。

在一個實施例中，有效量之經分離之VISTA促效劑或拮抗劑用於製造供治療過敏、發炎或自體免疫病症用之藥物的用途，其中該拮抗劑可為抗體或其抗體片段、肽、配醣生物鹼、反義核酸、核酶、類視黃素、艾維米、小分子或其任何組合。

在一個實施例中，偵測樣品中VISTA之方法可包含使樣品與抗VISTA抗體或抗體片段接觸及偵測抗VISTA抗體-VISTA結合物。在另一實施例中，樣品可為生物樣品。在另一實施例中，抗VISTA抗體結合SEQ ID NO: 2、3或5之胺基酸序列。

在另一實施例中，供治療、診斷或免疫調節使用之組合物可包含：經分離之可溶性VISTA(PD-L3)蛋白質或VISTA融合蛋白質(例如可溶性VISTA-Ig融合蛋白質或多聚VISTA蛋白質)，該VISTA融合蛋白質可包含較佳可與SEQ ID NO: 2、4或5中所述人類或鼠類VISTA(PD-L3)多肽、或其直系同源物或片段至少70%至90%一致的胺基酸序列，該胺基酸序列由與活體內調節VISTA之SEQ ID NO: 1或3特異性雜交之基因編碼；及醫藥學上可接受之載劑。在一些實施例中，可溶性或多聚VISTA蛋白質可直接或間接連接至異源(非VISTA)蛋白質上，或可由病毒載體或含有其的細胞(例如經轉染之免疫細胞，諸如T細胞)表現。

在一實施例中，經分離或重組之VISTA(PD-L3)多肽(例如蛋白質、多肽、肽或其片段或部分或至少50、100、150、200、250、275或300個胺基酸之片段或至少50、100、150、200、250、275或300個胺基酸之片段)。在一個實施例中，經分離之VISTA(PD-L3)多肽或VISTA(PD-L3)融合蛋白質包含以下域中之至少一者：信號肽域、IgV域、胞外域、跨膜域或細胞質域。

在一實施例中，VISTA(PD-L3)多肽包含以下域中之至少一者：信號肽域、IgV域、胞外域、跨膜域或細胞質域，且包含與SEQ ID NO: 2、4或5之胺基酸序列至少約71%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致的胺基酸序列。在另一實施例中，VISTA(PD-L3)多肽包含以下域中之至少一者：信號肽域、IgV域、胞外域、跨膜域、或細胞質域，且可具有VISTA(PD-L3)活性(如本文所述)。

在一個實施例中，經分離之VISTA蛋白質可包含多肽，該多肽與SEQ ID NO: 2、4、5、16至25、36或37之多肽序列之胞外域具有至少約90%序列一致性。在另一實施例中，多肽可與SEQ ID NO: 2、4、5、16至25、36或37之多肽序列具有至少約95%序列一致性。

在另一實施例中，VISTA多肽包含以下域中之至少一者：信號肽域、IgV域、胞外域、跨膜域或細胞質域，且可由核酸分子編碼，該核酸分子具有在嚴格雜交條件下與可包含SEQ ID NO: 1或3之核苷酸序列之核酸分子之互補序列雜交的核苷酸序列。

在另一實施例中，多肽之片段或部分可包含SEQ ID NO: 2、4或5之胺基酸序列，其中該片段包含SEQ ID NO: 2或4之胺基酸序列之至少15個胺基酸(亦即連續胺基酸)。在另一實施例中，VISTA(PD-L3)多肽包含以下或由以下組成：SEQ ID NO: 2、4或5之胺基酸序列或至少50、100、150、200、250、275或300個胺基酸之片段。在另一實施例

中，VISTA(PD-L3)多肽可由核酸分子編碼，該核酸分子可包含與SEQ ID NO: 1或3之核苷酸序列或其互補序列至少約70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致的核苷酸序列。一種VISTA(PD-L3)多肽，其可由核酸分子編碼，該核酸分子由在嚴格雜交條件下與可包含SEQ ID NO: 1或3之核苷酸序列之核酸分子之互補序列雜交的核苷酸序列組成。

在一個實施例中，VISTA多肽可為促效劑，其中其誘導抑制，尤其T細胞免疫之抑制。在另一實施例中，VISTA多肽可為拮抗劑，其中其干擾抑制。

本發明之多肽或其部分(例如其生物學活性部分)可以可操作地連接至非VISTA(PD-L3)多肽(例如異源胺基酸序列)上以形成融合多肽。

在一個實施例中，表現載體可包含編碼VISTA蛋白質之經分離之核酸，該VISTA蛋白質可與SEQ ID NO: 2、4或5中所述之人類或鼠類VISTA胺基酸序列或其片段或直系同源物或至少50、100、150、200、250、275或300個胺基酸之片段至少約70%至99%一致，其視情況可與編碼另一蛋白質(諸如Ig多肽(例如Fc區)或報導分子)之序列融合；且宿主細胞含有該等載體。

在另一實施例中，編碼VISTA多肽、較佳編碼可溶性融合蛋白質及多聚VISTA蛋白質之經分離之核酸分子，以及適用作引子或雜交探針以用於偵測編碼VISTA(PD-L3)之核酸的核酸片段。在一個實施例中，本發明之VISTA(PD-L3)核酸分子可與編碼SEQ ID NO: 1或3中VISTA(PD-L3)之核苷酸序列(例如核苷酸序列之整個長度)或其互補序列至少約70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致。

在另一實施例中，VISTA(PD-L3)核酸分子包含編碼多肽之核苷酸序列，該多肽具有具備與SEQ ID NO: 2、4或5之胺基酸序列之特定

一致性百分比的胺基酸序列。在一實施例中，VISTA(PD-L3)核酸分子包含編碼多肽之核苷酸序列，該多肽具有與SEQ ID NO: 2、4或5之胺基酸序列之整個長度或與其胞外域至少約71%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%一致的胺基酸序列。

在另一實施例中，經分離之核酸分子編碼人類或鼠類VISTA或其中保守區或功能域之胺基酸序列。在另一實施例中，核酸分子包含編碼多肽之核苷酸序列，該多肽可包含SEQ ID NO: 2、4或5之胺基酸序列。在另一實施例中，核酸分子之長度可為至少約50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150個核苷酸。在另一實施例中，核酸分子之長度可為至少約50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150個核苷酸，且編碼具有VISTA(PD-L3)活性或調節VISTA(PD-L3)功能之多肽。

另一實施例描寫核酸分子、較佳VISTA(PD-L3)核酸分子之特徵，該等核酸分子相對於編碼非VISTA(PD-L3)多肽之核酸分子特異性偵測VISTA(PD-L3)核酸分子。舉例而言，在一個實施例中，核酸分子之長度可為至少約880、900、950、1000、1050、1100、1150個核苷酸，且在嚴格條件下與編碼SEQ ID NO: 2、4或5中所示多肽之核酸分子或其互補序列雜交。在另一實施例中，核酸分子之長度可為至少20、30、40、50、100、150、200、250、300個核苷酸，且在嚴格條件下與編碼VISTA(PD-L3)片段之核酸分子雜交，該核酸分子例如可包含至少約20、30、40、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950個核苷酸長，包含編碼SEQ ID NO: 2、4或5中VISTA(PD-L3)多肽之SEQ ID NO: 1及3中所揭示之核酸序列或其互補序列之至少15個(亦即15個

連續)核苷酸，且在嚴格條件下與可包含SEQ ID NO: 1或3中所示核苷酸序列之核酸分子或其互補序列雜交。

在一個實施例中，核酸分子編碼可包含SEQ ID NO: 2或4或5之胺基酸序列之多肽的天然產生之對偶基因變異體，其中該核酸分子在嚴格條件下與可包含SEQ ID NO: 1或3之核酸分子之互補序列或其互補序列雜交。

本發明之另一實施例提供VISTA(PD-L3)核酸分子之經分離之反義(例如SEQ ID NO: 1或3之VISTA(PD-L3)核酸分子之編碼股之反義)。

本發明之另一態樣提供載體，該載體可包含VISTA(PD-L3)核酸分子。在某些實施例中，載體可為重組表現載體。

在另一實施例中，宿主細胞包含本發明之載體。在另一實施例中，宿主細胞包含本發明之核酸分子。本發明亦提供一種製造多肽、較佳VISTA(PD-L3)多肽之方法，其藉由以下方式進行：在適合之培養基中培養含有重組表現載體之本發明之宿主細胞，例如哺乳動物宿主細胞，諸如非人類哺乳動物細胞，從而可製造多肽。

在一個實施例中，靶向由可包含SEQ ID NO: 1或3之核酸序列之VISTA DNA轉錄之VISTA mRNA之siRNA分子。在另一實施例中，靶向由編碼SEQ ID NO: 2、4或5中所述之胺基酸序列之VISTA DNA轉錄之VISTA mRNA之siRNA分子。在另一實施例中，靶向VISTA之siRNA分子可包含SEQ ID NO: 38至67中之任一者之核酸序列。在另一實施例中，靶向VISTA之ORF或UTR區之siRNA分子可包含SEQ ID NO: 38至47中之任一者的胺基酸序列。在另一實施例中，僅靶向VISTA之UTR區之siRNA分子可包含SEQ ID NO: 48至57中之任一者的胺基酸序列。在另一實施例中，僅靶向VISTA之ORF區之siRNA分子可包含SEQ ID NO: 58至67中之任一者的胺基酸序列。在一個實施例

中，靶向VISTA之siRNA分子可由SEQ ID NO: 38至67中之任一者的核酸序列組成。在一個實施例中，靶向VISTA之ORF或UTR區之siRNA分子可由SEQ ID NO: 38至47中之任一者的胺基酸序列組成。在一個實施例中，僅靶向VISTA之UTR區之siRNA分子可由SEQ ID NO: 48至57中之任一者的胺基酸序列組成。在一個實施例中，僅靶向VISTA之ORF區之siRNA分子可由SEQ ID NO: 58至67中之任一者的胺基酸序列組成。

在另一實施例中，組合物可包含siRNA分子，該siRNA分子包含SEQ ID NO: 38至67中之任一者之核酸序列。在另一實施例中，組合物可包含siRNA分子，該siRNA分子由SEQ ID NO: 38至67中之任一者之核酸序列組成。在另一實施例中，組合物可為醫藥組合物。

在一個實施例中，治療自體免疫病症之方法可包含投與靶向VISTA之siRNA分子，該siRNA分子包含SEQ ID NO: 38至67中之任一者之核酸序列。在一個實施例中，治療自體免疫病症之方法可包含投與靶向VISTA之siRNA分子，該siRNA分子由SEQ ID NO: 38至67中之任一者之核酸序列組成。在另一實施例中，用於治療自體免疫病症之組合物可包含siRNA分子，該siRNA分子包含SEQ ID NO: 38至67中之任一者之核酸序列。在另一實施例中，用於治療自體免疫病症之組合物可包含siRNA分子，該siRNA分子由SEQ ID NO: 38至67中之任一者之核酸序列組成。在另一實施例中，包含SEQ ID NO: 38至67之核酸序列中之任一者之siRNA分子用於製造供治療自體免疫疾病用的藥物的用途。在另一實施例中，由SEQ ID NO: 38至67之核酸序列中之任一者組成之siRNA分子用於製造供治療自體免疫疾病用的藥物的用途。

在一個實施例中，治療發炎病症之方法可包含投與靶向VISTA之siRNA分子，該siRNA分子包含SEQ ID NO: 38至67中之任一者之核酸

序列。在一個實施例中，治療發炎病症之方法可包含投與靶向VISTA之siRNA分子，該siRNA分子由SEQ ID NO: 38至67中之任一者之核酸序列組成。在另一實施例中，用於治療發炎病症之組合物可包含siRNA分子，該siRNA分子包含SEQ ID NO: 38至67中之任一者之核酸序列。在另一實施例中，用於治療發炎病症之組合物可包含siRNA分子，該siRNA分子由SEQ ID NO: 38至67中之任一者之核酸序列組成。在另一實施例中，包含SEQ ID NO: 38至67之核酸序列中之任一者之siRNA分子用於製造供治療發炎疾病用之藥物的用途。在另一實施例中，由SEQ ID NO: 38至67之核酸序列中之任一者組成之siRNA分子用於製造供治療發炎疾病用的藥物的用途。

在一個實施例中，治療移植抗宿主疾病之方法可包含投與靶向VISTA之siRNA分子，該siRNA分子包含SEQ ID NO: 38至67中之任一者之核酸序列。在一個實施例中，治療移植抗宿主疾病之方法可包含投與靶向VISTA之siRNA分子，該siRNA分子由SEQ ID NO: 38至67中之任一者之核酸序列組成。在另一實施例中，用於治療移植抗宿主疾病之組合物可包含siRNA分子，該siRNA分子包含SEQ ID NO: 38至67中之任一者之核酸序列。在另一實施例中，用於治療移植抗宿主疾病之組合物可包含siRNA分子，該siRNA分子由SEQ ID NO: 38至67中之任一者之核酸序列組成。在另一實施例中，包含SEQ ID NO: 38至67之核酸序列中之任一者之siRNA分子用於製造供治療移植抗宿主疾病用的藥物的用途。在另一實施例中，由SEQ ID NO: 38至67之核酸序列中之任一者組成之siRNA分子用於製造供治療移植抗宿主疾病用的藥物的用途。

在一個實施例中，拮抗劑可特異性結合至VISTA(PD-L3)蛋白質上，該VISTA(PD-L3)蛋白質可包含SEQ ID NO: 2、4或5中所述之胺基酸序列或其變異體、片段或直系同源物。在一個實施例中，結合劑活

體外或活體內調節(促效或拮抗)VISTA活性。

在一個實施例中，VISTA拮抗劑可為VISTA配位體。在另一實施例中，VISTA配位體可為蛋白質。在另一實施例中，VISTA拮抗劑可為抗體或其抗體片段、肽、配醣生物鹼、反義核酸、核酶、類視黃素、艾維米、小分子或其任何組合。

在一個實施例中，VISTA拮抗劑可具有功能性質，包括(但不限於)調節VISTA(PD-L3)對免疫性之特定作用，諸如蛋白質對TCR活化之抑制作用、蛋白質對CD4 T細胞回應抗CD3增殖之抑制作用、同源CD4 T細胞之抗原特異性增殖反應之抑制、VISTA(PD-L3)對特定細胞激素(例如IL-2及 γ 干擾素)之表現之抑制作用。

在一個實施例中，拮抗劑，視情況為蛋白質拮抗劑，其特異性結合至VISTA多肽、多聚VISTA多肽或VISTA融合蛋白質。在另一實施例中，拮抗劑(視情況為蛋白質拮抗劑)可展現抗腫瘤或抗轉移活性。在另一實施例中，拮抗劑(視情況為蛋白質拮抗劑)可特異性結合殘基1至20、20至40、30至50、60至80、70至90、80至100或90至110中包含之抗原決定基。在另一實施例中，拮抗劑(視情況為蛋白質拮抗劑)可結合該VISTA蛋白質之IgV、主幹區、細胞質區或跨膜區中包含之抗原決定基。在另一實施例中，拮抗劑(視情況為蛋白質拮抗劑)可誘發以下活性中之至少一者：(a)上調細胞激素；(b)誘導T細胞擴增；(c)促進抗原特異性T細胞免疫；或(d)促進CD4+及/或CD8+ T細胞活化。

在另一實施例中，經分離之結合劑(較佳為抗體或抗體片段)可特異性結合至VISTA(PD-L3)蛋白質，該VISTA(PD-L3)蛋白質可包含SEQ ID NO: 2、4或5中所述之胺基酸序列或其變異體、片段或直系同源物。在一個實施例中，結合劑活體外或活體內調節(促效或拮抗)VISTA活性。在一個實施例中，結合劑可為促效性或拮抗性抗

VISTA抗體。

在一個實施例中，抗VISTA(PD-L3)抗體可具有功能性質，包括(但不限於)調節VISTA(PD-L3)對免疫性之特定作用，諸如蛋白質對TCR活化之抑制作用、蛋白質對CD4 T細胞回應抗CD3增殖之抑制作用、同源CD4 T細胞之抗原特異性增殖反應之抑制、VISTA(PD-L3)對特定細胞激素(例如IL-2及 γ 干擾素)之表現之抑制作用。

在另一實施例中，抗體(視情況為單株或多株抗體)可特異性結合包括人類VISTA多肽之VISTA(PD-L3)多肽。

在一個實施例中，一種經分離之抗體或其抗體片段，其特異性結合至VISTA多肽、多聚VISTA多肽或VISTA融合蛋白質。在另一實施例中，抗體或其抗體片段可展現抗腫瘤或抗轉移活性。在另一實施例中，抗體或其抗體片段可特異性結合殘基1至20、20至40、30至50、60至80、70至90、80至100或90至110中包含之抗原決定基上。在另一實施例中，抗體或其抗體片段可特異性結合該VISTA蛋白質之IgV、主幹區、細胞質區或跨膜區中包含之抗原決定基。在另一實施例中，抗體或其抗體片段可誘發以下活性中之至少一者：(a)上調細胞激素；(b)誘導T細胞擴增；(c)促進抗原特異性T細胞免疫；或(d)促進CD4+及/或CD8+ T細胞活化。在另一實施例中，抗體或片段可為重組的。在另一實施例中，抗體或片段可具有抗腫瘤活性。在另一實施例中，抗體片段可為Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、CDR、互補位或能夠結合抗原之抗體之部分。在另一實施例中，抗體可為嵌合、人類化、抗個體基因型、單鏈、雙功能或共特異性的。在另一實施例中，抗體或片段可直接或間接結合至標記、細胞毒性劑、治療劑或免疫抑制劑。在另一實施例中，標記可為化學發光標記、順磁標記、MRI對比劑、螢光標記、生物發光標記或放射性標誌。

在一個實施例中，本發明提供抗VISTA抗體及其抗體片段。在一

個實施例中，抗體片段為Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv及scFv片段。在一個實施例中，抗體或其抗體片段可包含Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、單鏈可變片段(scFv)、IgNAR、SMIP、駱駝抗體(camelbody)或奈米抗體。在另一實施例中，重組蛋白質可包含抗VISTA抗體之高變區且選擇性結合VISTA。在另一實施例中，抗體片段可選擇性結合VISTA，該VISTA可包含SEQ ID NO: 2、4或5之胺基酸序列。

另外，VISTA(PD-L3)多肽(或其生物學活性部分)或VISTA(PD-L3)分子之調節劑(例如抗VISTA抗體)可併入醫藥組合物中，該醫藥組合物視情況可包含醫藥學上可接受之載劑。

在另一實施例中，本發明提供一種疫苗，該疫苗可包含抗原及調節(增強或抑制)VISTA(PD-L3)活性之藥劑。在一實施例中，疫苗抑制VISTA(PD-L3)與其天然結合搭配物之間的相互作用。在另一實施例中，疫苗可包含抗原及抑制VISTA(PD-L3)與其天然結合搭配物之間的相互作用之藥劑。在另一實施例中，疫苗可包含抗原及促進VISTA(PD-L3)與其天然結合搭配物之間的相互作用之藥劑。在一個實施例中，疫苗包含賦形劑、佐劑或載劑。

在一個實施例中，套組可包含VISTA融合蛋白質。在另一實施例中，套組可包含多聚VISTA蛋白質。在另一實施例中，VISTA融合蛋白質或多聚VISTA蛋白質可直接或間接固定至固相支撐物上。在另一實施例中，固相支撐物可為珠粒、試管、薄片、培養皿或測試條帶。在另一實施例中，固相支撐物可為陣列。

在另一實施例中，免疫細胞可經活化，該活化可包含使免疫細胞與VISTA多肽、VISTA-Ig融合蛋白質或抗VISTA抗體接觸。在另一實施例中，免疫細胞可為T細胞、B細胞或抗原呈現細胞。根據本發明方法活化之免疫細胞可隨後離體擴增，且用於治療及預防各種疾病；例如已活體外選殖及擴增之人類T細胞維持其調節活性。在擴增

之前，T細胞來源可自個體(例如哺乳動物，諸如人類、犬、貓、小鼠、大鼠或其轉基因物種)獲得。T細胞可自許多來源獲得，包括周邊血液單核細胞、骨髓、淋巴結組織、臍帶血、胸腺組織、及來自感染部位之組織、脾臟組織、腫瘤或T細胞株。T細胞可自血液單元獲得，該血液單元使用許多熟練技工已知之技術(諸如FICOLL®分離)自個體中收集。

在另一實施例中，調節VISTA(PD-L3)活性之方法可包含使能夠表現VISTA(PD-L3)之細胞與調節VISTA(PD-L3)活性之藥劑(較佳為抗VISTA(PD-L3)抗體)接觸，使得細胞中之VISTA(PD-L3)活性可經調節。在一個實施例中，藥劑抑制VISTA(PD-L3)活性。在另一實施例中，藥劑刺激VISTA(PD-L3)活性。在另一實施例中，藥劑干擾或增強VISTA(PD-L3)多肽與其天然結合搭配物之間的相互作用。在一個實施例中，藥劑可為特異性結合至VISTA(PD-L3)多肽上之抗體。在另一實施例中，藥劑可為結合至VISTA(PD-L3)多肽上之肽、肽模擬物或其他小分子。

在另一實施例中，藥劑藉由調節VISTA(PD-L3)基因之轉錄、VISTA(PD-L3)mRNA之轉譯或VISTA(PD-L3)多肽之轉譯後修飾來調節VISTA(PD-L3)的表現。在另一實施例中，藥劑可為核酸分子，該核酸分子具有可與VISTA(PD-L3)mRNA或VISTA(PD-L3)基因之編碼股反義的核苷酸序列。在另一實施例中，藥劑可為靶向VISTA(PD-L3)mRNA之siRNA分子。

在一個實施例中，治療自體免疫病症或發炎病狀之方法可包含向個體投與可為VISTA(PD-L3)調節劑之藥劑。在一個實施例中，VISTA(PD-L3)調節劑可為VISTA(PD-L3)多肽，較佳為如下文所述之可溶性融合蛋白質或多聚VISTA蛋白質或抗VISTA抗體。在另一實施例中，VISTA(PD-L3)調節劑可為VISTA(PD-L3)核酸分子，例如在腺

病毒載體中。在另一實施例中，本發明進一步提供用調節免疫反應之另一藥劑治療個體。

在一個實施例中，調節免疫細胞上VISTA(PD-L3)與其天然結合搭配物之相互作用的方法可包含：使表現VISTA(PD-L3)之抗原呈現細胞與選自由VISTA(PD-L3)形式組成之群的藥劑、或調節VISTA(PD-L3)與其天然結合搭配物之相互作用的藥劑接觸，使得免疫細胞上VISTA(PD-L3)與其天然結合搭配物之相互作用可經調節；及評估VISTA與其天然結合搭配物之相互作用。在一個實施例中，調節VISTA(PD-L3)與其天然結合搭配物之相互作用之藥劑可為特異性結合至VISTA(PD-L3)上之抗體。在一個實施例中，VISTA(PD-L3)與其天然結合搭配物之相互作用可未經調節。在另一實施例中，VISTA(PD-L3)與其天然結合搭配物之相互作用可經下調。在一個實施例中，該方法進一步包含使免疫細胞或抗原呈現細胞與調節免疫反應之另一藥劑接觸。在一個實施例中，可活體外進行接觸之步驟。在另一實施例中，可活體內進行接觸之步驟。在一個實施例中，免疫細胞可選自由以下組成之群：T細胞、單核細胞、巨噬細胞、樹突狀細胞、B細胞及骨髓細胞。

在一個實施例中，抑制免疫細胞中之活化之方法可包含抑制細胞中之VISTA(PD-L3)的活性或表現，使得免疫細胞活化可經抑制。在一個實施例中，增強免疫細胞中之活化之方法可包含增強細胞中之VISTA(PD-L3)的活性或表現，使得免疫細胞活化可經增強。

在另一實施例中，上調免疫反應之方法可包含投與抑制免疫細胞上VISTA(PD-L3)與其天然結合搭配物之間的相互作用之藥劑。在一個實施例中，藥劑包含結合至VISTA(PD-L3)上且抑制VISTA(PD-L3)與其天然結合搭配物之間的相互作用之阻斷性抗體或小分子。在另一實施例中，該方法進一步包含向個體投與上調免疫反應之第二藥

劑。在另一實施例中，下調免疫反應之方法可包含投與刺激免疫細胞上VISTA(PD-L3)與其天然結合搭配物之間的相互作用之藥劑。

在一個實施例中，治療選自由腫瘤、病原性感染、發炎免疫反應或病狀(較佳為較不顯著之發炎病狀)或免疫抑制疾病組成之群的病狀之方法可包含投與有效量之VISTA多肽或VISTA-Ig融合蛋白質。特定實例包括多發性硬化症；甲狀腺炎；類風濕性關節炎；II型及I型糖尿病；及癌症，晚期及早期兩種形式，包括轉移性癌症(例如膀胱癌、卵巢癌、黑色素瘤、肺癌)，其中VISTA抑制有效抗腫瘤反應。可投與個體表現編碼抗VISTA抗體或VISTA融合蛋白質之核酸之細胞或病毒載體。

在一個實施例中，治療選自由移植、過敏、感染性疾病、癌症及發炎或自體免疫病症(例如發炎免疫病症)組成之群的病狀之方法可包含投與有效量之VISTA(PD-L3)蛋白質、結合劑或VISTA(PD-L3)拮抗劑或促效劑。在另一實施例中，可治療1型糖尿病、多發性硬化症、類風濕性關節炎、牛皮癬性關節炎、全身性紅斑性狼瘡症、風濕性疾病、過敏病症、哮喘、過敏性鼻炎、皮膚病症、腸胃障礙(諸如克羅恩氏病及潰瘍性結腸炎)、移植排斥反應、鏈球菌感染後及自體免疫腎衰竭、敗血性休克、全身性發炎反應症候群(SIRS)、成人呼吸窘迫症候群(ARDS)及蟄刺毒作用；自體發炎疾病以及退化性骨及關節疾病(包括骨關節炎、結晶性關節炎及囊炎及其他關節病)，可包含投與有效量之VISTA(PD-L3)蛋白質、結合劑或VISTA(PD-L3)或促效劑。另外，該等方法及組合物可包含有效量之VISTA(PD-L3)蛋白質、結合劑或VISTA(PD-L3)拮抗劑或促效劑，其可用於治療肌腱炎、韌帶炎及創傷性關節損傷。在一個實施例中，藥劑包含刺激VISTA(PD-L3)與其天然結合搭配物之間的相互作用之抗體或小分子。在另一實施例中，該方法進一步包含向個體投與下調免疫反應之

第二藥劑，諸如PD-L1、PD-L2或CTLA-4融合蛋白質或對其具有特異性之抗體。

在實施例中，主題VISTA(PD-L3)蛋白質、核酸及對VISTA(PD-L3)具有特異性之配位體(較佳為對VISTA(PD-L3)功能具有所需作用之抗體)可用於治療包括(但不限於)以下之病狀：癌症、自體免疫疾病、過敏、發炎病症或感染且更特定言之為免疫系統病症(諸如嚴重聯合免疫缺陷)、多發性硬化症、全身性紅斑性狼瘡症、I型糖尿病、淋巴增生症候群、發炎性腸病、過敏症、哮喘、移植物抗宿主疾病及移植排斥反應；對傳染性病原體(諸如細菌及病毒)之免疫反應；及免疫系統癌症(諸如淋巴瘤及白血病)。在一個實施例中，調節VISTA活性之藥劑可緩解T細胞耗盡且增強對感染性疾病之免疫性。

在一個實施例中，治療有需要之患者之癌症的方法可包含投與有效量之VISTA蛋白質、多聚VISTA蛋白質、VISTA融合蛋白質(視情況為VISTA-Ig融合蛋白質)，其中該VISTA蛋白質、多聚VISTA蛋白質及/或VISTA融合蛋白質藉由抑制由骨髓樹突狀抑制細胞表現之VISTA之免疫抑制活性來增強抗腫瘤免疫性。在另一實施例中，可發現患者在治療之前在免疫細胞上表現升高含量之VISTA蛋白質。

在一個實施例中，增強放射療法、化學療法或抗癌生物製劑之功效的方法可包含在包括投與放射療法、化學療法或抗癌生物製劑之治療方案中投與有效量之VISTA蛋白質、多聚VISTA蛋白質、VISTA融合蛋白質(視情況為VISTA-Ig融合蛋白質)。在另一實施例中，患者在治療之前可能患有並不響應該放射療法、化學療法或抗癌生物製劑之癌症。

在一個實施例中，治療膀胱癌、卵巢癌、或黑色素瘤癌症之方法可包含投與有效量之VISTA蛋白質、多聚VISTA蛋白質、VISTA融合蛋白質(視情況為VISTA-Ig融合蛋白質)，其中該癌症為早期(非轉移

性)或轉移性形式，且VISTA-Ig阻斷與其受體的相互作用。

在一個實施例中，調節免疫細胞反應之方法可包含使免疫細胞與有效量之VISTA蛋白質、多聚VISTA蛋白質、VISTA融合蛋白質(視情況為VISTA-Ig融合蛋白質)在初級信號存在下接觸，以使免疫細胞之反應經調節。

在一個實施例中，調節有需要之個體之Treg細胞的方法可包含投與有效量之VISTA蛋白質、多聚VISTA蛋白質、VISTA融合蛋白質(視情況為VISTA-Ig融合蛋白質)。

在一個實施例中，釋放VISTA對免疫性之抑制作用的方法可包含投與有效量之VISTA蛋白質、多聚VISTA蛋白質、VISTA融合蛋白質(視情況為VISTA-Ig融合蛋白質)。在另一實施例中，可發現所治療之患者在治療之前表現升高含量之VISTA。在另一實施例中，可在治療之後監測VISTA含量，以便評估免疫反應可能已經增強。

在一個實施例中，增強有需要之個體之細胞介導之免疫性的方法可包含投與有效量之VISTA蛋白質、多聚VISTA蛋白質、VISTA融合蛋白質(視情況為VISTA-Ig融合蛋白質)。

在一個實施例中，調節免疫細胞反應之方法可包含使免疫細胞與有效量之VISTA融合蛋白質(視情況為VISTA-Ig融合蛋白質)或多聚VISTA蛋白質在初級信號存在下接觸，以使免疫細胞之反應經調節。在另一實施例中，可活體外、活體內或離體進行接觸。

在一個實施例中，在T細胞與源於骨髓之APC之間的同源相互作用期間調節T細胞反應的方法可包含投與有效量之VISTA融合蛋白質(視情況為VISTA-Ig融合蛋白質)或多聚VISTA蛋白質。

在一個實施例中，誘發有需要之個體之免疫抑制的方法可包含投與有效量之VISTA融合蛋白質(視情況為VISTA-Ig融合蛋白質)或多聚VISTA蛋白質。

在另一實施例中，減少免疫細胞活化之方法可包含向個體投與有效量之 VISTA(PD-L3) 多肽或 VISTA-Ig 融合蛋白質，其中該 VISTA(PD-L3) 多肽或 VISTA-Ig 融合蛋白質充當抑制性信號以用於減少免疫細胞活化。在一個實施例中，免疫細胞活化經抑制。在另一實施例中，免疫細胞活化經明顯減少。在一個實施例中，抑制性信號結合至免疫細胞上之抑制性受體(例如 CTLA-4 或 PD-1)上，藉此拮抗結合至活化受體上之初級信號(例如經由 TCR、CD3、BCR 或 Fc 多肽)。在一個實施例中，VISTA 多肽或 VISTA-Ig 融合蛋白質抑制第二信使產生；抑制免疫細胞增殖；抑制免疫細胞中之效應功能(例如減少吞噬作用、減少抗體產生、減小細胞毒性、免疫細胞無法製造介體(細胞激素(例如 IL-2)及/或過敏反應之介體)或機能之發展)。

在一個實施例中，初級信號可為結合 TCR 且引發初級刺激信號之配位體(例如 CD3 或抗 CD3)。TCR 配位體包括(但不限於)抗 CD3 抗體 OKT3 及抗 CD3 單株抗體 G19-4。在一個實施例中，初級信號可經由其他機制傳遞至 T 細胞，該等其他機制包括蛋白激酶 C 活化劑(諸如佛波醇酯(phorbol ester)(例如佛波醇豆蔻酸酯乙酸酯))及鈣離子載體(例如離子黴素，其使細胞質鈣濃度升高)。使用該等藥劑繞過 TCR/CD3 複合物，但向 T 細胞傳遞刺激信號。充當初級信號之其他藥劑可包括天然及合成配位體。天然配位體可包含存在或不存在肽之 MHC。其他配位體可包括(但不限於)肽、多肽、生長因子、細胞激素、趨化激素、醣肽、可溶性受體、類固醇、激素、有絲分裂原(例如 PHA)、或其他超級抗原、肽-MHC 四聚體及可溶性 MHC 二聚體。

在另一實施例中，偵測生物樣品中 VISTA(PD-L3) 核酸分子、蛋白質或多肽之存在的方法包含使生物樣品與能夠偵測 VISTA(PD-L3) 核酸分子、蛋白質或多肽之藥劑接觸，使得可在生物樣品中偵測 VISTA(PD-L3) 核酸分子、蛋白質或多肽之存在。此 VISTA(PD-L3) 表

現可用於偵測某些疾病部位，諸如發炎部位。

在另一實施例中，偵測生物樣品中VISTA(PD-L3)活性之存在的方法包含使生物樣品與能夠偵測VISTA(PD-L3)活性指示物之藥劑接觸，使得可在生物樣品中偵測VISTA(PD-L3)活性之存在。在另一實施例中，偵測生物樣品中可溶性VISTA之方法可包含使生物樣品與能夠偵測VISTA(PD-L3)活性指示物之藥劑接觸，使得可在生物樣品中偵測VISTA(PD-L3)活性之存在。在另一實施例中，偵測生物樣品中可溶性VISTA之方法可包含使生物樣品與能夠結合VISTA(PD-L3)(視情況為抗VISTA抗體或抗體片段)之藥劑接觸，及偵測VISTA-抗體複合物之存在。在另一實施例中，量測可為定量的視情況選用之西方墨點(Western blot)密度測定法、比色法或螢光法。

在另一實施例中，鑑別VISTA基因中存在或不存在基因改變之診斷分析包含：獲得可能包含核酸之樣品及分析該樣品，其中該基因改變之特徵在於以下中之至少一者(i)編碼VISTA(PD-L3)多肽之基因之異常修飾或突變；(ii)基因之誤調節；及(iii) VISTA(PD-L3)多肽之異常轉譯後修飾，其中該基因之野生型形式編碼具有VISTA(PD-L3)活性之多肽。在一個實施例中，核酸可為DNA或mRNA。

在一個實施例中，選擇具有作為治療性或免疫調節藥劑之潛在用途之抗VISTA抗體的方法可包含：(a)用VISTA蛋白質、免疫原性片段或其結合物免疫接種免疫細胞或宿主；(b)選擇表現特異性結合至VISTA上之抗體之淋巴樣細胞；(c)選擇抗VISTA抗體或其抗體片段；(d)針對抑制或增強VISTA(PD-L3)或VISTA之以下活性中之至少一者的能力篩選該等抗VISTA抗體或其抗體片段：(i)抑制T細胞活化或分化；(ii)抑制CD4⁺或CD8⁺ T細胞增殖，或抑制T細胞產生細胞激素；(iii)其中具有(d)中活性中之至少一者之抗體或其抗體片段具有作為治療性或免疫調節藥劑之潛在用途。

在其他實施例中，選擇具有所需功能性質之抗VISTA(PD-L3)抗體的方法可包含：基於所需功能性質(包括調節VISTA(PD-L3)對免疫性之特定作用，諸如蛋白質對TCR活化之抑制作用、蛋白質對CD4 T細胞回應抗CD3增殖之抑制作用、同源CD4 T細胞之抗原特異性增殖反應之抑制、VISTA(PD-L3)對特定細胞激素(例如IL-2及 γ 干擾素)之表現之抑制作用)篩選針對此蛋白質或VISTA(PD-L3)-Ig融合蛋白質製造之單株抗體組；及選擇所需抗體。

在另一實施例中，鑑別結合至VISTA(PD-L3)多肽或調節VISTA(PD-L3)多肽活性之化合物的方法可包含：提供可包含具有VISTA(PD-L3)活性之VISTA(PD-L3)多肽的指示組合物，使該指示組合物與測試化合物接觸，及測定測試化合物對指示組合物中VISTA(PD-L3)活性之作用，從而鑑別調節VISTA(PD-L3)多肽活性之化合物。

在另一實施例中，篩選調節VISTA(PD-L3)活性之化合物之基於細胞之分析可包含：使表現VISTA(PD-L3)目標分子之細胞與測試化合物接觸，及測定測試化合物調節VISTA(PD-L3)目標分子活性之能力。

在另一實施例中，篩選調節VISTA(PD-L3)與目標分子結合之化合物之無細胞分析可包含：使VISTA(PD-L3)多肽或其生物學活性部分與測試化合物接觸，及測定測試化合物結合至VISTA(PD-L3)多肽或其生物學活性部分上之能力。

在另一實施例中，鑑別調節VISTA(PD-L3)在第一及第二抗原濃度下對T細胞活化或細胞激素產生之作用之化合物(例如抗VISTA(PD-L3)抗體)的方法可包含：使表現VISTA(PD-L3)目標分子之T細胞與測試化合物在第一抗原濃度下接觸，測定測試化合物在第一抗原濃度下調節T細胞增殖或細胞激素產生之能力，使表現VISTA(PD-L3)目標分

子之T細胞與測試化合物在第二抗原濃度下接觸，及測定測試化合物在第二抗原濃度下調節T細胞增殖或細胞激素產生之能力，藉此鑑別在第一及第二抗原濃度下調節T細胞活化或細胞激素產生之化合物。

在其他實施例中，抗VISTA(PD-L3)抗體及VISTA(PD-L3)蛋白質組可基於何種抗VISTA抗體抑制或促進VISTA(PD-L3)對CD4+及CD8+T細胞分化、增殖及/或細胞激素之作用而篩選及選擇。在另一實施例中，已經工程化從而表現人類VISTA之小鼠可用於測試抗人類VISTA抗體在調節免疫性方面之功能。

在另一實施例中，治療移植物抗宿主疾病(GVHD)之方法可包含投與有效量之VISTA融合蛋白質(視情況為VISTA-Ig融合蛋白質)或多聚VISTA蛋白質。在另一實施例中，治療移植物抗宿主疾病、急性移植物抗宿主疾病、慢性移植物抗宿主疾病、與幹細胞移植相關之急性移植物抗宿主疾病、與幹細胞移植相關之慢性移植物抗宿主疾病、與骨髓移植相關之急性移植物抗宿主疾病、與同種異體造血幹細胞移植(HSCT)相關之急性移植物抗宿主疾病或與骨髓移植相關之慢性移植物抗宿主疾病的方法可包含投與有效量之VISTA融合蛋白質(視情況為VISTA-Ig融合蛋白質)或多聚VISTA蛋白質。

在另一實施例中，本發明提供經分離或重組之VISTA-Ig融合蛋白質或編碼其的核酸，該VISTA-Ig融合蛋白質包含(i)至少一個VISTA多肽，該至少一個VISTA多肽包含與人類或鼠類VISTA之胞外區或其至少50個胺基酸之片段的至少80%序列一致性；(ii)至少一個連接肽，該至少一個連接肽包含至少5個胺基酸；及(iii)至少一個Ig蛋白，較佳為Ig Fc區或其片段或變異體，其中該肽連接子介於VISTA多肽與Ig蛋白之間，且其中所得VISTA-Ig融合蛋白質與缺乏該連接子但在其他方面均相同之融合蛋白質相比，該所得VISTA-Ig融合蛋白質活體內誘發的免疫抑制活性更強。在例示性實施例中，經分離之VISTA融合蛋白

質可包含：(i)至少一個多肽，該至少一個多肽與SEQ ID NO: 2、4、5、16至25、36或37之多肽序列之胞外域或其包含至少50個胺基酸之片段具有至少約80%序列一致性；及(ii)至少一個連接子，該至少一個連接子包含至少5個胺基酸；及(iii)至少一個Ig Fc蛋白或其片段，其中該連接子介於VISTA多肽與Ig Fc蛋白之間，且所得VISTA-Ig融合蛋白質與缺乏該連接子但在其他方面均相同之融合蛋白質相比，該所得VISTA-Ig融合蛋白質活體內誘發的免疫抑制活性更強。

在另一例示性實施例中，前述VISTA-Ig融合體可包含至少一個多肽，該至少一個多肽與人類或鼠類VISTA之胞外域或其至少50、100、150、200、250或300個胺基酸之片段具有至少90%或95%序列一致性。

在另一例示性實施例中，前述VISTA-Ig融合蛋白質將包含人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc區或其片段或變異體，視情況含有至少一個Fc區，該至少一個Fc區包含調節(增加、改變或減少)補體結合及/或FcR結合或效應功能之一或多個修飾。

在其他例示性實施例中，前述VISTA-Ig融合體可包含介於VISTA多肽與Ig多肽之間的至少一個連接子，該連接子包含至少4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、或15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、50個或50個以上甘胺酸胺基酸殘基，且該融合體可包含至少2、3或4個多肽，該等多肽各自與SEQ ID NO: 2、4、5、16至25、36或37之多肽序列之胞外域或其包含至少50、100、150、200、250或300個胺基酸之片段具有至少約80%序列一致性。

在其他例示性實施例中，前述VISTA-Ig融合體可包含介於VISTA多肽與Ig多肽之間的至少一個連接子，其中佔連接子之至少30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%之連接子殘基之至少30%、

40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或所有包含甘胺酸及/或絲胺酸殘基，且較佳包含至少一個人類或鼠類Fc區(例如人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc區或鼠類IgG2a或IgG2b恆定區或Fc區)，該Fc區視情況經突變以調節(增加或減少)或改變糖基化、FcR結合、補體結合或效應功能。

在其他例示性實施例中，前述VISTA-Ig融合體可包含介於VISTA多肽與Ig多肽之間的至少一個連接子，其中該VISTA-Ig融合蛋白質在偵測T細胞增殖之分析中與缺乏該至少一個連接子但在其他方面均相同的VISTA-Ig融合蛋白質相比展現多至少30%免疫抑制活性。

在其他例示性實施例中，前述VISTA-Ig融合體可包含介於VISTA多肽與Ig多肽之間的至少一個連接子，其中該VISTA-Ig融合蛋白質在偵測T細胞增殖之分析中與缺乏該至少一個連接子但在其他方面均相同的VISTA-Ig融合蛋白質相比展現多至少40%免疫抑制活性。

在其他例示性實施例中，前述VISTA-Ig融合體可包含介於VISTA多肽與Ig多肽之間的至少一個連接子，其中該VISTA-Ig融合蛋白質在偵測T細胞增殖之分析中與缺乏該至少一個連接子但在其他方面均相同的VISTA-Ig融合蛋白質相比展現多至少50%免疫抑制活性。

在其他例示性實施例中，前述VISTA-Ig融合體可包含介於VISTA多肽與Ig多肽之間的至少一個連接子，其中該VISTA-Ig融合蛋白質在偵測T細胞增殖之分析中與缺乏該至少一個連接子但在其他方面均相同的VISTA-Ig融合蛋白質相比展現多至少60%免疫抑制活性。

在其他例示性實施例中，前述VISTA-Ig融合體可包含介於VISTA多肽與Ig多肽之間的至少一個連接子，其中該VISTA-Ig融合蛋白質在偵測T細胞增殖之分析中與缺乏該至少一個連接子但在其他方面均相同的VISTA-Ig融合蛋白質相比展現多至少70%免疫抑制活性。

在其他例示性實施例中，前述VISTA-Ig融合體可包含介於VISTA

多肽與Ig多肽之間的至少一個連接子，其中該VISTA-Ig融合蛋白質在偵測T細胞增殖之分析中與缺乏該至少一個連接子但在其他方面均相同的VISTA-Ig融合蛋白質相比展現多至少30%免疫抑制活性。

在其他例示性實施例中，前述VISTA-Ig融合體可包含介於VISTA多肽與Ig多肽之間的至少一個連接子，其中該VISTA-Ig融合蛋白質在偵測T細胞增殖之分析中與缺乏該至少一個連接子但在其他方面均相同的VISTA-Ig融合蛋白質相比展現多至少80%免疫抑制活性。

在其他例示性實施例中，前述VISTA-Ig融合體可包含介於VISTA多肽與Ig多肽之間的至少一個連接子，其中該VISTA-Ig融合蛋白質在偵測T細胞增殖之分析中與缺乏該至少一個連接子但在其他方面均相同的VISTA-Ig融合蛋白質相比展現多至少90%免疫抑制活性。

在其他例示性實施例中，前述VISTA-Ig融合體可包含介於VISTA多肽與Ig多肽之間的至少一個連接子，其中該VISTA-Ig融合蛋白質在偵測T細胞增殖之分析中與缺乏該至少一個連接子但在其他方面均相同的VISTA-Ig融合蛋白質相比展現多至少100%免疫抑制活性。

在其他例示性實施例中，前述VISTA-Ig融合體可包含介於VISTA多肽與Ig多肽之間的至少一個連接子，其中該VISTA-Ig融合蛋白質在偵測T細胞增殖之分析中與缺乏該至少一個連接子但在其他方面均相同的VISTA-Ig融合蛋白質相比展現多至少1.1至2倍免疫抑制活性。

在其他例示性實施例中，前述VISTA-Ig融合體可包含介於VISTA多肽與Ig多肽之間的至少一個連接子，其中該VISTA-Ig融合蛋白質在偵測T細胞增殖之分析中與缺乏該至少一個連接子但在其他方面均相同的VISTA-Ig融合蛋白質相比展現多至少2至3倍免疫抑制活性。

在其他例示性實施例中，前述VISTA-Ig融合體可包含介於VISTA多肽與Ig多肽之間的至少一個連接子，其中該VISTA-Ig融合蛋白質在偵測T細胞增殖之分析中與缺乏該至少一個連接子但在其他方面均相

同的VISTA-Ig融合蛋白質相比展現多至少3至4倍免疫抑制活性。

在其他例示性實施例中，前述VISTA-Ig融合體可包含介於VISTA多肽與Ig多肽之間的至少一個連接子，其中該VISTA-Ig融合蛋白質在偵測T細胞增殖之分析中與缺乏該至少一個連接子但在其他方面均相同的VISTA-Ig融合蛋白質相比展現多至少4至5倍、6至7倍、8至9倍、9至10倍或至少10倍免疫抑制活性。

在其他例示性實施例中，前述VISTA-Ig融合體包含至少一個VISTA多肽，該至少一個VISTA多肽與SEQ ID NO: 2、4、5、16至25、36或37之多肽序列或包含至少50、75、100、125、150、175、200、225、250、275或300個胺基酸之片具有至少約90%至95%序列一致性；視情況含有至少一個IgG、IgG1、IgG2、IgG2a、IgM、IgE或IgA多肽，例如包含人類IgG1之恆定區及鉸鏈區之至少一個Ig蛋白，且視情況包含包含胺基酸殘基32至190之VISTA的至少一個胞外域或包含胺基酸16至194之VISTA的胞外IgV域。

在其他例示性實施例中，前述VISTA-Ig融合體包含至少兩個複本之VISTA蛋白質或其包含至少50、75、100、125、150、175、200、225、250、275或300個胺基酸之片段及至少兩個複本之VISTA蛋白質及IgG1 Fc或非FcR結合IgG1。

在其他例示性實施例中，前述VISTA-Ig融合體包含至少三個、四個、五個、六個、七個、八個或八個以上複本之VISTA蛋白質或其包含至少50、75、100、125、150、175、200、225、250、275或300個胺基酸之片段及至少一個IgG1或IgG2a。

在其他例示性實施例中，前述VISTA-Ig融合體包含至少三個、四個、五個、六個、七個、八個或八個以上複本之VISTA蛋白質或其包含至少50、75、100、125、150、175、200、225、250、275或300個胺基酸之片段及至少一個IgG1或IgG2a。

在其他例示性實施例中，前述VISTA-Ig融合體包含連接至寡聚合域之N端上之至少一個VISTA之胞外域或片段，例如其中寡聚合域為GCN4、COMP、SNARE、CMP、MAT、含有LLR之1 NLRC、NOD2核苷酸結合NLRC2、含有LRR之1 NLRC、NOD2核苷酸結合NLRC2或PSORAS1。

在其他例示性實施例中，前述VISTA-Ig融合體表現於重組細胞(諸如酵母、細菌、真菌、昆蟲、鳥類、爪蟾或哺乳動物細胞)中。

在其他例示性實施例中，前述VISTA-Ig融合體與PD-1、PD-L1、PD-2、PD-L2蛋白質或融合蛋白質或特異性結合前述中之任一者的抗體或抗體片段組合或共同投與。

在其他例示性實施例中，前述VISTA-Ig融合體含於醫藥學上可接受之組合物中，該醫藥學上可接受之組合物含有治療有效量之本發明之VISTA-Ig融合蛋白質或細胞，該醫藥學上可接受之組合物可經採納以用於非經腸、靜脈內、皮下、經皮、經口、肌肉內、陰道內、頰內、肛門或經鼻投與。

在例示性實施例中，此等組合物用於治療或預防諸如先前鑑別之不同過敏、發炎或自體免疫病症。較佳實例包括GVHD；狼瘡病狀，諸如SLE、藥物誘導之狼瘡；牛皮癬性類風濕性關節炎；及多發性硬化症；呼吸過敏性及發炎病狀，諸如哮喘、鼻炎、血管炎及徹奇-斯全司症候群。

在一個實施例中，移植物抗宿主疾病(GVHD)可為移植物抗宿主疾病(GVHD)、急性移植物抗宿主疾病、慢性移植物抗宿主疾病、與幹細胞移植相關之急性移植物抗宿主疾病、與幹細胞移植相關之慢性移植物抗宿主疾病、與骨髓移植相關之急性移植物抗宿主疾病、與同種異體造血幹細胞移植(HSCT)相關之急性移植物抗宿主疾病或與骨髓移植相關之慢性移植物抗宿主疾病。在另一實施例中，所治療之患

者具有移植物抗宿主疾病(GVHD)之至少一種症狀，視情況其中該患者展現急性GVHD，包括(但不限於)腹痛、腹部抽筋、腹瀉、發熱、黃疸、皮疹、嘔吐及體重損失。在另一實施例中，所治療之患者具有慢性移植物抗宿主疾病(GVHD)之至少一種症狀，包括(但不限於)乾眼症、口乾燥、脫髮、肝炎、肺病症、胃腸道病症、皮疹及皮膚增厚。在另一實施例中，患者已或將接受同種異體幹細胞或骨髓移植。在另一實施例中，患者已或將接受自體性幹細胞或骨髓移植。

【圖式簡單說明】

圖 1A、**圖 1B**、**圖 1C**、**圖 1D**及**圖 1E**描繪序列分析。**(A)**鼠類 VISTA(PD-L3)之全長胺基酸序列(SEQ ID NO: 17)。**(B)**鼠類 VISTA(PD-L3)(SEQ ID NO: 25)與所選B7家族配位體(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)及B7-H4(B7S1)(SEQ ID NO: 29))之間的胞外Ig域之胺基酸序列比對。**(C)** VISTA(PD-L3)(SEQ ID NO: 30)Ig域與B7家族受體(包括PD-1(SEQ ID NO: 31)、CTLA-4(SEQ ID NO: 32)、CD28(SEQ ID NO: 33)、BTLA(SEQ ID NO: 34)及ICOS(SEQ ID NO: 35))之比對。Ig-v域，「.」；Ig-c域，「____」。比對使用MUSCLE演算法(利用對數期望值之多重序列比較)進行。**(D)** VISTA(PD-L3)與其他B7家族配位體及受體之間的Ig-V域之序列一致性(%)使用ClustalW2程式計算。**(E)**序列比對展示人類(SEQ ID NO: 37)與鼠類 VISTA(PD-L3)(SEQ ID NO: 36)之間的序列同源性。相同殘基畫黑色陰影。高度保守及半保守殘基分別畫深及淺之灰色陰影。

圖 2描繪小鼠 VISTA(PD-L3)與其他免疫球蛋白(Ig)超家族成員之系統發生分析。VISTA(PD-L3)及其他Ig超家族成員(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及

BTN1A1)之全長序列使用PhyML演算法(系統發生最大似然法)分析。分支距離展示在樹分支接合點處。

圖 3A 、 圖 3B 、 圖 3C 、 圖 3D 、 圖 3E 、 圖 3F 及 圖 3G 描繪 VISTA(PD-L3)之組織表現及造血細胞表現模式**A.** 來自小鼠組織之全長 VISTA(PD-L3)之 RT-PCR。泳道：(1)肌肉(2)心臟(3)眼睛(4)胸腺(5)脾臟(6)小腸(7)腎臟(8)肝臟(9)腦(10)乳腺(11)肺(12)卵巢(13)骨髓。**B.** 來自純化之造血細胞類型之全長 VISTA(PD-L3)之 RT-PCR。泳道(1)腹膜巨噬細胞(2)脾臟 CD11b⁺單核細胞(3)脾臟 CD11c⁺ DC(4)脾臟 CD4⁺ T細胞(5)脾臟 CD8⁺ T細胞(6)脾臟 B細胞。**C-E.** 來自胸腺及脾臟之脾臟 CD4⁺及 CD8⁺ T細胞(**C**)、CD11b⁺單核細胞(**D**)及來自脾臟及腹膜腔之 CD11c⁺ DC 子集(**E**)上 VISTA(PD-L3)表現之流動式細胞測量術分析。**(F)**亦分析脾臟 B細胞、NK細胞及顆粒球。**(G)**來自不同組織部位(包括腸系膜 LN、周邊 LN、脾臟、血液及腹膜腔)之造血細胞上 VISTA(PD-L3)之差異表現。展示來自至少3個獨立實驗之代表資料。

圖4描繪 VISTA(新穎且在結構上不同的Ig超家族抑制性配位體)，其胞外域帶有與如抗原呈現細胞上展示之B7家族配位體PD-L1以及其他CD及B7家族成員的最高同源性。VISTA具有93 aa細胞質域，除可能的蛋白激酶C結合位點之外，其不具有明顯的信號轉導基元。

圖5描繪 VISTA(PD-L3)倉鼠單株抗體之特異性。過度表現PD-L1或融合至RFP上之 VISTA(PD-L3)之小鼠EL4細胞株使用來自雜交瘤培養物之上清液染色且利用流動式細胞測量術分析。展示兩個代表性陽性純系8D8及6E7。

圖6描繪活體外培養之脾臟細胞上 VISTA(PD-L3)表現與其他B7家族配位體之比較。比較造血細胞類型(包括CD4⁺ T細胞、CD11b⁺高單核細胞及CD11c⁺ DC)上 VISTA(PD-L3)及其他B7家族配位體(亦即PD-L1、PD-L2、B7-H3及B7-H4)之表現。在伴有或不伴有活化之情況

下，將細胞新鮮分離或活體外培養24小時。CD4⁺ T細胞用結合盤之 α CD3(5 μ g/ml)活化，CD11b高單核細胞及CD11c⁺ DC用IFN α (20 ng/ml)及LPS(200 ng/ml)活化。展示來自三個獨立實驗之代表性結果。

圖7A及圖7B描繪在免疫接種期間VISTA(PD-L3)及其他B7家族配位體之活體內表現模式之比較。DO11.10 TCR轉殖基因小鼠在側腹上用在完全弗氏佐劑(CFA)中乳化之雞卵白蛋白(OVA)免疫接種。免疫接種後24小時收集引流及非引流淋巴結細胞，且針對VISTA(PD-L3)、PD-L1及PD-L2之表現利用流動式細胞測量術進行分析。展示來自至少四個獨立實驗之代表性結果。**(A)**表現較高含量VISTA(PD-L3)之CD11b⁺細胞之群體在免疫接種後24小時下用CFA/OVA而非用單獨CFA在引流淋巴結內誘導。此等細胞為F4/80⁺巨噬細胞及CD11c⁺樹突狀細胞之混合表型。**(B)**在免疫接種後24小時下分析CD11b高單核細胞、CD11c⁺ DC及CD4⁺ T細胞上VISTA(PD-L3)、PD-L1及PD-L2之表現。

圖8描繪回應於免疫接種，活化CD4⁺ T細胞、CD11b⁺及CD11c⁺細胞上VISTA(PD-L3)表現之損失。DO11.10小鼠在側腹上用在完全弗氏佐劑(CFA)中乳化之雞卵白蛋白(OVA)免疫接種。免疫接種後48小時收集引流及非引流淋巴結細胞，且VISTA(PD-L3)表現利用流動式細胞測量術進行分析。展示來自2個獨立實驗之代表性結果。

圖9A、圖9B、圖9C及圖9D描繪固定化之VISTA(PD-L3)-Ig融合蛋白質抑制CD4⁺及CD8⁺ T細胞增殖。**(A)** CFSE標記之CD4⁺及CD8⁺ T細胞在具有或不具有共吸附之VISTA(PD-L3)-Ig之情況下利用結合盤之 α CD3刺激。CFSE-低細胞之百分比經定量且展示於**(B)**中。**(C)**來自PD-1 ko小鼠之CD4⁺ T細胞亦由VISTA(PD-L3)-Ig抑制。**(D)** VISTA(PD-L3)-Ig介導之抑制為持久的且可起作用較晚。CD4⁺ T細胞

在VISTA(PD-L3)-Ig或對照-Ig存在下活化72小時(i)或24小時(ii、iii及iv)。收穫24小時預活化之細胞，且在特定條件下再刺激48小時。在72小時培養結束時分析細胞增殖。(ii)用VISTA(PD-L3)-Ig預活化且用抗CD3再刺激；(iii)用抗CD3預活化且用VISTA(PD-L3)-Ig再刺激。(iv)用VISTA(PD-L3)-Ig預活化且用VISTA(PD-L3)-Ig再刺激。針對所有條件分析重複孔。展示來自四個實驗之代表性結果。

圖10描繪PD-L1-Ig及VISTA(PD-L3)-Ig融合蛋白質對CD4⁺ T細胞增殖之類似抑制作用。大量經純化之CD4⁺ T細胞經CFSE標記且用結合盤之 α CD3與滴定量之PD-L1-Ig或VISTA(PD-L3)-Ig融合蛋白質一起刺激。在72小時下分析CFSE稀釋且定量CFSE低細胞之百分比。針對所有條件分析重複孔。展示來自2個獨立實驗之代表性結果。

圖11A及**圖11B**描繪VISTA(PD-L3)-Ig對原態及記憶CD4⁺ T細胞之增殖之抑制性影響。(A)對原態(CD25-CD44低CD62L高)及記憶(CD25-CD44高CD62L低)CD4⁺ T細胞子集進行分選，CFSE標記，及用結合盤之抗CD3(2.5 μ g/ml)與VISTA(PD-L3)-Ig或對照-Ig一起以指示比率刺激。藉由檢查CFSE分裂概況在72小時下分析細胞增殖。如由CFSE低細胞百分比測定，增殖細胞之百分比經計算且展示於(B)中。針對所有條件分析重複孔。展示來自兩個獨立實驗之代表性結果。

圖12A及**圖12B**描繪VISTA(PD-L3)-Ig融合蛋白質抑制早期TCR活化及細胞增殖，但並不直接誘導細胞凋亡。大量經純化之CD4⁺ T細胞用結合盤之抗CD3與VISTA(PD-L3)-Ig或對照-Ig一起以1-2比率(分別為2.5 μ g/ml及5 μ g/ml)刺激。針對CD69、CD62L及CD44之表現，在24小時及48小時下利用流動式細胞測量術分析細胞。亦針對早期細胞凋亡標誌物磷脂結合蛋白-V及細胞死亡標誌物7-胺基放線菌素D(7-AAD)染色細胞。展示來自兩個獨立實驗之代表性結果。

圖13A、圖13B、圖13C、圖13D及圖13E描繪VISTA-Ig抑制CD4⁺及CD8⁺ T細胞產生細胞激素。(A)及(B)大量經純化之CD4⁺ T細胞用結合盤之抗CD3及VISTA-Ig或對照-Ig以所述比率刺激。在24小時及48小時之後收集培養物上清液。利用ELISA分析IL-2及IFN γ 之含量。(C-D)將CD4⁺ T細胞分選至原態(CD25-CD44低CD62L高)及記憶(CD25-CD44高CD62L低)細胞群體中。細胞用結合盤之 α CD3及VISTA(PD-L3)-Ig或對照-Ig以1:2之比率刺激。在48小時下收集培養物上清液，且利用ELISA分析IL-2及IFN γ 之含量。(E)大量經純化之CD8⁺ T細胞用結合盤之 α CD3及VISTA(PD-L3)-Ig或對照-Ig以指示比率刺激。培養物上清液中之IFN γ 利用ELISA分析。針對所有條件，將六個重複孔之上清液集中以用於ELISA分析。展示來自三個實驗之代表性結果。

圖14A、圖14B、圖14C及圖14D描繪VISTA-Ig介導之抑制可克服由CD28提供之中等程度之協同刺激，但由較高程度之協同刺激完全逆轉，以及由外源性IL-2部分挽救((A)及(B))。小鼠CD4⁺ T細胞利用結合盤之 α CD3與VISTA(PD-L3)-Ig或對照-Ig一起以1:1比率及1:2比率活化。針對細胞激素挽救，將可溶性mIL-2、mIL7、mIL15及mIL-23(所有均在40 ng/ml下)添加至細胞培養物中(A)。為了檢查協同刺激之作用，將 α CD28(1 μ g/ml)與 α CD3及Ig蛋白一起以指示比率固定化(B)。藉由檢查CFSE分裂概況在72小時下分析細胞增殖。C-D. 為了檢查在較低程度協同刺激存在下VISTA(PD-L3)之抑制性活性，將滴定量之 α CD28與抗CD3(2.5 μ g/ml)及VISTA-Ig融合蛋白質或對照-Ig融合蛋白質(10 μ g/ml)一起塗佈以刺激小鼠CD4⁺ T細胞增殖。在72小時下分析細胞增殖。增殖之CFSE低細胞之百分比經定量且展示於D中。針對所有條件分析重複孔。展示來自三個獨立實驗之代表性CFSE概況。

圖15A、圖15B、圖15C及圖15D描繪抗原呈現細胞上表現之

VISTA(PD-L3)抑制CD4⁺ T細胞增殖((A)、(B)及(C)將穩定表現MHCII分子I-Ad及協同刺激分子B7-2之CHO細胞株用作母細胞株。細胞用表現VISTA-RFP或RFP對照分子之反轉錄病毒轉導。將經轉導之細胞分選以達成均勻表現程度。為了測試其作為抗原呈現細胞之能力，在滴定量之OVA肽存在下，將CHO-VISTA或CHO-RFP用絲裂黴素C處理且與OVA特異性轉殖基因CD4⁺ T細胞D011.10混合。在72小時下利用CFSE分裂概況(A-B)或利用氘摻入(C)來分析DO11細胞之增殖。(D)源自骨髓之樹突狀細胞在10天培養期之期間用RFP或B7B-H5-RFP反轉錄病毒轉導。對經轉導之CD11c⁺ RFP⁺ DC及非轉導之CD11c⁺ RFP⁻ DC進行分選，且將其用於在滴定量之OVA肽存在下刺激OVA特異性轉殖基因CD4⁺ T細胞OTII。在第3天藉由檢查CFSE分裂來分析細胞增殖。對於所有實驗，針對所有條件分析重複孔，且展示來自三個獨立實驗之代表性結果。

圖 16 描繪在以反轉錄病毒方式轉導之源自骨髓之DC中VISTA(PD-L3)之表面表現含量。源自骨髓之DC(BMDC)在GM-CSF(20 ng/ml)存在下培養，且如本文所述用RFP或VISTA-RFP反轉錄病毒轉導。在第10天，在培養之BMDC上分析VISTA之表面表現含量，且與新鮮分離之腹膜巨噬細胞相比。

圖17A及圖17B展示抗PDL3單株抗體在被動轉移EAE模型中展現功效。在此授受性轉移EAE模型中，供體SJL小鼠用CFA及PLP肽免疫接種。在第10天，自引流LN分離全部淋巴細胞，且將其與PLP肽、IL-23(20 ng/ml)及抗IFN γ (10 μ g/ml)一起活體外培養4天。接著，將擴增之CD4⁺ T細胞純化，且將其授受性地轉移至未處理受體小鼠中。監測疾病發展且用以下評分：0，無疾病；0.5：尾調損失；1：尾無力；2：尾無力+後肢輕癱；2.5：1條後肢麻痺；3，兩條後肢麻痺；3.5：前肢虛弱；4：後肢麻痺+單側前肢麻痺。當疾病分數達至4時將

小鼠處死。^{*}，小鼠被處死。

圖18展示抗原呈現細胞上表現之VISTA抑制CD4⁺ T細胞增殖。

圖19展示抗VISTA抗體抑制經MB49腫瘤細胞移植之小鼠中的腫瘤生長。

圖20A、圖20B、圖20C、圖20D及圖20E展示VISTA單株抗體在四種不同小鼠抗腫瘤模型(A、B、C及-D)中之抗腫瘤作用。圖21E展示ID8模型中不同細胞上之VISTA之表現。不同解剖位置中骨髓樹突狀細胞上表現極高。如可看見，腹水細胞(腫瘤生長及白血球浸潤之部位)中骨髓樹突狀細胞上含量極高。

圖21展示VISTA單株抗體對CD40/TLR促效劑疫苗(由使用促效 α CD40單抗、TLR促效劑及OVA肽組成)之功效之強化作用。

圖22展示健康小鼠或發生EAE之小鼠中CNS細胞上VISTA表現。

圖23A、圖23B及圖23C描繪VISTA之序列及結構分析。(A)小鼠VISTA之一級胺基酸序列，其中Ig-V域、主幹區段及跨膜區分別以粗體、斜體及新羅馬字體(Times New Roman)突出顯示。胞外域區中之半胱胺酸藉由加下劃線指示。(B)數個B7家族成員與VISTA之Ig-V域之多重序列比對。所預測之二級結構(對於 α 、螺旋及 β 轉角分別使用箭頭、彈簧及「T」)在比對上方標記且基於VISTA結構模型。VISTA(SEQ ID NO: 15)、PD1L1(SEQ ID NO: 11)、PD1L2(SEQ ID NO: 12)、B7H4(SEQ ID NO: 13)及B7H3(SEQ ID NO: 14)。(C) VISTA直系同源物之多重序列比對。不變殘基利用紅色背景表示，且物理化學上保守之位置利用紅色字母表示。保守胺基酸利用藍色盒子標記。基於36個VISTA同源蛋白質計算保守，但僅展示9個代表物。在幾乎所有Ig超家族成員中保守之典型半胱胺酸對(B及F股)利用紅色圓形突出顯示，而對VISTA具有特異性之半胱胺酸利用藍色圓形標記。獨特

的VISTA半胱胺酸模式在來自以下之所有直系同源物中保守：小鼠(SEQ ID NO: 17)、人類(SEQ ID NO: 16)、袋鼠(SEQ ID NO: 18)、海豚(SEQ ID NO: 19)、雞(SEQ ID NO: 20)、爪蟾(SEQ ID NO: 21)、斑胸草雀(SEQ ID NO: 22)、斑馬魚(SEQ ID NO: 23)及紅鰭東方魮(SEQ ID NO: 24)。

圖24A及圖24B描繪腫瘤細胞上VISTA過度表現克服保護性抗腫瘤免疫性。過度表現VISTA或RFP對照蛋白質之MCA105腫瘤細胞利用反轉錄病毒轉導產生且分選至均質。為了產生保護性免疫，未處理小鼠用輻射之MCA105腫瘤細胞在左側腹皮下疫苗接種。**(A)**經疫苗接種之小鼠14天後用活MCA105VISTA或MCA105RFP腫瘤細胞在右側腹皮下攻擊。每2天監測腫瘤生長。腫瘤大小以平均值 $\pm$ SEM形式展示。展示來自三個獨立重複之代表性結果。**(B)**經疫苗接種之小鼠在活腫瘤攻擊之前或未經處理或利用單株抗體剔除 $CD4^+$ 及 $CD8^+$ T細胞。如A中監測腫瘤大小且以平均值 $\pm$ SEM形式展示。展示來自兩個獨立重複之代表性結果。對於所有實驗，比率指示每組小鼠總數中負載腫瘤小鼠數。統計學差異(p值)用非成對曼-懷特尼檢驗。

圖25A、圖25B、圖25C及圖25D描繪使用特異性單株抗體之VISTA阻斷在活體外及活體內增強 $CD4^+$ T細胞反應。**(A)**單株抗體純系13F3活體外中和VISTA介導之抑制。A20-RFP及A20-VISTA細胞用於在同源OVA肽存在下刺激標記CFSE之DO11.10 $CD4^+$ T細胞。如指示添加20 μ g/ml VISTA特異性單株抗體13F3或對照-Ig。在72小時之後分析CFSE稀釋，且CFSE^低細胞之百分比以平均值 $\pm$ SEM之形式展示。針對所有條件分析重複孔。**(B及C)**輻射自原態脾細胞分選之總 $CD11b^{\text{高}}$ 骨髓細胞**(B)**或 $CD11b-CD11c^-$ 單核細胞**(C)**及 $CD11b^{\text{高}}CD11c^+$ 骨髓DC**(D)**，且將其用於在OVA肽存在下刺激標記CFSE之OT-II轉殖基因

CD4⁺ T細胞。細胞增殖在72小時培養期之最後8小時期間利用氘化胸苷摻入來量測且以平均值±SEM之形式展示。在所有條件中分析一式三份孔。

圖26描繪VISTA-IgG2a減少實驗性自體免疫性腦脊髓炎(EAE)(多發性硬化症模型)進展。小鼠用175 µg MOG/CFA及百日咳毒素(PT)300 ng免疫接種(第0天、第2天)以誘導主動EAE。在第14天、第17天及第20天，投與150 µg VISTA-IgG 2a(n = 8)或150 µg對照IgG2a(n = 8)。資料以平均值±SEM之形式展示。

圖27描繪VISTA-IgG1及VISTA-IgG2a對實驗性自體免疫性腦脊髓炎(EAE)進展之治療性作用。小鼠用175 µg MOG/CFA及百日咳毒素(PT)300 ng免疫接種(第0天、第2天)以誘導主動EAE。在第6天，小鼠用150 µg對照IgG1(n = 3)、150 µg對照IgG2a(n = 6)、150 µg mVISTA-IgG1(n = 3)或150 µg mVISTA IgG2a(n = 6)之每週3劑治療(總共兩週)。資料以平均值±SEM之形式展示。

圖28描繪VISTA-IgG2a融合蛋白質對實驗性自體免疫性腦脊髓炎(EAE)進展之治療性作用。小鼠用175 µg MOG/CFA及百日咳毒素(PT)300 ng免疫接種(第0天、第2天)以誘導主動EAE。在第14天，小鼠用PBS(n = 6)、100 µg對照IgG2a(n = 6)、300 µg對照IgG2a(n = 6)、100 µg VISTA-IgG2(n = 6)或300 µg mVISTA IgG2a(n = 6)之每週3劑治療(總共兩週)。資料以平均值±SEM之形式展示。

圖29A及圖29B描繪VISTA健康人類組織之表現利用cDNA組織組(Origene)之實時PCR分析檢查。(A) VISTA主要表現於造血組織或含有顯著數目造血組織之組織中。此結果與VISTA在免疫相關功能中之重要性一致。(B)發現表現之表現模式遵循與VISTA之最接近同源物PD-L1之趨勢類似的趨勢。

圖30描繪單核細胞、樹突狀細胞中及利用約20%之CD4及CD8 T細胞之VISTA蛋白質表現。在血液單核細胞之『巡視』(CD14^{high}CD16⁺)及『發炎』(CD14⁺CD16^{+/+})子集內及在樹突狀細胞之淋巴及骨髓子集兩者內觀察到VISTA表現。

圖31A、圖31B、圖31C及圖31D描繪大量經純化之CD4(圖31A)及CD8(圖31B)T細胞之CFSE稀釋之抑制。形成Ig融合蛋白質，其由VISTA之胞外域及人類IgG之Fc區組成，該Fc區含有突變以達成減少之Fc受體結合。10 µg/ml VISTA-Ig或對照Ig與2.5 µg/ml抗CD3(OKT3)一起在盤上固定化，隨後利用CFSE稀釋量測增殖。

圖32A及圖32B描繪在不同濃度OKT3上人類VISTA-Ig及小鼠VISTA-Ig之滴定展示較高濃度之OKT3可由較高濃度之VISTA克服。

圖33A、圖33B、圖33C及圖33D描繪在存在或不存在VISTA-Ig情況下在活化之後檢查細胞狀態。在2天培養期間，早期活化標誌物CD25及CD69利用抗CD3之上調由VISTA-Ig阻斷(圖33A及圖33B)。類似地，在5天培養之後，防止指示抗原經歷之自CD45RA表現變換至CD45RO(圖33C)。VISTA對細胞生存力不具有影響。圖34D展示VISTA-Ig增加FoxP3轉化。

圖34A及圖34B描繪由VISTA誘導之抑制，其中細胞在抗CD3及VISTA-Ig上培養兩天，隨後移至單獨抗CD3上培養3天。此進一步刺激不能挽救抑制(圖34A及34B)。

圖35A及圖35B展示VISTA-Ig明顯減少由CD4(圖35A)及CD8(圖35B)T細胞產生之IL-10、TNFα及IFNγ，且存在IL-17產生適度減少之傾向。

圖36A、圖36B及圖36C展示抗CD28促效抗體提供對T細胞之強力協同刺激，且因此滴定至培養物中以攻擊VISTA抑制。

圖37展示下文實例32中所用之流動式閘選分析。對人類對照個體及狼瘡患者CD4⁺ T細胞之CFSE增殖分析。hVISTA Ig與2.5 µg/ml CD3共塗佈。與對照Fc組相比，hVISTA Ig在10 µg/ml下對人類對照個體與狼瘡患者均展示最大抑制。hVista Ig對人類CD4⁺ T細胞增殖展示極大抑制活性。

圖38展示下文實例32中所用之活體外T細胞增殖分析之結果。

圖39A、**圖39B**及**圖39C**展示連接子柔性對標記CFSE之人類T細胞上VISTA-Ig活性之影響，該等T細胞在2.5 µg/ml結合盤之抗CD3及對照Ig或VISTA-Ig存在下培養5天。a)來自序列1之huVISTA-Ig。b)缺乏柔性連接子之來自序列2之huVISTA-Ig。c)具有絲胺酸/甘胺酸連接子之來自序列3之huVISTA-Ig。

圖40A、**圖40B**、**圖40C**及**圖40D**含有防治研究NZBWF1雌性小鼠自8週齡起每隔一天用PBS、150 µg對照-IgG2a或mVISTA-IgG2a治療。治療在第24週開始進行治療性研究。每週利用體重損失及蛋白尿監測疾病嚴重度。資料以平均值±SEM之形式展示。利用非成對曼-懷特尼檢驗測定對照-IgG2a相對於mVISTA-IgG2a之間的統計顯著性；p = 0.0027(防治性)及p = 0.0156(治療性)。

圖41A、**圖41B**、**圖41C**及**圖41D**含有來自以下之個別腎小球之代表性H&E染色高能切片：A. 歷史正常BW腎小球。B. 患有中度腎小球發炎之經VISTA-Ig治療之小鼠；C. 患有強烈發炎及阻塞之經對照Ig治療之小鼠；D. 腎小球接近完全閉塞之另一經對照Ig治療之小鼠。

圖42含有EAE動物模型中之實驗結果，該等結果展示VISTA-IgG2a對主動EAE之治療作用。

圖43A及**圖43B**含有SLE動物模型中之實驗結果，該等結果展示mVISTA-IgG2a在預防SLE發作方面之防治性作用。針對防治研究，NZBWF1雌性小鼠自8週齡起每隔一天用PBS、150 µg對照-IgG2a或mVISTA-IgG2a治療。每週利用體重損失及蛋白尿監測疾病嚴重度。資料以平均值±SEM之形式展示。利用非成對曼-懷特尼檢驗測定對照-IgG2a相對於mVISTA-IgG2a之間的統計顯著性；p = 0.0027(防治性)。N = 7。

圖44A及**圖44B**含有SLE動物模型中之實驗結果，該等結果展示mVISTA-IgG2a之防治性投與減少蛋白尿且增強存活率。使用VISTA-

IgG2a之防治性治療預防NZBWF1小鼠中之蛋白尿。每週監測8週齡NZBWF1雌性小鼠之蛋白尿，且每隔一天用PBS、150 μ g對照-IgG2a或150 μ g mVISTA-IgG2a治療。每週利用蛋白尿監測疾病嚴重度。資料以平均蛋白質含量 $\pm$ SEM之形式展示且代表一個實驗。利用非成對曼-懷特尼檢驗測定對照-IgG2a相對於mVISTA-IgG2a之間的統計顯著性； $p = 0.0009$ 。

圖45含有展示TCR Tg/VISTA -/-小鼠中對EAE之易感性增強之資料。

圖46含有展示雌性VISTA KO小鼠中IgG自體抗體增高之資料。

圖47含有展示RAG -/- VISTA -/-小鼠中骨髓形成增強之實驗資料。

圖48含有展示VISTA -/-小鼠之發炎表型之實驗資料。

圖49展示對OVA之耐受及敏化均增加目標組織中之Foxp3⁺ Treg且活化引流淋巴結中之Treg。小鼠用OVA/鋁佐劑敏化，給予單獨OVA(耐受)或PBS治療。在第7天、第10天、第11天及第12天，鼻內給予50 μ g OVA或PBS。在第13天，針對核內Foxp3或表面GARP將肺及引流淋巴結細胞染色， $n = 5$ 。

圖50展示肺Treg對過敏原無反應。如**圖49**中，小鼠始終用OVA/鋁佐劑(敏化)、單獨OVA(耐受)免疫接種或PBS治療。在第13天，肺及引流淋巴結細胞用CFSE標記且在過敏原存在下培養4天，隨後核內Foxp3染色。在數個獨立實驗中獲得類似資料。

圖51展示在發炎組織而非引流淋巴結中Foxp3⁺ Treg中之Helios表現減少。針對核內Helios表現將如**圖50**中之肺及淋巴結細胞染色。

圖52展示VISTA在耐受誘導及過敏原敏化兩者期間在肺泡巨噬細胞上高度表現。小鼠鼻內給予4劑單獨過敏原(OVA，耐受)或過敏原加上黏膜佐劑(OVA+TNF- α)以誘導肺發炎。在最終攻擊之後24小時，BAL或肺組織細胞用單株VISTA抗體且針對巨噬細胞/DC(I-Ab⁺CD11c⁺)或淋巴細胞(CD3⁺/B220⁺)之標誌物染色。在2個獨立實驗中獲得類似資料。

圖53展示固定化之VISTA-Ig融合蛋白質促進TGF- β 介導表現Foxp3之Treg在活體外之誘導。來自Foxp3-報導小鼠之分選之Foxp3GFP-CD25-原態CD4⁺ T細胞與如指示之結合盤之抗CD3(5 μ g/ml) $\pm$ TGF- β (1 ng/ml)及對照-Ig或VISTA-Ig(2.5 μ g/mL)一起培養。在

72小時之後針對表現Foxp3之細胞之誘導檢查細胞。

圖54示意性描繪用於分析不同信號路徑上VISTA之作用之磷酸化墨點分析。用每孔2.5 µg抗CD3抗體(2c11)加10 µg對照IgG或VISTA-Ig(1:4比率)塗佈24孔盤，在4°C下培育隔夜。在37°C下用經血清饑餓之純化鼠類CD4+ T細胞刺激多次。在指定時間點收穫細胞且經由西方墨點法針對TCR信號傳導路徑中之磷酸化蛋白質(例如Fyn、Lck、ZAP70、LAT、GRB2、Vav、Ras、P38、JNK、ERK1/2)評估對TCR信號傳導級聯之影響。

圖55含有在CD3刺激後之不同時間點之pERK活性之磷酸化墨點。

圖56含有在與圖55中相同的時間點下之負載對照。

圖57含有指示VISTA選擇性抑制ERK1/2活化之資料。

圖58含有指示VISTA並不抑制JNK活化之資料。

圖59含有人類及鼠類MLR實驗之結果，該等結果指示人類及小鼠VISTA-Ig均抑制人類及小鼠MLR反應。(A)人類及小鼠VISTA-Ig蛋白質在活體外均抑制人類MLR反應。hV-Ig(人類VISTA-Ig)、mV-Ig(小鼠VISTA-Ig)以指定濃度添加至MLR中。(B)人類及小鼠VISTA-Ig蛋白質在活體外均抑制小鼠MLR反應。hV-Ig(人類VISTA-Ig)、mV-Ig(小鼠VISTA-Ig)及Fc-Ig(對照)以指定濃度添加至MLR中。

圖60含有指示防治性VISTA-IgGa在NZBWF1小鼠中之作用的資料。NZBWF1小鼠中VISTA-IgG2a之投與並不改變發炎單核細胞及T細胞之細胞頻率。每隔一天自用PBS、150 µg對照-IgG2a或mVISTA-IgG2a治療之20週齡NZBWF1小鼠中收集全血。溶解全血且用螢光結合抗體染色，以鑑別(A)發炎單核細胞及(B)T細胞。利用流動式細胞測量分析測定細胞群體。

圖61含有展示用VISTA-IgG2a治療之20週NZBWF1小鼠中IL-17含量之資料。

圖62及圖63含有SLE治療性研究中24週齡NZBWF1小鼠之細胞激素概況。

【實施方式】

為了能夠充分瞭解在本文中所述之本發明，闡述以下實施方式。詳細描述本發明之各種實施例且可藉由所提供之實例來進一步說明。

定義

除非另作定義，否則本文中所用之所有技術及科學術語均具有與一般技術(本發明所屬)者通常所瞭解之含義相同的含義。儘管在本發明中或在測試本發明時可使用類似或等同於本文所述方法及材料的方法及材料，但本文描述適合之方法及材料。該等材料、方法及實例僅為說明性的，且並非意欲限制性。

除非上下文另外明確規定，否則如本文描述中及貫穿隨後之申請專利範圍中所用之「一個(種)(a、an)」及「該」之含義包括複數個參考物。

如本文所用之「活化受體」廣泛地指結合抗原、複合抗原(例如在MHC分子之情形下)、Ig-融合蛋白質、配位體或抗體之免疫細胞受體。活化受體為(但不限於)T細胞受體(TCR)、B細胞受體(BCR)、細胞激素受體、LPS受體、補體受體及Fc受體。舉例而言，T細胞受體存在於T細胞上且與CD3分子相關。T細胞受體在MHC分子之情形下利用抗原(以及利用多株T細胞活化試劑)刺激。經由TCR之T細胞活化引起許多變化，例如蛋白質磷酸化、膜脂變化、離子流動、環核苷酸改變、RNA轉錄變化、蛋白質合成變化及細胞體積變化。

如本文所用之「抗原呈現細胞」廣泛指專職性抗原呈現細胞(例如B淋巴細胞、單核細胞、樹突狀細胞及郎格罕氏細胞(Langerhans cell))以及其他抗原呈現細胞(例如角質細胞、內皮細胞、星形膠質細胞、纖維母細胞及寡樹突神經膠質細胞)。

如本文所用之「胺基酸」廣泛地指天然產生及合成的胺基酸，以及以類似於天然產生之胺基酸的方式起作用的胺基酸類似物及胺基酸模擬物。天然產生之胺基酸為由遺傳密碼子編碼之胺基酸以及隨後經修飾之胺基酸(例如羧脯胺酸、 γ -羧基麩胺酸及O-磷絲胺酸)。胺基酸類似物係指具有與天然產生之胺基酸相同之基本化學結構(亦即與氫、羧基、胺基結合之 α 碳)及R基團的化合物(例如高絲胺酸、正白胺酸、甲硫胺酸亞砷、甲硫胺酸甲基銻)。該等類似物具有經修飾之R基團(例如正白胺酸)或經修飾之肽骨架，但保留與天然產生之胺基酸相同之基本化學結構。胺基酸模擬物係指具有不同於胺基酸之一般化學結構之結構但以類似於天然產生之胺基酸之方式起作用的化合物。

如本文所用之「惰能」或「耐受性」廣泛地指針對活化受體介

導之刺激的耐性(refractivity)。耐性一般為抗原特定性且在暴露於耐受抗原已停止之後持續。

如本文所用之「抗體」廣泛地指抗體之「抗原結合部分」(亦可與「抗體部分」、「抗原結合片段」、「抗體片段」互換使用)以及全抗體分子。如本文所用之術語「抗原結合部分」係指保留與抗原(例如 VISTA(PD-L3))特異性結合之能力之抗體的一或多個片段。抗體之抗原結合功能可由全長抗體之片段進行。術語抗體之「抗原結合部分」內涵蓋之抗原結合片段的實例包括：(a) Fab片段，一種由VL、VH、CL及CH1域組成之單價片段；(b) F(ab')₂片段，一種包含在鉸鏈區處利用雙硫橋連接之兩個Fab片段之二價片段；(c) Fd片段，其由VH及CH1域組成；(d) Fv片段，其由抗體之單臂之VL及VH域組成；(e) dAb片段(Ward等人 (1989) **Nature** 341: 544-546)，其由VH域組成；及(f)經分離之互補決定區(CDR)。此外，儘管Fv片段之兩個域(即VL及VH)係由各別基因編碼，但可使用重組方法藉由可使其成為單一蛋白質鏈之合成連接子將其連接，其中VL與VH區配對而形成單價分子(稱作單鏈Fv(scFv)。參見例如Bird等人 (1988) **Science** 242: 423-426；Huston等人(1988) **Proc Natl. Acad. Sci. USA** 85: 5879-5883；及Osbourn等人(1998) **Nat. Biotechnol.** 16: 778。單鏈抗體亦意欲涵蓋在術語抗體之「抗原結合部分」內。特定scFv之任何VH及VL序列可連接至人類免疫球蛋白恆定區cDNA或基因組序列，以產生編碼完整IgG分子或其他同型之表現載體。亦可利用蛋白質化學或重組DNA技術使用VH及VL來產生Fab、Fv或免疫球蛋白之其他片段。亦涵蓋單鏈抗體之其他形式，諸如雙功能抗體。雙功能抗體為二價雙特異性抗體，其中VH及VL域表現於單一多肽鏈上，但使用過短而不允許同一鏈上之兩個域之間配對的连接子，從而迫使該等域與另一鏈之互補域配對且形成兩個抗原結合位點。參見例如Holliger等人 (1993) **Proc Natl. Acad. Sci.**

USA 90: 6444-6448 ; Poljak等人 (1994) Structure 2: 1121-1123 。

此外，抗體或其抗原結合部分(抗原結合片段、抗體片段、抗體部分)可為較大免疫黏附分子之一部分，該較大免疫黏附分子由抗體或抗體部分與一或多種其他蛋白質或肽共價或非共價締合而形成。免疫黏附分子之實例包括使用抗生蛋白鏈菌素核心區以產生四聚scFv分子(Kipriyanov等人 (1995) **Hum. Antibodies Hybridomas** 6: 93-101)及使用半胱胺酸殘基、標誌物肽及C端聚組胺酸標籤以產生二價及生物素標記之scFv分子。Kipriyanov等人 (1994) **Mol Immunol.** 31: 1047-1058。可使用諸如全抗體之分別木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化之習知技術由全抗體製備諸如Fab及F(ab')₂片段之抗體部分。此外，如本文中所述，可使用標準重組DNA技術獲得抗體、抗體部分及免疫黏附分子。

抗體可為多株、單株、異種、同種異體、同基因抗體，或其經修飾形式，例如人類化、嵌合抗體。本發明之抗體較佳特異性或實質上特異性結合至VISTA(PD-L3)分子上。如本文所用之術語「單株抗體」及「單株抗體組合物」指僅含有一種能夠與抗原之特定抗原決定基發生免疫反應之抗原結合位點的抗體分子群體，而術語「多株抗體」及「多株抗體組合物」指含有多種能夠與特定抗原相互作用之抗原結合位點的抗體分子群體。單株抗體組合物通常對與其發生免疫反應之特定抗原呈現單一結合親和力。

如本文所用之「抗原」廣泛地指能夠由抗體結合之分子或一部分分子，其另外能夠誘導動物產生能夠結合至該抗原之抗原決定基的抗體。抗原可具有一個抗原決定基，或具有一個以上抗原決定基。本文所提及之特異性反應指示抗原將以高選擇性方式與其相應抗體反應且不與可被其他抗原激發之多種其他抗體反應。在需要增強對相關特定抗原之免疫反應之情況下，抗原包括(但不限於)可引起保護性免疫

反應之感染性疾病抗原，該等抗原為例示性的。

如本文所用之「過敏疾病」廣泛地指涉及過敏反應之疾病。更特定言之，「過敏疾病」定義為過敏原經鑑別之疾病，其中在暴露於該過敏原與病理變化發作之間存在較強相關性，且其中已證明該病理變化具有免疫機制。本文中，免疫機制意謂白血球對過敏原刺激展示免疫反應。

如本文所用之「反義核酸分子」廣泛地指與編碼蛋白質之「有義」核酸互補(例如與雙股cDNA分子之編碼股互補)、與mRNA序列互補或與基因之編碼股互補的核苷酸序列。因此，反義核酸分子可以氫鍵鍵結至有義核酸分子。

如本文所用之「哮喘」廣泛地指呼吸系統之病症，其特徵在於發炎、氣管狹窄及氣管對吸入式藥劑之反應性增加。哮喘時常(不過並非僅僅)與異位性或過敏性症狀相關。

如本文所用之「細胞凋亡」廣泛地指計畫式細胞死亡，其可使用此項技術中已知之技術表徵。細胞凋亡細胞死亡特徵可在於細胞萎縮、膜起泡及在細胞破碎中染色質凝聚告終。經歷細胞凋亡之細胞亦展示核小體間DNA裂解之特有模式。

如本文所用之「自體免疫」或「自體免疫疾病或病狀」廣泛地指由個體自身組織引起且針對個體自身組織之疾病或病症，或其共分離(co-segregate)或表現或由此產生之病狀。

如本文所用之「B細胞受體」(BCR)廣泛地指發現於B細胞上之在膜Ig(mIg)與其他跨膜多肽(例如Ig α 及Ig β)之間的複合體。mIg之信號轉導功能由受體分子利用寡聚或多聚抗原之交聯觸發。B細胞亦可由抗免疫球蛋白抗體活化。在BCR活化時，B細胞中發生許多變化，包括酪胺酸磷酸化。

如本文所用之「癌症」廣泛地指任何贅生性疾病(無論侵襲性抑

或轉移性)，其特徵在於異常及不受控制之細胞分裂引起惡性生長或腫瘤(例如不受調節之細胞生長)。

如本文所用之「嵌合抗體」廣泛地指抗體分子，其中恆定區或其部分經改變、置換或交換，從而使抗原結合位點(可變區)連接至不同或改變之類別、效應功能及/或物種之恆定區，或賦予嵌合抗體以新性質之完全不同之分子，例如酶、毒素、激素、生長因子、藥物，可變區或其部分用具有不同或改變之抗原特異性的可變區改變、置換或交換。

如本文所用之「編碼區」廣泛地指核苷酸序列中包含轉譯成胺基酸殘基之密碼子的區域，而術語「非編碼區」係指核苷酸序列中不轉譯成胺基酸之區域(例如5'及3'非轉譯區)。

如本文所用之「經保守修飾之變異體」適用於胺基酸及核酸序列兩者，且對於特定核酸序列，廣泛地指經保守修飾之變異體，其係指編碼相同或基本上相同的胺基酸序列之核酸，或其中核酸不將胺基酸序列編碼成基本上相同的序列。由於遺傳密碼子之簡併，大量功能上相同之核酸編碼任何所給定之蛋白質。「沉默變異」為一種經保守修飾之核酸變異。本文中每個編碼多肽之核酸序列亦描述每種可能之核酸沉默變異。熟習此項技術者應瞭解，核酸中之各密碼子(例外為AUG，其通常為甲硫胺酸之唯一密碼子；及TGG，其通常為色胺酸之唯一密碼子)可經修飾而產生功能相同之分子。

如本文所用之「互補決定區」、「高變區」或「CDR」廣泛地指見於抗體輕鏈或重鏈之可變區中的一或多個高變區或互補決定區(CDR)。參見 Kabat 等人 (1987) 「**Sequences of Proteins of Immunological Interest**」 National Institutes of Health, Bethesda, MD。此等表現包括如Kabat等人 (1983) 「**Sequences of Proteins of Immunological Interest**」 U.S. Dept. of Health and Human Services所

定義之高變區或抗體3維結構中之高變環。Chothia及Lesk (1987) **J Mol. Biol.** 196: 901-917。各鏈中之CDR保持緊密鄰近於構架區，且在來自另一鏈之CDR情況下有助於形成抗原結合位點。在CDR內存在選定胺基酸，其已被描述為選擇性決定區(SDR)，該等區域代表由CDR用於抗體-抗原相互作用之關鍵接觸殘基。Kashmiri (2005) **Methods** 36: 25-34。

如本文所用之「對照量」廣泛地指標誌物可為與標誌物之測試量相比較之任何量或量之範圍。舉例而言，標誌物之對照量可為患有特定疾病或病狀之患者或未患該疾病或病狀之人員的標誌物之量。對照量可為絕對量(例如微克/毫升)或相對量(例如信號相對強度)。

如本文所用之「協同刺激性受體」廣泛地指向免疫細胞傳送協同刺激性信號之受體(例如CD28或ICOS)。如本文所用之術語「抑制性受體」受體向免疫細胞傳送負向信號之受體。

如本文所用之「協同刺激」廣泛地指協同刺激性分子提供誘導增殖或效應功能之第二非活化的受體介導之信號(「協同刺激性信號」)的能力。舉例而言，協同刺激性信號可引起細胞激素分泌(例如在已接收T細胞受體介導之信號之T細胞中)。已接收細胞受體介導之信號(例如經由活化受體)之免疫細胞在本文中可稱為「活化免疫細胞」。

如本文所用之「細胞質域」廣泛地指延伸至細胞之細胞質中之蛋白質部分。

如本文所用之「診斷」廣泛地指鑑別病理病狀之存在或性質。診斷方法在其靈敏度及特異性方面有所不同。診斷分析之「靈敏度」為測試呈陽性之患病個體的百分比(「真陽性」百分比)。未由分析偵測出之患病個體為「假陰性」。未患病及在分析中測試呈陰性之個體稱作「真陰性」。診斷分析之「特異性」為1減去假陽性率，其中「假

陽性」率定義為未患疾病而測試呈陽性者的比例。儘管特定診斷方法可能不提供對病狀之確定性診斷，但若該方法提供有助於診斷之正的指示，則其就足夠了。

如本文所用之「診斷」廣泛地指將疾病或症狀分類、確定疾病之嚴重度、監測疾病進展、預測疾病結果及/或恢復之希望。術語「偵測」亦可視情況涵蓋上述任一者。根據本發明診斷疾病在一些實施例中可藉由測定自個體獲得之生物樣品中本發明之聚核苷酸或多肽的含量來達成，其中所測定之含量可能與疾病易感性或存在或不存在疾病有關。應注意，「自個體獲得之生物樣品」亦可視情況包含並非以物理方式自個體移除之樣品。

如本文所用之「有效量」廣泛地指化合物、抗體、抗原或細胞在投與患者以用於治療疾病時足以實現對疾病之該治療的量。有效量可為可有效防治之量及/或可有效預防之量。有效量可為可有效減輕徵候/症狀之量、有效預防徵候/症狀出現、降低出現徵候/症狀之嚴重度、消除徵候/症狀出現、減緩徵候/症狀出現之進展、預防徵候/症狀出現之進展，及/或實現防治徵候/症狀出現的量。「有效量」可視疾病及其嚴重度以及所治療患者之年齡、體重、病史、敏感性及既有病狀而不同。出於本發明之目的，術語「有效量」與「治療有效量」同義。

如本文所用之「胞外域」廣泛地指蛋白質自細胞表面擴展之部分。

如本文所用之「表現載體」廣泛地指用於達成活體外或活體內於任何細胞(包括原核生物、酵母、真菌、植物、昆蟲或哺乳動物細胞)中組成性或誘導性表現本發明核酸序列之目的的任何重組表現系統。該術語包括線性或環狀表現系統。該術語包括保持游離型或整合至宿主細胞基因組中之表現系統。該等表現系統能夠自行複製或不能

夠自行複製，亦即僅驅使短暫表現於細胞中。該術語包括重組表現卡匣，其僅含有重組核酸轉錄所需之最少元件。

如本文所用之「家族」廣泛地指本發明之多肽及核酸分子意欲意謂如本文所定義具有共同結構域或基元且具有充足胺基酸或核苷酸序列同源性的兩個或兩個以上多肽或核酸分子。家族成員可為天然或非天然產生的，且可來自相同或不同物種。舉例而言，家族可含有人類來源之第一多肽以及人類來源之其他不同多肽，或者可含有非人類來源之同源物(例如猴多肽)。家族成員亦可具有共同功能特徵。

如本文所用之「Fc受體」(FcR)廣泛地指免疫球蛋白分子(Ig)之Fc部分之細胞表面受體。Fc受體見於參與免疫反應之許多細胞上。在迄今已鑑別之人類FcR中為識別IgG(指定為FcγR)、IgE(FcεR1)、IgA(FcαR)及聚合IgM/A(FcμR)之FcR。FcR見於以下細胞類型中：FcεRI(肥大細胞)、Fcε RII(許多白血球)、FcαR(嗜中性白血球)及FcμR(腺上皮細胞、肝細胞)。Hogg (1988) **Immunol. Today** 9: 185-86。廣泛研究之FcγR為細胞免疫防禦之中樞，且引起刺激自體免疫疾病之發病機制中涉及之發炎介體及水解酶的釋放。Unkeless (1988) **Annu. Rev. Immunol.** 6: 251-87。FcγR提供效應細胞與分泌Ig之淋巴細胞之間的關鍵連接，因為巨噬細胞/單核細胞、多形核白血球及自然殺手(NK)細胞FcγR賦予由IgG所介導之特異性識別元件。人類白血球具有IgG之至少三種不同受體：hFcγRI(發現於單核細胞/巨噬細胞中)、hFcγRII(在單核細胞、嗜中性白血球、嗜伊紅血球、血小板、可能的B細胞及K562細胞株上)及FcγIII(在NK細胞、嗜中性白血球、嗜伊紅血球及巨噬細胞)上。

相對於T細胞，向T細胞傳送協同刺激性信號涉及不受環孢素A抑制之信號傳導路徑。另外，協同刺激性信號可誘導T細胞中細胞激素分泌(例如IL-2及/或IL-10)及/或可預防對抗原無反應之誘導、惰能之

誘導或T細胞中細胞死亡之誘導。

如本文所用之「構架區」或「FR」廣泛地指抗體之輕鏈及重鏈之可變區內之一或多個構架區。參見Kabat等人 (1987) 「**Sequences of Proteins of Immunological Interest**」 National Institutes of Health, Bethesda, MD。此等表現包括插入抗體之輕鏈及重鏈可變區內之CDR之間的該等胺基酸序列區。

如本文所用之「異源」廣泛地指核酸之部分指示核酸包含兩個或兩個以上在性質上未發現彼此存在相同關係的子序列。舉例而言，核酸通常為重組產生，由來自無關基因之兩個或兩個以上序列排列而產生新功能性核酸(例如啟動子來自一種來源而編碼區來自另一來源)。同樣，異源蛋白質指示該蛋白質包含兩個或兩個以上在性質上未發現彼此存在相同關係的子序列(例如融合蛋白質)。

如本文所用之「高親和力」廣泛地指抗體對目標抗原之KD為至少 10^{-8} M，更佳為至少 10^{-9} M且甚至更佳為至少 10^{-10} M。然而，其他抗體同型之「高親和力」結合可能不同。舉例而言，IgM同型之「高親和力」結合係指抗體之KD為至少 10^{-7} M，更佳為至少 10^{-8} M。

如本文所用之「同源性」廣泛地指核酸序列與參考核酸序列之間或多肽序列與參考多肽序列之間的相似度。同源性可為部分或完全同源性。完全同源性指示核酸或胺基酸序列相同。部分同源核酸或胺基酸序列為與參考核酸或胺基酸序列不同之核酸或胺基酸序列。同源度可藉由序列比較來測定。術語「序列一致性」可與「同源性」互換使用。

如本文所用之「宿主細胞」廣泛地指當中引入有本發明之核酸分子(諸如本發明之重組表現載體)的細胞。宿主細胞可為原核細胞(例如大腸桿菌(*E. coli*))、或真核細胞(諸如酵母、昆蟲(例如SF9))、兩棲動物細胞或哺乳動物細胞(諸如CHO、HeLa、HEK-293)，例如培養之

細胞、外植體及活體內細胞。術語「宿主細胞」與「重組宿主細胞」在本文中可互換使用。應瞭解，該等術語不僅意指特定個體細胞，而且意指此種細胞之子代或潛在子代。由於某些修飾可能因突變或環境影響而在繼代中存在，所以子代實際上可能不與母細胞相同，但其仍包括在如本文所用之該術語之範疇內。

如本文所用之「人類化抗體」廣泛地包括由非人類細胞產生之具有可變區及恆定區之抗體，其已經改變而更接近地類似於由人類細胞產生之抗體。舉例而言，藉由改變非人類抗體胺基酸序列以併入見於人類生殖系免疫球蛋白序列中之胺基酸。本發明之人類化抗體可包括不由人類生殖系免疫球蛋白序列編碼之胺基酸殘基(例如，活體外藉由隨機或定點突變誘發或活體內藉由體細胞突變而引入之突變)，例如在CDR中。如本文所用之術語「人類化抗體」亦包括源自另一哺乳動物物種(諸如小鼠)之生殖系的CDR序列已移植於人類構架序列上的抗體。

如本文所用之「雜交」廣泛地指互補(包括部分互補)聚核苷酸股在將該等股彼此反向平行排列時由互補核苷酸之間形成氫鍵而產生的物理相互作用。

如本文所用之「IgV域」及「IgC域」廣泛地指Ig超家族成員域。此等域對應於具有稱為Ig摺疊之獨特摺疊模式之結構單元。Ig摺疊包含兩個 β 摺疊之夾層，該等 β 摺疊各自由5至10個胺基酸之反向平行 β 股組成，且在大部分但非所有域中之兩個摺疊之間存在保守二硫鍵。Ig之IgC域、TCR及MHC分子共有相同類型之序列模式且稱作Ig超家族內之C1組。其他IgC域屬於其他組。IgV域亦共有序列模式且稱作V組域。IgV域長於C域且形成另一對 β 股。

如本文所用之「免疫細胞」廣泛地指源於造血且在免疫反應中起作用之細胞。免疫細胞包括淋巴細胞，諸如B細胞及T細胞；自然

殺手細胞；及骨髓細胞，諸如單核細胞、巨噬細胞、嗜伊紅血球、肥大細胞、嗜鹼細胞及顆粒球。

如本文所用之「免疫分析」廣泛地指使用抗體來特異性結合抗原的分析。免疫分析特徵可在於利用特定抗體之特異性結合性質來分離、靶向及/或定量抗原。

如本文所用之「免疫反應」廣泛地指T細胞介導及/或B細胞介導之免疫反應，其受調節T細胞協同刺激影響。例示性免疫反應包括B細胞反應(例如抗體產生)、T細胞反應(例如細胞激素產生及細胞之細胞毒性)及細胞激素反應性細胞(例如巨噬細胞)活化。如本文所用之術語「下調」就免疫反應而言包括任一或多種免疫反應減少，而術語「上調」就免疫反應而言包括任一或多種免疫反應增強。應理解一種類型免疫反應之上調可能引起另一類型免疫反應之相應下調。舉例而言，某些細胞激素(例如IL-10)之產生上調可能引起細胞免疫反應下調。

如本文所用之「發炎病狀或發炎疾病」廣泛地指慢性或急性發炎疾病。

如本文所用之「抑制性信號」廣泛地指經由免疫細胞上抑制性受體分子傳送之信號。信號經由活化受體(例如經由TCR、CD3、BCR或Fc分子)拮抗信號，且可引起例如以下之抑制：第二信使產生；增殖；或免疫細胞中之效應功能，例如減少之吞噬作用、抗體產生或細胞毒性、或免疫細胞無法製造介體(例如細胞激素(例如IL-2)及/或過敏性反應之介體)；或效能之發展。

如本文所用之「分離」廣泛地指將物質自其所天然產生之原始環境中移出且因此自其天然環境經人為改變。分離之物質可為例如載體系統中所包括之外源核酸、宿主細胞內所含之外源核酸，或自原始環境中獲取且因此經人為改變之任何物質(例如「分離之抗體」)。舉

例而言，如本文所用之「分離」或「純化」廣泛地指蛋白質、DNA、抗體、RNA或其生物活性部分實質上不含細胞物質或來自生物物質所源於之細胞或組織來源的其他污染性蛋白質，或實質上不含在化學合成時存在之化學前驅體或其他化學物質。措辭「實質上不含細胞物質」包括VISTA(PD-L3)蛋白質之製劑，其中該蛋白質與分離或重組產生其之細胞之細胞組分分離。

如本文所用之「K-締合」或「 K_a 」廣泛地指特定抗體-抗原相互作用之締合速率，而如本文所用之術語「 $K_{解離}$ 」或「 K_d 」係指特定抗體-抗原相互作用之解離速率。如本文所使用之術語「 K_D 」意指解離常數，其係自 K_d 與 K_a 之比率(亦即 K_d/K_a)獲得且以莫耳濃度(M)表示。可使用此項技術中良好確定之方法測定抗體之 K_D 值。

如本文所用之「標記」或「可偵測部分」廣泛地指可由光譜、光化學、生物化學、免疫化學、化學或其他物理方式偵測的組合物。

本文中「連接子：」一般指介於VISTA多肽與另一部分之間的肽序列，通常為Ig蛋白，最通常為Ig Fc區，例如人類或鼠類Ig之Fc區，其較佳為人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4之Fc區，其視情況可經修飾以減少或增加FcR結合及/或補體結合及/或其他效應功能。在一例示性實施例中，連接子相對於VISTA直接連接至Ig多肽上之VISTA融合體增強VISTA融合體之免疫抑制活性。連接子大小可在以下範圍內：至少約5個胺基酸，較通常為至少10至12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40個或40個以上胺基酸。在例示性實施例中，連接子包含甘胺酸及絲胺酸殘基，且該等甘胺酸/絲胺酸殘基之數目可包含構成該連接子之殘基之至少30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。下文揭示例示性連接子序列。

如本文所用之「低嚴格度」、「中等嚴格度」、「高嚴格度」或「極高嚴格度條件」廣泛地指用於核酸雜交及洗滌之條件。進行雜交

反應之指導可見於Ausubel等人 (2002) **Short Protocols in Molecular Biology** (第5版) John Wiley & Sons, NY。例示性特異性雜交條件包括(但不限於)：(1)低嚴格度雜交條件為在約45°C下於6×氯化鈉/檸檬酸鈉(SSC)中，繼而至少在50°C下於0.2×SSC、0.1% SDS中洗滌兩次(對於低嚴格度條件而言，洗滌溫度可升高至55°C)；(2)中等嚴格度雜交條件為在約45°C下於6×SSC中，繼而在60°C下於0.2×SSC、0.1% SDS中洗滌一或多次；(3)高嚴格度雜交條件為在約45°C下於6×SSC中，繼而在65°C下於0.2×SSC、0.1% SDS中洗滌一或多次；及(4)極高嚴格度雜交條件為在65°C下0.5 M磷酸鈉、7% SDS，繼而在65°C下於0.2×SSC、1% SDS中洗滌一或多次。

如本文所用之「哺乳動物」廣泛地指哺乳動物綱之任何及所有溫血脊椎動物，包括人類，其特徵在於皮膚上覆蓋有毛髮且雌性存在有用於養育幼仔之產生乳汁之乳腺。哺乳動物之實例包括(但不限於)羊駝、犰狳、水豚、貓、駱駝、黑猩猩、絨鼠、牛、狗、山羊、大猩猩、倉鼠、馬、人類、狐猴、美洲駝、小鼠、非人類靈長類動物、豬、大鼠、綿羊、鼩、松鼠、獭及田鼠。哺乳動物包括(但不限於)牛、狗、馬、貓、鼠類、羊、豬、靈長類動物及嚙齒動物物種。哺乳動物亦包括由華盛頓之史密森尼學會(Smithsonian Institution)之國家自然歷史博物館(National Museum of Natural History)所保存之世界哺乳動物物種(Mammal Species of the World)上所列出的任何及所有哺乳動物。

如本文所用之「天然產生之核酸分子」廣泛地指具有自然界中存在之核苷酸序列(例如編碼天然蛋白質)的RNA或DNA分子。

如本文所用之「核酸」或「核酸序列」廣泛地指呈單股或雙股形式之脫氧核糖核苷酸或核糖核苷酸寡核苷酸。該術語涵蓋含有天然核苷酸之已知類似物之核酸，亦即寡核苷酸。該術語亦涵蓋具有合成

主鏈之核酸樣結構。除非另有所述，否則特定核酸序列亦隱含地包涵其經保守修飾之變異體(例如簡併密碼子取代)及互補序列以及經明確指明之序列。術語核酸可與基因、cDNA、mRNA、寡核苷酸及聚核苷酸互換使用。

如本文所用之「寡聚合域」廣泛地指在連接至VISTA胞外域或其片段時有助於寡聚合之域。該等寡聚合域包含可利用額外二硫鍵進一步穩定之自身締合 α 螺旋(例如白胺酸拉鏈)。該等域經設計以與跨越膜之矢量摺疊(一種認為有助於多肽活體內摺疊成功能性結合蛋白之過程)相容。其實例為此項技術中已知且包括例如捲曲GCN4及COMP。

α -螺旋捲曲螺旋可能為見於蛋白質之分佈最廣泛的次單元寡聚合基元。因此，捲曲螺旋實現各種不同功能。在轉錄活化因子之數個家族中，例如短白胺酸拉鏈在使DNA結合區定位於DNA上方面起重要作用。Ellenberger等人 (1992) **Cell** 71: 1223-1237。捲曲螺旋亦用於形成中間絲蛋白之寡聚物。捲曲螺旋蛋白此外似乎在囊泡及病毒膜融合兩者中起重要作用。Skehel及Wiley (1998) **Cell** 95: 871-874。在兩者情況下，嵌埋於待融合之膜中之疏水性序列定位在由一束較長 α 螺旋組成之桿狀複合體的相同末端處。咸信此分子排列引起緊密膜並置，因為該等複合體針對膜融合裝配。捲曲螺旋常用於控制寡聚合。其發現於許多類型蛋白質中，尤其包括轉錄因子(包括(但不限於)GCN4)、病毒融合肽、SNARE複合體及某些tRNA合成酶。極長捲曲螺旋見於蛋白質中，諸如原肌凝蛋白、中間絲及紡錘體極體組分。捲曲螺旋與以平行或反向平行方向締合之高度組織方式圍繞彼此超螺旋之許多 α 螺旋有關，不過二聚體及三聚體為最常見的。螺旋可來自於相同或不同蛋白質。捲曲螺旋藉由組分螺旋聚在一起以包埋其疏水性接縫而形成。由於疏水性接縫圍繞各螺旋扭曲，故該等螺旋亦扭曲

以圍繞彼此捲曲，包埋疏水性接縫且形成超螺旋。其為將該結構定義為捲曲螺旋之相鄰螺旋之間的側鏈之特有的交錯結合，稱為鈕扣入洞填充(knobs-into-holes packing)。螺旋不必以相同方向進行以使此類相互作用出現，不過平行構形較常見。反向平行構形在三聚體中極其罕見且在五聚體中為未知的，但在分子內二聚體中較常見，其中兩個螺旋常利用短環連接。在胞外空間中，異三聚體捲曲螺旋蛋白質層黏連蛋白在基底膜形成中起重要作用。其他實例為血小板反應蛋白及軟骨寡聚基質蛋白(COMP)，其中三個(血小板反應蛋白1及2)或五個(血小板反應蛋白3、4及COMP)鏈經連接。該等分子具有花束樣外觀，且其寡聚結構之原因可能為C端域與細胞受體之多價相互作用。酵母轉錄活化劑GCN4為超過30個鑑別之含有基本區域白胺酸拉鏈(bZIP)DNA結合基元之真核生物蛋白質中的1個。Ellenberger等人 (1992) **Cell** 71: 1223-1237。bZIP二聚體為一對連續 α 螺旋，其在其羧基末端34個殘基上形成平行捲曲螺旋且逐漸朝向其胺基末端偏離以通過DNA結合位點之大溝。捲曲螺旋二聚界面經定向幾乎與DNA軸垂直，給予複合物以字母T外觀。bZIP含有在平行 α 螺旋捲曲螺旋中填充在一起之疏水性及非極性殘基之4-3七價重複序列。Ellenberger等人 (1992) **Cell** 71: 1223-1237。二聚體之穩定性引起白胺酸及非極性殘基在七價重複序列之位置a及d上之並排填充，以及有限數目之螺旋內及螺旋間鹽橋，展示於GCN4白胺酸拉鏈肽之晶體結構中。Ellenberger等人 (1992) **Cell** 71: 1223-1237。另一實例為CMP(基質蛋白-1)，其自牛氣管軟骨分離為Mr 52,000之次單元之同三聚體(Paulsson及Heinegard (1981) **Biochem J.** 197: 367-375)，其中各次單元由vWFA1模塊、單一EGF域、vWFA2模塊及跨越五個七價物之捲曲螺旋域組成。Kiss等人 (1989) **J. Biol. Chem.** 264:8126-8134；Hauser及Paulsson (1994) **J. Biol. Chem.** 269: 25747-25753。經純化之CMP之電子顯微術展示花束

樣三聚體結構，其中各次單元形成對應於捲曲螺旋由公共點出現之橢球體。Hauser及Paulsson (1994) **J. Biol. Chem.** 269: 25747-25753。基質蛋白-1中之捲曲螺旋域已經廣泛研究。三聚體結構在非變性條件下在鏈間二硫鍵完全還原之後保留。Hauser及Paulsson (1994) **J. Biol. Chem.** 269: 25747-25753。另一實例為軟骨寡聚基質蛋白(COMP)。軟骨中首先鑑別出非膠原性醣蛋白COMP。Hedbom等人 (1992) **J. Biol. Chem.** 267:6132-6136。該蛋白質為五個次單元之524 kDa同五聚體，該等次單元由後接四個表皮生長因子(EGF)樣域(EF)、七個鈣結合域(T3)及C端球形域(TC)之N端七價重複序列區(cc)組成。根據此域結構，COMP屬於血小板反應蛋白家族。在位置a及d處具有較佳疏水性殘基之七價重複序列(abcdefg)_n形成螺旋捲曲螺旋域。Cohen及Parry (1994) **Science** 263: 488-489。近來，使COMP之重組五股捲曲螺旋域(COMPcc)結晶且其結構在0.2 nm解析度下解析。Malashkevich等人 (1996) **Science** 274: 761-765。

如本文所用之「可操作地連接」廣泛地指使兩個DNA片段接合以使由該兩個DNA片段編碼之胺基酸序列保持同框。

如本文所用之「互補位」廣泛地指抗體中識別抗原之部分(例如抗體之抗原結合位點)。互補位可為抗體Fv區中之小型區域(例如15至22個胺基酸)且可含有抗體重鏈及輕鏈之部分。參見Goldsby等人 **Antigens (第3章)** Immunology (第5版) New York: W.H. Freeman and Company, 第57頁至第75頁。

如本文所用之「患者」或「個體」廣泛地指需要治療以緩和疾病病況或預防疾病病況出現或復發之任何動物。此外，如本文所用之「患者」廣泛地指任何具有風險因素、疾病病史、敏感性、症狀、徵候、先前經診斷、有患病風險或為疾病之患者群體成員的動物。患者可為臨床患者(諸如人類)或獸醫學患者，諸如伴侶動物、馴養動物、

家畜、外來動物或動物園動物。術語「個體」可與術語「患者」互換使用。

「多肽」、「肽」及「蛋白質」可互換使用且廣泛地指胺基酸殘基之聚合物。該等術語適用於一或多個胺基酸殘基為相應之天然產生之胺基酸之類似物或模擬物的胺基酸聚合物以及天然產生之胺基酸聚合物。該等術語適用於其中一或多個胺基酸殘基為相應天然產生之胺基酸之人造化學模擬物的胺基酸聚合物以及適用於天然產生之胺基酸聚合物及非天然產生之胺基酸聚合物。多肽可例如藉由添加碳水化合物殘基以形成醣蛋白來修飾。術語「多肽」、「肽」及「蛋白質」包括醣蛋白以及非醣蛋白。

如本文所用之「啟動子」廣泛地指引導核酸轉錄之一系列核酸序列。如本文所用之啟動子包括靠近起始轉錄位點之必需核酸序列，諸如在聚合酶II型啟動子的狀況下包括TATA元件。啟動子亦視情況包括遠側強化子或阻遏子元件，其位置距離起始轉錄位點可多達數千個鹼基對。「組成性」啟動子為在大部分環境及研發條件下具活性之啟動子。「誘導性」啟動子為在環境或研發調節下具活性之啟動子。

如本文所用之「防治有效量」廣泛地指化合物在投與患者以用於防治疾病或預防疾病復發時足以實現對疾病或復發之該防治的量。防治有效量可為有效預防徵候及/或症狀出現之量。「防治有效量」可視疾病及其嚴重度以及所治療患者之年齡、體重、病史、病狀易感性、既有病狀而不同。

如本文所用之「防治」廣泛地指在患者不存在徵候及/或症狀，徵候及/或症狀有所緩解或患者先前存在徵候及/或症狀的情況下進行之治療過程。防治包括在患者中預防疾病在治療疾病之後出現。此外，預防包括治療可能潛在患上疾病之患者，尤其易患疾病之患者(例如患者群體之成員、具有風險因素者，或有患病風險者)。

如本文所用之「重組」對於產物(例如細胞或核酸、蛋白質或載體)而言廣泛地指示細胞、核酸、蛋白質或載體已藉由引入異源核酸或蛋白質或改變天然核酸或蛋白質而得以修飾，或細胞源自經如此修飾之細胞。因此，舉例而言，重組細胞表現並非見於天然(非重組)形式之細胞內之基因或表現以其他方式異常表現、低表現或根本不表現之天然基因。

如本文所用之「信號序列」或「信號肽」廣泛地指出現於分泌型及膜結合型多肽N端處之含有約15個或15個以上胺基酸之肽，且其含有許多疏水性胺基酸殘基。舉例而言，信號序列含有至少約10至30個胺基酸殘基、較佳約15至25個胺基酸殘基、更佳約18至20個胺基酸殘基且甚至更佳約19個胺基酸殘基，且具有至少約35%至65%、較佳約38%至50%、且更佳約40%至45%疏水性胺基酸殘基(例如纈胺酸、白胺酸、異白胺酸或苯丙胺酸)。此項技術中亦稱為「信號肽」之「信號序列」用於將含有該序列之多肽引導至脂質雙層，且在分泌型及膜結合型多肽中裂解。

如本文所用之「特異性(或選擇性)結合」至抗體或「特異性(或選擇性)免疫反應性」或「特異性相互作用或結合」廣泛地關於蛋白質或肽(或其他抗原決定基)，在一些實施例中關於決定異源蛋白質及其他生物製劑群體中該蛋白質之存在的結合反應。舉例而言，在指定免疫分析條件下，指定抗體與特定蛋白質之結合為背景(非特異性信號)之至少兩倍且指定抗體不實質上以顯著量結合至樣品中存在之其他蛋白質。特異性或選擇性反應通常為至少兩倍背景信號或噪聲且較通常大於約10至100倍背景。

如本文所用之「可特異性雜交」及「互補」廣泛地指核酸可藉由傳統沃森-克里克(Watson-Crick)或其他非傳統類型與另一核酸序列形成氫鍵。核酸分子與其互補序列之結合自由能足以允許發揮核酸之

相關功能，例如RNAi活性。核酸分子之結合自由能之測定為此項技術中所熟知。參見例如Turner等人 (1987) **CSH Symp. Quant. Biol.** LII: 123-33；Frier等人 (1986) **PNAS** 83: 9373-77；Turner等人 (1987) **J. Am. Chem. Soc.** 109: 3783-85。互補百分比指示可與第二核酸序列形成氫鍵(例如沃森-克里克鹼基配對)之核酸分子中連續殘基之百分比(例如10個中之約至少5、6、7、8、9、10個為約至少50%、60%、70%、80%、90%及100%互補(包括50%及100%))。「完全互補」或100%互補廣泛地指核酸序列中所有連續殘基均與第二核酸序列中之相同數目之連續殘基以氫鍵鍵結。「實質性互補」係指聚核苷酸股展現約至少90%互補性，排除聚核苷酸股中經選為非互補之區域(諸如突出物)。特異性結合需要足夠互補度以避免寡聚化合物與非目標序列在需要特異性結合之條件下(亦即在生理條件下在活體內分析或治療性治療情況下，或在活體外分析情況下在進行該等分析之條件下)的非特異性結合。非目標序列通常有至少5個核苷酸不同。

如本文所用之疾病之「徵候」廣泛地指可在檢查患者時發現的任何指示疾病之異常；客觀疾病跡象，其與症狀相反，症狀為疾病之主觀跡象。

如本文所用之「固體支撐物」、「支撐物」及「基質」廣泛地指提供可連接另一物質之固體或半固體結構的任何物質，包括(但不限於)平滑支撐物(例如金屬、玻璃、塑膠、矽及陶瓷表面)以及刻花及多孔材料。

如本文所用之「個體」廣泛地指適於根據本發明加以治療的任一者，包括(但不限於)禽類及哺乳動物個體且較佳為哺乳動物。任何需要根據本發明治療之哺乳動物個體為適合的。無論何種性別與處於任何發育階段(亦即新生兒、幼兒、少年、青年、成年)的人類個體均可根據本發明進行治療。亦可出於獸醫學目的及出於藥物篩選及藥物

研發目的對動物個體，尤其哺乳動物個體，諸如小鼠、大鼠、狗、貓、牛、山羊、綿羊及馬實施本發明。「個體」可與「患者」互換使用。

如本文所用之「實質上不含化學前驅體或其他化學物」廣泛地指蛋白質與參與該蛋白質合成有關之化學前驅體或其他化學物分離之VISTA蛋白質的製備。在一個實施例中，措辭「實質上不含化學前驅體或其他化學物」包括製備VISTA蛋白質，該VISTA蛋白質具有少於約30%(以乾重計)化學物前驅體或非VISTA化學物、更佳少於約20%化學物前驅體或非VISTA化學物、更佳少於約10%化學物前驅體或非VISTA化學物且最佳少於約5%化學物前驅體或非VISTA(PD-L3)化學物。

如本文所用之疾病之「症狀」廣泛地指由患者所遭受且指示疾病的相對於正常結構、功能或感覺的任何病態現象或偏差。

如本文所用之「T細胞」廣泛地指CD4+ T細胞及CD8+ T細胞。術語T細胞亦包括1型輔助T細胞及2型輔助T細胞。

如本文所用之「療法」、「治療性」、「治療(treating)」或「治療(treatment)」廣泛地指治療疾病、阻止或減少疾病或其臨床症狀產生，及/或減輕疾病、使得疾病或其臨床症狀消退。療法涵蓋防治、治療、醫治、減少、減輕及/或緩解疾病、疾病之徵候及/或症狀。療法涵蓋減輕具有進行性疾病徵候及/或症狀(例如發炎、疼痛)之患者的徵候及/或症狀。療法亦涵蓋「防治」。術語「減少」出於療法之目的廣泛地指徵候及/或症狀在臨床上顯著減少。療法包括治療復發或反覆性徵候及/或症狀(例如發炎、疼痛)。療法涵蓋(但不限於)阻止徵候及/或症狀在任何時候之出現，以及減少現有徵候及/或症狀及消除現有徵候及/或症狀。療法包括治療慢性疾病(「維持」)及急性疾病。舉例而言，治療包括治療或預防徵候及/或症狀(例如發炎、疼痛)復發或

反覆。

如本文所用之「跨膜域」廣泛地指跨越質膜之長約15個胺基酸殘基之胺基酸序列。跨膜域更佳包括約至少20、25、30、35、40或45個胺基酸殘基且跨越質膜。跨膜域富含疏水性殘基，且通常具有 α -螺旋結構。在一實施例中，跨膜域之至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或95%以上胺基酸為疏水性的，例如白胺酸、異白胺酸、酪胺酸或色胺酸。跨膜域描述於例如Zagotta等人 (1996) **Annu. Rev. Neurosci.** 19:235-263中。

如本文所用之「轉殖基因動物」廣泛地指非人類動物，較佳為哺乳動物，更佳為小鼠，其中該動物之一或多個細胞包括「轉殖基因」。術語「轉殖基因」係指外源性DNA，其整合至細胞基因組中，轉殖基因動物自該細胞基因組發育，且其保持在成熟動物之基因組中，例如在轉殖基因動物之一或多個細胞類型或組織中引導編碼之基因產物的表現。

如本文所用之「腫瘤」廣泛地指呈組織新生物形式、特定言之呈內源性組織之自發自主且不可逆的過量生長(其或多或少脫抑制)形式之至少一種細胞或細胞塊，該生長通常與特定細胞及組織功能之或多或少顯著缺失相關。此細胞或細胞塊就其生長而言並不受自身或宿主生物體之調節機制的有效抑制，例如黑色素瘤或癌瘤。腫瘤抗原不僅包括抗原呈現於惡性細胞自身之中或之上，而且包括抗原呈現於腫瘤之基質支持組織(包括內皮細胞及其他血管組分)上。

如本文所用之「無反應」廣泛地指免疫細胞對刺激(例如經由活化受體或細胞激素之刺激)之耐性。無反應可由於例如暴露於免疫抑制劑或高劑量抗原而出現。

如本文所用之「可變區」或「VR」廣泛地指抗體中各對輕鏈與重鏈內直接與抗體結合至抗原有關的域。各重鏈在一個末端具有可變

域(V_H)，其後為大量恆定域。各輕鏈在一個末端具有可變域(V_L)且在其另一端具有恆定域；輕鏈之恆定域與重鏈之第一恆定域對準，且輕鏈可變域與重鏈之可變域對準。

如本文所用之「載體」廣泛地指一種核酸分子能夠轉運其所連接之另一核酸分子。一類載體為「質體」，其係指其他DNA區段可接合於其中的環狀雙股DNA環。另一類型之載體為病毒載體，其中可將其他DNA區段接合至病毒基因組。某些載體能夠在引入該等載體之宿主細胞中自主複製(例如具有細菌複製起點之細菌載體及游離型哺乳動物載體)。其他載體(例如，非游離型哺乳動物載體)在引入宿主細胞中之後整合至宿主細胞之基因組中，且藉此與宿主基因組一起加以複製。此外，某些載體能夠引導其可操作地連接之基因之表現。載體在本文中稱為「重組表現載體」或簡稱為「表現載體」。一般而言，適用於重組DNA技術中之表現載體通常呈質體形式。在本說明書中，由於質體為最常用之載體形式，故「質體」與「載體」可互換使用。然而，本發明意欲包括起等效作用之諸如病毒載體(例如，複製缺陷型反轉錄病毒、腺病毒及腺相關病毒)之該等其他表現載體形式。技術及程序一般根據此項技術中熟知之習知方法且如貫穿本說明書所引用及論述之各種一般及更特定的參考文獻中所述來進行。參見例如 Sambrook 等人 (2001) **Molec. Cloning: Lab. Manual** [第3版] Cold Spring Harbor Laboratory Press。可對重組DNA、寡核苷酸合成及組織培養以及轉型(例如電穿孔、脂質體轉染)使用標準技術。酶促反應及純化技術可根據製造商之說明書執行或者如此項技術中通常所實現或如本文中所述執行。

與本文所述分析化學、合成有機化學及藥用及醫藥化學有關利用之命名法、及其實驗室程序及技術，為此項技術中熟知及通常使用者。標準技術可用於化學物合成、化學物分析、醫藥製備、調配及傳

遞及病人治療。

VISTA或PD-L3

本申請案係關於一種指定為T細胞活化之含有V區免疫球蛋白之抑制因子(VISTA)或PD-L3之新穎的在結構上獨特的Ig超家族抑制性配位體，其選擇性表現於造血細胞上。胞外域帶有與B7家族配位體PD-L1之同源性，且如PD-L1，VISTA對免疫性具有深遠影響。然而，不同於PD-L1，VISTA選擇性表現在造血區室內。表現在骨髓抗原呈現細胞(APC)上最突出，不過CD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞上之表現及Foxp3⁺調節性T細胞(Treg)子集之較高表現亦明顯相關。可溶性VISTA-Ig融合蛋白質或APC上之VISTA表現有力地抑制活體外T細胞增殖、細胞激素產生及誘導T細胞中Foxp3表現。相反地，新開發之抗VISTA單株抗體在活體外干擾VISTA+ APC對T細胞反應之VISTA誘導之免疫抑制。此外，活體內抗VISTA加強T細胞介導之自體免疫疾病實驗性過敏性腦脊髓炎(EAE)之發展，且促進發展伴有後續腫瘤緩解之保護性的腫瘤特異性免疫反應。VISTA -/-小鼠之初期研究揭露自發性發炎疾病之早期指示展現特徵在於例如TNF α 、IFN γ 、IL-17F、嗜酸性粒細胞趨化因子、IP-10、MCP-1及MIG及CD4⁺及CD8⁺ T細胞含量增加之發炎表型，其展現對自體免疫(諸如EAE)之易感敏感性增高、IgG自體抗體表現增加、骨髓形成增加。此外，VISTA基因剔除展示肺、肝臟及胰臟中淋巴細胞浸潤、肺及脾臟中濾泡性增生、胃中嗜中性白血球浸潤之增加，且腎臟、腎上腺、食道、小腸及結腸未展示任何可察覺的改變。

不同於所有其他PD-配位體相關分子(例如B7-H3、H4、H6)，VISTA選擇性表現於造血細胞中，加之其深遠的抑制活性及獨特的結構特徵，說明VISTA為一種新穎的功能上不重複的免疫性之中央負向調節因子，其表現主要為T細胞及骨髓限制性的。參見 WO

2011/120013。

經最佳表徵之協同刺激性配位體為B7.1及B7.2，且其屬於Ig超家族，該Ig超家族由許多關鍵的免疫調節因子(諸如B7家族配位體及受體)組成。Ig超家族成員表現在專職性抗原呈現細胞(APC)上，且其受體為CD28及CTLA-4。CD28由原態及活化T細胞表現，且為最佳T細胞活化之關鍵。相比之下，CTLA-4在T細胞活化之後經誘導，且藉由結合至B7.1/B7.2上而抑制T細胞活化，削弱CD28介導之協同刺激。B7.1及B7.2基因剔除(KO)小鼠之應變性免疫反應受損，而CTLA-4 KO小鼠無法充分地控制發炎且發生全身性自體免疫疾病。隨時間推移，B7家族配位體已擴大為包括協同刺激性配位體，諸如B7-H2(ICOS配位體)及B7-H3；及協同抑制性配位體，諸如B7-H1(PD-L1)、B7-DC(PD-L2)、B7-H4(B7S1或B7x)及B7-H6。因此，已鑑別其他CD28家族受體。ICOS表現在活化T細胞上且結合至B7-H2。ICOS為正向協同調節因子，其對T細胞活化、分化及功能很重要。另一方面，計畫式死亡1(PD-1)負向調節T細胞反應。PD-1 KO小鼠發生狼瘡樣自體免疫疾病或T擴張型心肌病。與VISTA對比，兩種抑制性B7家族配位體PD-L1及PD-L2具有獨特的表現模式。PD-L2以誘導方式表現在DC及巨噬細胞上，而PD-L1廣泛表現在造血細胞及非造血細胞兩種類型上。與PD-1受體之免疫抑制性作用一致，使用PD-L1^{-/-}及PD-L2^{-/-}小鼠之研究已顯示兩種配位體在抑制T細胞增殖及細胞激素產生方面具有重疊作用。PD-L1缺乏在自體免疫糖尿病之非肥胖糖尿病(NOD)模型及多發性硬化症之鼠類模型(實驗性自體免疫性腦脊髓炎(EAE)兩者中增強疾病進展。PD-L1^{-/-} T細胞在兩種疾病模型中產生升高程度之促炎性細胞激素。另外，在NOD小鼠中之研究已展示PD-L1之組織表現(亦即在胰臟內)獨特地有助於其區域性控制發炎之能力。PD-L1亦在胎盤融合細胞滋養層上高度表現，其決定性地控制母體對同種異體

胎兒之免疫反應。

抗CTLA-4抗體在黑色素瘤之鼠類模型及臨床試驗中展示增強之治療性益處。經B16-GM-CSF(Gvax)疫苗接種之小鼠在與CTLA-4之抗體阻斷組合時促進B16黑色素瘤之排斥。PD-1以及PD-L1之抗體亦在鼠類腫瘤模型之較寬範圍內證明增強之抗腫瘤免疫性及宿主存活率。最後，儘管CTLA-4及PD-1屬於相同的協同抑制分子家族，但證據表明其使用不同的不重複機制來抑制T細胞活化，且在組合使用時在抗CTLA-4及抗PD-1/L1增強鼠類黑色素瘤宿主存活率方面存在協同作用。

免疫球蛋白(Ig)超家族由許多關鍵的免疫調節劑(包括B7家族配位體及受體)組成。VISTA為一種新穎的且在結構上獨特的Ig超家族抑制性配位體，其胞外域帶有與B7家族配位體PD-L1的同源性。此分子指定為T細胞活化之V域Ig抑制因子(VISTA)。VISTA主要表現在造血細胞上，且VISTA表現在骨髓抗原呈現細胞(APC)及T細胞上經高度調節。可溶性VISTA-Ig融合蛋白質或APC上之VISTA表現抑制活體外T細胞增殖及細胞激素產生。VISTA特異性單株抗體在活體外干擾表現VISTA之APC對T細胞反應之VISTA誘導之抑制。此外，抗VISTA治療加重小鼠中T細胞介導之自體免疫疾病實驗性自體免疫性腦脊髓炎之發展。最後，腫瘤細胞上VISTA過度表現干擾小鼠中活體內保護性抗腫瘤免疫性。此等發現展示VISTA(一種新穎的免疫調節分子)具有與其他Ig超家族成員不重複的功能活性，且可在自體免疫發展及癌症中之免疫監視中起作用。參見 Wang 等人 (2011) **The Journal of Experimental Medicine** 208(3): 577-92。

人類VISTA(PD-L3)或VISTA在T細胞轉錄譜篩選中鑑別為上調性分子。吾人自鼠類CD4⁺ T細胞cDNA文庫回收之相同930 bp基因產物之表徵證實大小及序列。計算機序列及結構分析預測成熟時309個胺

基酸之I型跨膜蛋白。其胞外域含有136個胺基酸之單一胞外Ig-V域，該Ig-V域連接至23個胺基酸之主幹區、21個殘基之跨膜區段及97個胺基酸之細胞質域。VISTA之細胞質尾域並不含有任何信號傳導域。使用VISTA Ig-V域之BLAST序列搜索將B7家族之PD-L1鑑別為具有邊界顯著e值得分之最接近的進化相關蛋白。VISTA與B7家族成員PD-L1、PD-L2、B7-H3及B7-H4之基於結構之序列比對突出在所有Ig-V域蛋白質中系統保守的數個胺基酸。

VISTA之表現似乎選擇性表現於造血區室中，且此蛋白質高度表現在成熟骨髓細胞(CD11b^亮)上，且在CD4⁺ T細胞、T^{reg}及CD8⁺ T細胞上表現含量較低。可溶性VISTA蛋白質(例如可溶性VISTA-Ig融合蛋白質)或APC上之VISTA表現抑制活體外CD4⁺及CD8⁺ T細胞增殖及細胞激素產生。亦觀察到抗VISTA抗體(例如抗VISTA單株抗體(13F3))阻斷活體外VISTA⁺ APC對T細胞反應之VISTA誘導之抑制。此外，已發現抗VISTA單株抗體加重EAE且增加活體內致腦炎的Th17之頻率。更進一步，本發明者意外地發現抗VISTA單株抗體在多種鼠類腫瘤模型中誘導腫瘤緩解。此等模型中骨髓來源之抑制性細胞(MDSC)上之VISTA表現極其高，提示VISTA⁺ MDSC抑制腫瘤特異性免疫。VISTA對小鼠活體外及活體內以及人類(僅活體外)之T細胞發揮免疫抑制活性，且在控制自體免疫發展及對癌症之免疫反應方面為重要介體。特定言之，資料展示VISTA為Ig超家族之新成員且含有與PD-L1具有距離序列相似性之Ig-V域。VISTA-Ig融合蛋白質或在人造APC VISTA上過度表現時抑制小鼠及人類兩者之CD4⁺及CD8⁺ T細胞增殖及細胞激素產生。另外，骨髓APC上之VISTA表現對於活體外T細胞反應為抑制性的。

腫瘤微環境中MDSC上之VISTA表現極其高。許多細胞表面分子之表型及功能分析先前表明參與T細胞之MDSC介導之抑制：

CD115、CD124、CD80、PD-L1及PD-L2由MDSC表現，但在MDSC與缺乏免疫抑制活性之來自無腫瘤小鼠之細胞之間發現在該等分子之表現含量或陽性細胞比例方面沒有差異。因此，VISTA為MDSC上之主要B7負向調節因子。

抗體介導之VISTA阻斷誘導對自體性腫瘤之保護性免疫。

VISTA為MDSC上主要的負向免疫調節性分子，其干擾保護性抗腫瘤免疫性之發展。因此，用抗VISTA抗體阻斷此分子活性可用於誘導哺乳動物(例如人類)之保護性抗腫瘤免疫性。

一種方法，該方法使用可溶性VISTA蛋白質(例如融合蛋白質)及多聚VISTA蛋白質(其包含多個複本之VISTA胞外域或其片段)及VISTA結合劑(例如小分子及其抗體或片段)，其結合VISTA或調節(促效或拮抗)VISTA活性作為免疫調節劑，且用於治療不同癌症(例如膀胱癌、卵巢癌及淋巴瘤)、自體免疫疾病、過敏、感染及發炎病狀(例如多發性硬化症及關節炎)。

VISTA為一種新穎抑制性配位體，其胞外Ig-V域帶有與兩個已知B7家族配位體計畫式死亡配位體1及2(PD-L1及PD-L2)之同源性，且活體外及活體內在APC及T細胞子集上展現獨特序列特徵及獨特表現模式(其將PD-L3或VISTA與其他B7家族配位體區分開來)。VISTA對CD4⁺及CD8⁺ T細胞增殖及分化具有功能性影響(抑制CD4⁺及CD8⁺ T細胞增殖以及細胞激素產生)。基於其表現模式及對T細胞之抑制性影響，PD-L3或VISTA顯然在T細胞與源於骨髓之APC之間同源相互作用期間充當負向調節T細胞反應之調節性配位體。

儘管VISTA(PD-L3)似乎為B7配位體家族之成員，但不同於其他B7家族配位體，此分子僅含有Ig-V域而不具有Ig-C域，且在系統發生上與B7家族受體計畫式死亡-1(PD-1)較接近。基於此點，VISTA(PD-L3)及對其具有特異性之促效劑或拮抗劑可用於調節T細胞活化及分

化，且較廣泛地用於調節控制免疫反應之調節性網路。特定言之，VISTA(PD-L3)蛋白質及 VISTA(PD-L3)促效劑或拮抗劑，較佳對 VISTA(PD-L3)具有特異性之抗體適用於調節自體免疫中之免疫反應、發炎反應及疾病、過敏、癌症、感染性疾病及移植。

T細胞中惰能(與無反應性相對)之特徵在於缺乏細胞激素(例如IL-2)產生。T細胞惰能在T細胞暴露於抗原時發生且在不存在第二信號(協同刺激性信號)情況下接受第一信號(T細胞受體或CD-3介導之信號)。在此等條件下，細胞對相同抗原之再暴露(即使再暴露在協同刺激性分子存在下發生)不能引起產生細胞激素，且因此不能增殖。然而，惰能T細胞可增加對無關抗原之反應且可在用細胞激素(例如IL-2)培養時增殖。舉例而言，T細胞之惰能亦可藉由T淋巴細胞產生IL-2之缺乏來觀察，如使用指標細胞株利用ELISA或增殖分析所量測。或者，可使用報導基因構築體。舉例而言，惰能T細胞未能啟動由在5' IL-2基因強化子控制下之異源啟動子或由強化子內可發現之AP1序列之多聚體誘導之IL-2基因轉錄。Kang等人 (1992) **Science** 257: 1134。

本發明之VISTA(PD-L3)分子基於多肽中「胞外域」或相應核酸分子之存在鑑別。在另一實施例中，本發明之VISTA(PD-L3)分子基於多肽中「細胞質域」或相應核酸分子之存在鑑別。

本文中「調節免疫細胞反應之方法」意謂活體外或活體內使免疫細胞與VISTA蛋白質或對其具有特異性之結合劑在初級信號存在下接觸，以使免疫細胞之反應得以調節。(VISTA或其調節劑之相互作用向免疫細胞傳送信號，調節免疫反應。VISTA(PD-L3)蛋白質在骨髓抗原呈現細胞(包括骨髓樹突狀細胞(DC)及巨噬細胞)上以較高含量表現，且在CD4+及CD8+ T細胞上以較低密度表現。在免疫活化時，VISTA(PD-L3)表現在骨髓APC上上調，但在CD4+ T細胞上下調)。因此，本發明之VISTA(PD-L3)核酸及多肽及其促效劑或拮抗劑適用於

例如調節免疫反應。

如本文中可互換使用之「VISTA(PD-L3)活性」、「VISTA(PD-L3)之生物活性」或「VISTA(PD-L3)之功能活性」係指由VISTA(PD-L3)-響應性細胞或組織上、或VISTA(PD-L3)多肽結合搭配物上之VISTA(PD-L3)蛋白質、多肽或核酸分子產生之活性，如活體內或活體外根據標準技術所測定。此等活性包括調節CD4+及CD8+ T細胞增殖及細胞激素產生。在另一實施例中，VISTA(PD-L3)活性為直接活性，諸如與VISTA(PD-L3)結合搭配物之締合。如本文所用，「目標分子」或「結合搭配物」為與VISTA(PD-L3)多肽天然結合或相互作用(亦即表現在T細胞上)使得VISTA(PD-L3)介導之功能得以達成之分子。或者，VISTA(PD-L3)活性為間接活性，諸如由VISTA(PD-L3)多肽所介導之細胞信號傳導活性。本文描述VISTA(PD-L3)之生物學活性。舉例而言，本發明之VISTA(PD-L3)多肽及VISTA(PD-L3)促效劑或拮抗劑可具有以下活性中之一或多者：(1)抑制或促進CD4+及CD8+ T細胞增殖以及記憶及效應細胞；(2)抑制或促進細胞激素產生，尤其抑制發炎細胞激素，諸如IL-6、TNF- α 、 γ 干擾素、 α ,MCP-1、嗜酸性粒細胞趨化因子、IP-10、MIG、IL-17及其類似物；(3)在T細胞與源於骨髓之APC之間同源相互作用期間充當負向調節T細胞反應之調節性配位體；(4)藉由抑制早期TCR活化及阻滯細胞分裂而負向調節CD4+ T細胞反應，但對細胞凋亡之直接影響最小；(5)在APC與T細胞之間同源相互作用期間抑制或促進抗原特異性T細胞活化；及/或(6)抑制或促進T細胞介導之免疫反應；(7)調節(增加或減少)免疫細胞(例如T淋巴細胞)活化；(8)調節(增加或減少)生物體(例如小鼠或人類生物體)之免疫反應(例如發炎或自體免疫或過敏性免疫反應)；(9)增加或減少T細胞上活化標誌物(諸如CD44)之表現；(10)增加或減少骨髓形成；及(11)抑制或增加T細胞或嗜中性白血球浸潤及Th17；(11)誘導或

抑制F_{oxp3}⁺細胞；(12)抑制或增加濾泡性增生。相形之下，VISTA促效劑(諸如VISTA-Ig)並不影響B細胞增殖。

「調節一或多種VISTA(PD-L3)活性之經分離之VISTA(PD-L3)蛋白質及多肽」。此等多肽將包括VISTA(PD-L3)多肽，其具有以下域中之一或多者：信號肽域、IgV域、胞外域、跨膜域及細胞質域，且較佳具有VISTA(PD-L3)活性。

協同刺激性信號之調節可能引起免疫細胞之效應功能的調節。因此，術語「VISTA活性」包括VISTA多肽結合其天然結合搭配物之能力、調節免疫細胞協同刺激性或抑制性信號之能力及調節免疫反應之能力。

免疫細胞中抑制性信號之調節引起免疫細胞增殖及/或分泌細胞激素之調節。舉例而言，本發明之VISTA(PD-L3)多肽家族較佳包含至少一個「信號肽域」。如下文描述，信號序列鑑別於天然人類VISTA(PD-L3)之胺基酸序列中且亦鑑別於天然小鼠VISTA(PD-L3)之胺基酸序列中。

在VISTA(PD-L3)異常下調及/或增加VISTA(PD-L3)活性很可能具有有益作用之情形中需要VISTA(PD-L3)活性的刺激。同樣地，在VISTA(PD-L3)異常上調及/或減少VISTA(PD-L3)活性很可能具有有益作用之情形中需要VISTA(PD-L3)活性的抑制。用於下調VISTA(PD-L3)之例示性藥劑(亦即VISTA(PD-L3)拮抗劑)包括例如反義核酸分子、識別且阻斷VISTA(PD-L3)之抗體、識別且阻斷VISTA(PD-L3)之抗體及識別且阻斷VISTA(PD-L3)反受體之抗體的組合、及阻斷VISTA(PD-L3)與其免疫細胞上天然產生之結合搭配物之相互作用的化合物(例如可溶性單價VISTA(PD-L3)分子；不結合抗原呈現細胞上Fc受體之VISTA(PD-L3)分子之可溶形式；VISTA(PD-L3)結合搭配物之可溶形式；及在個體篩選分析中鑑別之化合物)。用於上調

VISTA(PD-L3)之例示性藥劑(亦即VISTA(PD-L3)促效劑)包括例如編碼VISTA(PD-L3)多肽之核酸分子、VISTA(PD-L3)之多價形式、增加VISTA(PD-L3)表現之化合物、增強VISTA(PD-L3)與其天然產生之結合搭配物之相互作用的化合物及表現VISTA(PD-L3)之細胞。

視結合受體之VISTA(PD-L3)分子之形式而定，信號可經傳送(例如藉由引起受體交聯之VISTA(PD-L3)分子之多價形式或藉由結合至抗原呈現細胞上Fc受體之VISTA(PD-L3)的可溶形式傳送)或抑制(例如藉由VISTA(PD-L3)分子之可溶性單價形式或使用此項技術中已知之方法改變使得其並不結合至抗原呈現細胞上Fc受體之VISTA(PD-L3)之可溶形式抑制)，例如藉由與VISTA(PD-L3)分子之活化形式競爭結合至受體來進行。然而，存在可溶性分子可為刺激性之實例。各種調節藥劑之作用可易於使用如本文所述之常規篩選分析證實。

免疫反應之下調

上調VISTA(PD-L3)多肽之抑制性功能可用於下調免疫反應。下調可呈抑制或阻斷已在進行中之免疫反應的形式，或可涉及預防免疫反應之誘導。活化免疫細胞之功能可藉由下調免疫細胞反應或藉由在免疫細胞中誘導特異性機能或兩者來抑制。舉例而言，VISTA(PD-L3)可結合至抑制性受體，結合至抑制性受體之VISTA(PD-L3)形式(例如細胞表面上多價VISTA(PD-L3))可用於下調免疫反應。活化抗體可用於刺激VISTA(PD-L3)活性，其為雙特異性抗體。舉例而言，該抗體可包含VISTA(PD-L3)結合位點及靶向免疫細胞(例如T細胞、B細胞或骨髓細胞)上細胞表面受體之另一結合位點。該抗體除包含VISTA(PD-L3)結合位點以外可進一步包含結合至B細胞抗原受體、T細胞抗原受體或Fc受體之結合位點，以便使分子靶向特異性細胞群體。針對雙特異性抗體選擇此第二抗原提供待針對抑制靶向之細胞群體選擇中的靈活性。促進VISTA(PD-L3)活性或增強VISTA(PD-L3)與

其天然結合搭配物之相互作用之藥劑(例如VISTA(PD-L3)活化抗體或VISTA(PD-L3)活化小分子)可藉由其抑制免疫細胞增殖及/或效應功能之能力或在添加至活體外分析時誘導機能之能力來鑑別。舉例而言，細胞可在經由活化受體刺激信號轉導之藥劑存在下培養。許多此項技術公認之細胞活化讀數可用於在活化劑存在下量測例如細胞增殖或效應功能(例如抗體產生、細胞激素產生、吞噬作用)。測試藥劑阻斷此活化之能力可藉由量測該藥劑影響所量測之增殖或效應功能減少之能力來測定。在一個實施例中，在較低抗原濃度下，VISTA(PD-L3)免疫細胞相互作用抑制較強B7-CD28信號。在另一實施例中，在較高抗原濃度下，VISTA(PD-L3)免疫細胞相互作用可減少細胞激素產生而非抑制T細胞增殖。因此，測試化合物阻斷活化之能力可藉由在不同抗原濃度下量測細胞激素產生及/或增殖來測定。

耐受可藉由共同投與抗原與VISTA(PD-L3)促效劑而針對特異性抗原誘導。舉例而言，可對特定多肽誘導耐受性。可抑制對免疫反應為不當之過敏原或外來多肽之免疫反應。舉例而言，接受因子VIII之患者常產生針對此凝血因子之抗體。刺激VISTA(PD-L3)活性或與其天然結合搭配物之相互作用之藥劑與重組因子VIII(或藉由交聯使VISTA(PD-L3)以物理方式連接至因子VIII)的共同投與可引起免疫反應下調。

VISTA(PD-L3)促效劑及可阻斷免疫細胞上協同刺激性受體之活性的另一藥劑可用於下調免疫反應。例示性分子包括：其他PD配位體之促效劑形式、CTLA-4之可溶形式、抗B7-1抗體、抗B7-2抗體或其組合。或者，兩個各別肽(例如VISTA(PD-L3)多肽與B7-2及/或B7-1多肽之阻斷形式)或抗體組合(例如針對VISTA(PD-L3)多肽之活化抗體與阻斷性抗B7-2及/或抗B7-1單株抗體)可組合成單一組合物或分別地(同時或相繼)投與，從而下調個體之免疫細胞介導之免疫反應。此

外，具有VISTA(PD-L3)多肽活性之一或多種肽之治療活性量以及具有B7-1及/或B7-1活性之一或多種多肽可與其他下調試劑組合使用以影響免疫反應。其他免疫調節試劑之實例包括阻斷協同刺激性信號(例如針對CD28或ICOS)之抗體、經由CTLA4活化抑制性信號之抗體、及/或針對其他免疫細胞標誌物(例如針對CD40、CD40配位體或細胞激素)之抗體、融合蛋白質(例如CTLA4-Fc或PD-1-Fc)及免疫抑制藥物(例如雷帕黴素(rapamycin)、環孢靈A(cyclosporine A)或FK506)。VISTA(PD-L3)多肽亦可適用於構建治療劑，該等治療劑藉由破壞細胞而阻斷免疫細胞功能。舉例而言，VISTA(PD-L3)多肽之部分可連接至毒素上以產生能夠觸發與其結合之細胞之破壞的細胞毒性劑。

向患者中輸注該等細胞毒性劑中之一者或組合(例如VISTA(PD-L3)蓖麻毒蛋白(單獨或與PD-L1-蓖麻毒蛋白組合)可引起免疫細胞死亡，尤其根據表現較高量VISTA(PD-L3)結合搭配物之活化免疫細胞的事實。舉例而言，由於PD-1誘導於活化淋巴細胞表面上，故VISTA(PD-L3)多肽可用於藉由Fc-R依賴性機制或藉由利用結合細胞毒性藥物(例如蓖麻毒蛋白、皂草素或刺孢黴素)之消除而靶向此等特定細胞對VISTA(PD-L3)多肽之剔除，從而殺死表現VISTA受體之細胞。毒素可結合至抗VISTA(PD-L3)抗體以便靶向死亡的表現VISTA(PD-L3)之抗原呈現細胞。在另一實施例中，VISTA(PD-L3)-抗體-毒素可為雙特異性抗體。該等雙特異性抗體適用於靶向特異性細胞群體，例如使用僅在某些類型細胞(例如B淋巴細胞、單核細胞、樹突狀細胞或郎格罕氏細胞(Langerhans cell))上發現之標誌物進行。利用活化VISTA(PD-L3)活性或VISTA(PD-L3)-免疫細胞相互作用而下調免疫反應(且因此刺激VISTA(PD-L3)之負向信號傳導功能)適用於例如在組織、皮膚及器官移植情形中、在移植物抗宿主疾病(GVHD)或過敏症中、或在諸如全身性紅斑性狼瘡症及多發性硬化症之自體免疫疾

病中下調免疫反應。舉例而言，免疫細胞功能之阻斷引起組織移植中組織破壞減少。通常，在組織移植中，移植之排斥經由其由免疫細胞識別為外來的而啟動，繼而發生破壞移植之免疫反應。在移植之前或之時，促進免疫細胞上VISTA(PD-L3)活性或VISTA(PD-L3)與其天然結合搭配物之相互作用之分子(諸如VISTA(PD-L3)多肽之可溶性多聚形式)單獨或結合另一下調性藥劑之投與可抑制協同刺激性信號的產生。此外，VISTA(PD-L3)活性之促進亦可足以使免疫細胞惰能，藉此誘導個體之耐受性。

為了達成個體中之充分免疫抑制或耐受，亦可能需要阻斷其他分子之協同刺激性功能。舉例而言，可能需要藉由以下方式阻斷B7-1及B7-2之功能：在移植之前或之時，(分別地或在單一組合物一起)投與具有此等抗原中之各者活性的肽或針對此等抗原之阻斷性抗體之組合的可溶形式。或者，可能需要促進VISTA(PD-L3)之抑制性活性及抑制B7-1及/或B7-2之協同刺激性活性。可結合本發明之下調性方法使用之其他下調性藥劑包括例如經由CTLA4傳送抑制性信號之藥劑、CTLA4之可溶形式、經由CTLA4活化抑制性信號之抗體、針對其他免疫細胞標誌物之阻斷性抗體、或其他受體配位體對之可溶形式(例如破壞CD40與CD40配位體之間相互作用的藥劑(例如抗CD40配位體抗體))、針對細胞激素之抗體或免疫抑制藥物。舉例而言，活化VISTA(PD-L3)活性或VISTA(PD-L3)與其天然結合搭配物之相互作用適用於治療自體免疫疾病。許多自體免疫病症為免疫細胞不當活化之結果，該等免疫細胞針對自身組織具反應性，且促進疾病病理學中所涉及之細胞激素及自體抗體之產生。預防自體反應性免疫細胞之活化可減少或消除病徵。促進VISTA(PD-L3)(PD-L3)活性或VISTA與其天然結合搭配物相互作用之藥劑的投與可誘導自體反應性免疫細胞之抗原特異性耐受性，其可引起疾病之長期緩解。另外，藉由破壞B7分

子與協同刺激性受體之受體-配位體相互作用而阻斷免疫細胞協同刺激之藥劑的共同投與可適合用於抑制免疫細胞活化，從而預防產生可能參與疾病過程之自體抗體或細胞激素。試劑在預防或緩和自體免疫病症方面之功效可使用人類自體免疫疾病之許多充分表徵之動物模型測定。實例包括鼠類實驗性自身免疫性腦炎、在MRL/lpr/lpr小鼠或NZB雜合小鼠中之全身性紅斑性狼瘡症、鼠類自體免疫膠原蛋白關節炎、在NOD小鼠及BB大鼠中之糖尿病、及鼠類實驗性重症肌無力。參見Paul編，Fundamental Immunology, Raven Press, New York, 1989, 第840頁至第856頁。

免疫細胞活化之抑制在治療過敏症及過敏反應方面在治療上適用，例如藉由抑制IgE產生進行。促進VISTA(PD-L3)活性或VISTA(PD-L3)與其天然結合搭配物相互作用之藥劑可投與過敏個體，從而抑制個體之免疫細胞介導之過敏性反應。刺激VISTA(PD-L3)活性或與其天然結合搭配物相互作用可伴隨有與適當MHC分子一起暴露於過敏原。過敏反應本質可為全身性或局部的，視過敏原進入途徑及IgE在肥大細胞或嗜鹼性細胞上之沈積模式而定。因此，免疫細胞介導之過敏性反應可藉由投與促進VISTA(PD-L3)活性或VISTA(PD-L3)-免疫細胞相互作用之藥劑而局部地或全身地抑制。

經由刺激VISTA(PD-L3)活性或VISTA(PD-L3)與其天然結合搭配物相互作用而下調免疫反應亦可適用於治療自體性組織之自體免疫攻擊。因此，由自體免疫攻擊引起或加重之病狀(例如心臟病、心肌梗塞或動脈粥樣硬化)可藉由增加VISTA(PD-L3)活性或VISTA(PD-L3)對其天然結合搭配物之結合而得以改善或改良。因此，藉由刺激VISTA(PD-L3)活性或VISTA(PD-L3)與其反受體之相互作用而調節由自體免疫攻擊之病狀(諸如自體免疫病症(以及諸如心臟病、心肌梗塞及動脈粥樣硬化之病狀))處於本發明範疇內。

免疫反應之上調

作為上調免疫反應手段之 VISTA(PD-L3) 活性或 VISTA(PD-L3) 與其天然結合搭配物相互作用之抑制亦適用於療法。免疫反應之上調可呈增強現有免疫反應或誘發初始免疫反應之形式。舉例而言，經由抑制 VISTA(PD-L3) 活性而增強免疫反應適用於經微生物(例如細菌、病毒或寄生蟲)感染之情況或免疫抑制之情況。舉例而言，抑制 VISTA(PD-L3) 活性之藥劑(例如針對 VISTA(PD-L3) 之非活化性抗體(亦即阻斷性抗體))或 VISTA(PD-L3) 之可溶形式在治療上適用於抗體及細胞介導之反應上調的情形，引起病毒、細菌或寄生蟲之較快速或澈底清除，將為有益的。此等病狀包括病毒性皮膚疾病，諸如疱疹或帶狀疱疹，在該情況下該藥劑可局部傳遞至皮膚上。另外，全身性病毒性疾病(諸如流感、普通感冒及腦炎)可藉由全身地投與該等藥劑而得以緩解。在某些情況下，可能需要進一步投與上調免疫反應之其他藥劑，例如經由協同刺激性受體轉導信號之 B7 家族成員形式，以便進一步加強免疫反應。

可藉由以下方式增強經感染之患者之免疫反應：自患者移除免疫細胞，活體外使免疫細胞與抑制 VISTA(PD-L3) 活性或 VISTA(PD-L3) 與其天然結合搭配物相互作用之藥劑接觸，且將經活體外刺激之免疫細胞再引入患者中。在另一實施例中，增強免疫反應之方法涉及自患者分離經感染之細胞(例如經病毒感染之細胞)，用編碼無法結合其天然結合搭配物之 VISTA(PD-L3) 形式的核酸分子對其進行轉染，使得細胞在其表面上表現所有或一部分的 VISTA(PD-L3) 分子，且將經轉染之細胞再引入患者中。經轉染之細胞可能能夠活體內預防對免疫細胞之抑制性信號，且藉此活化免疫細胞。

抑制 VISTA(PD-L3) 活性或 VISTA(PD-L3) 與其天然結合搭配物相互作用之藥劑可防治性地用於針對各種多肽(例如來源於病原體之多

肽)的疫苗。針對病原體(例如病毒)之免疫性可藉由用在適當佐劑中之病毒性多肽以及抑制VISTA(PD-L3)活性之藥劑疫苗接種而誘導。或者，包含編碼病原性抗原及阻斷VISTA(PD-L3)與免疫細胞相互作用之VISTA(PD-L3)形式兩者之基因的載體可用於疫苗接種。核酸疫苗可藉由各種手段投與，例如藉由注射(例如肌肉內、皮內或用使用粒子加速器或壓縮氣體以將粒子注射至皮膚中之基因槍向表皮基因槍注射塗佈DNA之金粒子來投與。(Haynes等人 (1996) *J. Biotechnol.* 44:37)。或者，核酸疫苗可藉由非侵入性手段投與。舉例而言，純的或脂質調配之DNA可藉由經口傳遞DNA而傳遞至呼吸系統或靶向其他地方(例如派亞氏淋巴叢(Peyers patch))。Schubbert (1997) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 94: 961。減毒之微生物可用於傳遞至黏膜表面。Sizemore等人 (1995) *Science* 270:29。

疫苗中之抗原可為自身抗原。該疫苗適用於調節生物體之耐受性。使用自體抗原及阻斷VISTA(PD-L3)活性或VISTA(PD-L3)與其天然結合搭配物相互作用之藥劑的免疫接種可打斷耐受性(亦即干擾自體抗原之耐受性)。該疫苗亦可包括佐劑，諸如鋁或細胞激素(例如GM-CSF、IL-12、B7-1或B7-2)。在一個實施例中，抑制VISTA(PD-L3)活性或VISTA(PD-L3)與其天然結合搭配物相互作用之藥劑可與I類MHC多肽一起藉由例如經轉染以共表現VISTA(PD-L3)多肽或阻斷性抗體及MHC I類 α 鏈多肽及 β 2微球蛋白的細胞投與，從而引起T細胞活化且提供免於感染之免疫性。舉例而言，疫苗適用之病毒病原體包括：B型肝炎、C型肝炎、EB病毒、細胞巨大病毒、HIV-1、HIV-2、結核病、瘧疾及血吸蟲病。

VISTA(PD-L3)活性或VISTA(PD-L3)與其天然結合搭配物相互作用之抑制可適用於治療腫瘤免疫。腫瘤細胞(例如肉瘤、黑色素瘤、淋巴瘤、白血病、神經母細胞瘤或癌瘤)可與抑制VISTA(PD-L3)活性

之核酸分子一起轉染。此等分子可為例如對VISTA(PD-L3)反義之核酸分子，或可編碼非活化抗VISTA(PD-L3)抗體。此等分子亦可為抗VISTA(PD-L3)抗體之可變區。必要時，腫瘤細胞亦可用活化協同刺激之其他多肽(例如B7-1或B7-2)轉染。將經轉染之腫瘤細胞送回患者，其引起VISTA(PD-L3)活性之抑制(例如局部抑制)。或者，基因療法技術可用於靶向腫瘤細胞以用於活體內轉染。

對腫瘤細胞之免疫反應之刺激亦可藉由抑制VISTA(PD-L3)活性或VISTA(PD-L3)與其天然結合搭配物相互作用、藉由用抑制VISTA(PD-L3)活性或VISTA(PD-L3)與其天然結合搭配物相互作用之藥劑治療患者來達成。該等藥劑之較佳實例包括例如反義核酸分子、識別及阻斷VISTA(PD-L3)之抗體、阻斷VISTA(PD-L3)與其免疫細胞上天然產生之結合搭配物之相互作用的化合物(例如可溶性單價VISTA(PD-L3)分子；不結合抗原呈現細胞上Fc受體之VISTA(PD-L3)分子之可溶形式；VISTA(PD-L3)結合搭配物之可溶形式；及在個體篩選分析中鑑別之化合物)。另外，缺乏MHC I類或MHC II類分子或未能表現充分量之MHC I類或MHC II類分子之腫瘤細胞可用核酸轉染，該核酸編碼MHC I類 α 鏈多肽及 β 2微球蛋白多肽或MHC II類 α 鏈多肽及MHC II類 β 鏈多肽中之所有或一部分(例如細胞質域截短部分)，藉此在細胞表面上表現MHC I類或MHC II類多肽。適當I類或II類MHC之表現連同VISTA(PD-L3)抑制多肽或反義核酸誘導針對經轉染之腫瘤細胞的T細胞介導之免疫反應。視情況，編碼阻斷II類MHC相關多肽表現之反義構築體之基因(諸如無變化鏈)亦可與編碼VISTA(PD-L3)抑制多肽或反義核酸之DNA共轉染，從而促進腫瘤相關抗原之呈現且誘導腫瘤特異性免疫。已展示利用B7陰性鼠類腫瘤細胞之B7-1之表現誘導T細胞介導之特異性免疫，伴隨腫瘤排斥反應及對小鼠中腫瘤攻擊之延長保護。Chen等人 (1992) *Cell* 71: 1093-

1102 ; Townsend及Allison (1993) **Science** 259: 368-370 ; Baskar等人 (1993) **Proc Natl. Acad. Sci.** 90: 5687-5690。因此，人類個體中免疫細胞介導之免疫反應之誘導可足以克服個體之腫瘤特異性耐受。在另一實施例中，免疫反應可藉由抑制VISTA(PD-L3)活性或VISTA(PD-L3)與其天然結合搭配物相互作用而刺激，使得先存耐受性被克服。舉例而言，針對個體無法增加顯著免疫反應之抗原(例如腫瘤特異性抗原)的免疫反應可藉由投與抑制VISTA(PD-L3)活性之活性或VISTA(PD-L3)結合至其天然結合搭配物之能力的藥劑來誘導，可在主動免疫接種過程中用作對外來抗原之增強免疫反應的佐劑。

免疫細胞可自個體獲得，且在抑制VISTA(PD-L3)活性或VISTA(PD-L3)與其天然結合搭配物相互作用之藥劑存在下離體培養，從而擴增免疫細胞群體。在另一實施例中，接著將免疫細胞投與個體。免疫細胞可藉由例如提供免疫細胞以如此項技術中已知之初級活化信號及協同刺激性信號而受刺激，從而活體外增殖。VISTA(PD-L3)多肽之各種形式或抑制VISTA(PD-L3)活性之藥劑亦可用於協同刺激免疫細胞之增殖。在一個實施例中，免疫細胞根據WO 94/29436中所述方法離體培養。協同刺激性分子可為可溶性的，連接至細胞膜或連接至固體表面(諸如珠粒)上。

在進行本文中所述之方法中之任一者中，藉由投與一或多種其他藥劑而上調免疫反應處於本發明範疇之內。舉例而言，已知刺激免疫反應之其他藥劑(諸如細胞激素、佐劑或協同刺激性分子或其配位體之刺激形式)的使用可與抑制VISTA(PD-L3)活性或VISTA(PD-L3)與其天然結合搭配物相互作用之藥劑組合使用。

鑑別藉由調節VISTA(PD-L3)活性或T細胞上VISTA(PD-L3)與其反受體之相互作用而調節之細胞激素

本文所述之VISTA(PD-L3)分子可用於鑑別細胞激素，該等細胞

激素回應於 VISTA(PD-L3)活性或 VISTA(PD-L3)與其天然結合搭配物相互作用之調節由免疫細胞產生或其產生在免疫細胞中經增強或抑制，免疫細胞可用初級活化信號活體外次最佳地刺激，舉例而言，T 細胞可用佛波醇酯、抗 CD3 抗體或較佳抗原與 MHC II 類分子結合刺激，且例如由 B7 家族抗原之刺激形式、例如由用編碼 B7 多肽之核酸轉染且在其表面上表現該肽之細胞、或由該肽之可溶性刺激形式給出協同刺激性信號。細胞可接著與表現 VISTA(PD-L3)之細胞(例如針對 VISTA(PD-L3)之抗體)接觸。釋放至培養基中之已知細胞激素可藉由 ELISA 或藉由阻斷細胞激素以抑制免疫細胞增殖或由該細胞激素誘導之其他細胞類型增殖之抗體的能力來鑑別。舉例而言，IL-4 ELISA 套組可獲自 Genzyme(Cambridge, MA.)，如同 IL-7 阻斷性抗體一樣。針對 IL-9 及 IL-12 之阻斷性抗體可獲自 Genetics Institute(Cambridge, MA.)。接著可測定刺激性或阻斷性 VISTA(PD-L3)活性或 VISTA(PD-L3)與其結合搭配物之相互作用對細胞激素概況的作用。如上文指示及實例中所示，VISTA(PD-L3)顯然抑制免疫細胞表現 IL-2 及 γ 干擾素。

如上所述之活體外免疫細胞協同刺激分析亦可用於鑑別可藉由調節 VISTA(PD-L3)活性而調節之新穎細胞激素的方法。舉例而言，刺激 CD28/CTLA4 路徑似乎增強 IL-2 分泌，ICOS 路徑之刺激似乎增強 IL-10 分泌。Hutloff 等人 (1999) *Nature* 397: 263。若在協同刺激時誘導之特定活性(例如免疫細胞增殖)無法藉由添加已知細胞激素之阻斷性抗體來抑制，則該活性可能由未知細胞激素之作用產生。在協同刺激之後，此細胞激素可藉由習知方法自培養基純化，且其活性利用其誘導免疫細胞增殖之能力量測。

為了鑑別可在誘導耐受性中起作用之細胞激素，可使用如上所述之活體外 T 細胞協同刺激分析。在此情況下，T 細胞將發出初級活

化信號，且與所選細胞激素接觸，但不會發出協同刺激性信號。在洗滌免疫細胞且使其靜息之後，細胞將用初級活化信號及協同刺激性信號兩者再攻擊。若免疫細胞不響應(例如增殖或產生細胞激素)，則其已變得耐受，且細胞激素並未預防耐受性之誘導。然而，若免疫細胞響應，則細胞激素已預防耐受性之誘導。能夠預防耐受性誘導之該等細胞激素可連同阻斷B淋巴細胞抗原之試劑經靶向以達成活體內阻斷，作為誘導移植受體或患有自體免疫疾病之個體之耐受性之較有效手段。舉例而言，吾人可向個體投與細胞激素阻斷性抗體以及促進VISTA(PD-L3)活性或VISTA(PD-L3)與結合搭配物相互作用之藥劑。

因此，概括而言，計畫式死亡配位體(PDL)家族之新穎成員目前已經鑑別，其由Treg細胞表現。此新穎蛋白質已指定為VISTA(PD-L3)。此PD-L家族之受體為含有單一IgV域之I型跨膜蛋白，而配位體為表現IgV及IgC胞外域兩者之I型跨膜蛋白。如PDL家族之其他成員，VISTA(PD-L3)活體外協同刺激T細胞之 α CD3增殖。另外，VISTA(PD-L3)之表現在 α CD3活化之Treg中增加且在 α GITR存在下減少。

第二TNF樣蛋白質亦已鑑別為在 α CD3/ α GITR刺激時上調。此蛋白質已指定為Treg-sTNF。此等蛋白質可能與免疫性之接觸依賴性及旁分泌抑制有關，且因此適用於調節(例如抑制或刺激)免疫反應且適用於治療涉及Treg信號傳導之疾病及病狀。舉例而言，VISTA(PD-L3)蛋白質可用作協同刺激性信號以用於刺激或增強免疫細胞活化。VISTA(PD-L3)蛋白質及VISTA(PD-L3)結合劑及VISTA(PD-L3)促效劑及拮抗劑尤其適用於治療需要調節T細胞免疫(例如調節T細胞活化、分化及增殖，且特定言之調節CD4+及CD8+ T細胞增殖、細胞激素產生及在T細胞與源於骨髓之APC之間同源相互作用期間的T細胞反應)之免疫病狀。

VISTA及VISTA結合物多肽

本發明提供VISTA及VISTA結合物多肽。本發明者意外地發現VISTA及VISTA結合物多肽充當負向免疫調節劑。例示性VISTA多肽提供於SEQ ID NO: 2、4及5中。本發明之VISTA(PD-L3)分子包括以下域中之至少一或多者：信號肽域、IgV域、胞外域、跨膜域或細胞質域。本發明之經分離之多肽(較佳VISTA(PD-L3)多肽)可包含與SEQ ID NO: 2或4或5之胺基酸序列充分一致的胺基酸序列或由與SEQ ID NO: 1或3或其片段或互補序列充分一致之核苷酸序列編碼的胺基酸序列。如本文所用，術語「充分一致」係指第一胺基酸或核苷酸序列含有與第二胺基酸或核苷酸序列充分或最小數目之一致或等同(例如具有類似側鏈之胺基酸殘基)的胺基酸殘基或核苷酸，使得第一及第二胺基酸或核苷酸序列共有共同的結構域或基元及/或共同的功能活性。舉例而言，在共同結構域之胺基酸序列上具有至少30%、40%或50%同源性、較佳60%同源性、更佳70%至80%、且甚至更佳90%至95%同源性且含有至少一個且較佳兩個結構域或基元的共有該等共同結構域之胺基酸或核苷酸序列在本文中定義為充分一致。此外，共有至少30%、40%或50%、較佳60%、更佳70%至80%或90%至95%同源性且共有共同功能活性之胺基酸或核苷酸序列在本文中定義為充分一致。VISTA多肽之胞外域可包含IgV域且可包括信號肽域。參見圖1A至圖1E及圖23A-圖23C。

VISTA(PD-L3)多肽可具有至少一個胞外域以及信號肽域、IgV域、跨膜域及細胞質域中之一或多者，且較佳由具有在嚴格雜交條件下與包含本文中SEQ ID NO: 1或3之核苷酸序列之互補序列之核酸分子雜交的核苷酸序列的核酸分子編碼。例示之經分離之人類及鼠類VISTA(PD-L3)cDNA之核苷酸及胺基酸序列及預測之人類VISTA(PD-L3)多肽的胺基酸序列含於本文中序列清單中。

本發明之VISTA(PD-L3)多肽可基於「跨膜域」之存在鑑別。本文中鑑別PDL3之跨膜域區。參見例如圖1A至圖1E及圖23A至圖23C。本發明之VISTA(PD-L3)分子可基於多肽或相應核酸分子中不存在「IgC域」及存在「IgV域」鑑別。構成IgV域之天然人類及鼠類VISTA(PD-L3)多肽之胺基酸殘基可在圖1A至圖1E及圖23A至圖23C中看到。IgV域之存在很可能為VISTA(PD-L3)結合至其天然結合搭配物所需。

編碼VISTA多肽之核酸可使用標準分子生物技術修飾，該等技術產生包含至少一個VISTA及VISTA結合物之變異體多肽，其包括(但不限於)在胺基酸序列中之缺失、添加及取代，保留VISTA及VISTA結合物之特異性抗原性(例如VISTA多肽由抗VISTA抗體結合)。另外，包含至少一個VISTA多肽之變異體多肽亦可保留VISTA多肽之抗原性(例如在於個體中免疫接種之後，分別針對VISTA多肽及變異體VISTA多肽產生特異性免疫反應)。VISTA及VISTA結合物多肽可與藥物載劑一起調配以製造適用作「癌症疫苗」之抗原組合物(例如誘發針對VISTA及VISTA結合物之特異性免疫反應之醫藥組合物，其在於個體中免疫接種之後產生抗腫瘤抗體)。本文所述之VISTA多肽及VISTA結合物可用於治療自體免疫病症及發炎性疾病。

多肽衍生物及類似物

應瞭解本文中所述之多肽可為降解產物、合成肽或重組肽以及肽模擬物、合成肽、類肽及半類肽(例如肽類似物，其可具有例如修飾，使肽在身體內變得較穩定或較能夠滲入細胞中)。本文中所述之VISTA及VISTA結合物多肽之修飾包括(但不限於)N端修飾、C端修飾、肽鍵修飾(例如 $\text{CH}_2\text{-NH}$ 、 $\text{CH}_2\text{-S}$ 、 $\text{CH}_2\text{-S=O}$ 、 O=C-NH 、 $\text{CH}_2\text{-O}$ 、 $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ 、 S=C-NH 、 CH=CH 或 CF=CH)、主鏈修飾及殘基修飾。製備肽模擬物化合物之方法為此項技術中所熟知。Martin, (2010)

Quantitative Drug Design: A Critical Introduction [第2版] CRC Press。

肽內之肽鍵(-CO-NH-)可經例如以下取代：N甲基化之鍵(-N(CH₃)-CO-)、酯鍵(-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-)、酮亞甲基鍵(-CO-CH₂-)、 α -氮雜鍵(-NH-N(R)-CO-)(其中R為任何烷基，例如甲基)、碳橋鍵(carba bond)(-CH₂-NH-)、羥基伸乙基鍵(-CH(OH)-CH₂-)、硫醯胺鍵(-CS-NH-)、烯烴雙鍵(-CH=CH-)、逆醯胺鍵(retro amide bond)(-NH-CO-)、肽衍生物(-N(R)-CH₂-CO-)，其中R為天然存在於碳原子上之「正」側鏈。此等修飾沿肽鏈可存在於任何鍵處且甚至可同時存在於數處(2至3處)。

天然芳族胺基酸 Trp、Tyr 及 Phe 可經合成非天然酸取代，諸如苯基甘胺酸、TIC、萘基丙胺酸(Nol)、苯丙胺酸之環甲基化衍生物、苯丙胺酸之鹵化衍生物或鄰甲基-酪胺酸。除上述之外，本發明多肽亦可包括一或多個經修飾胺基酸或一或多個非胺基酸單體(例如脂肪酸、複合碳水化合物)，例如羥脯胺酸、磷酸絲胺酸及磷酸蘇胺酸；及其他特殊胺基酸，包括(但不限於)2-胺基己二酸、羥基離胺酸、異鎖鏈素(isodesmosine)、正纈胺酸、正白胺酸及鳥胺酸。此外，術語「胺基酸」包括D-胺基酸及L-胺基酸。

由於本發明之多肽較佳用於需要肽呈可溶形式之治療劑中，所以本發明多肽可包含一或多個非天然或天然極性胺基酸，包括(但不限於)絲胺酸及蘇胺酸，其能夠因其含有羥基之側鏈而提高肽溶解度。

本發明之多肽可呈線性形式，不過應瞭解在一些情況下亦可使用。

本文所述之VISTA及VISTA結合物多肽可由已經改變從而表現其之細胞(例如重組)中純化。編碼VISTA及VISTA結合物多肽之DNA

序列可插入表現載體中，隨後轉型(或轉染)於適當宿主細胞中及/或表現於轉殖基因動物中。如此表現之VISTA及VISTA結合物多肽可接著利用此項技術中已知之方法分離。參見例如Maniatis等人 (2001) **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** [第3版] Cold Spring Harbor Laboratory Press。

本發明之多肽可諸如藉由使用標準固相技術而以生物化學方式合成。此等方法包括單獨固相合成、部分固相合成法、片段縮合、經典溶液合成。在肽相對較短(亦即10 kDa)時及/或在其不可由重組技術產生(亦即並非由核酸序列所編碼)且因此涉及不同化學時較佳使用此等方法。固相肽合成程序為此項技術中所熟知且由Stewart (1984) **Solid Phase Peptide Syntheses** [第2版] Pierce Chemical Company及Benoiton (2005) **Chemistry of Peptide Synthesis** CRC Press進一步描述。合成肽可藉由製備型高效液相層析純化且其組成可經由胺基酸定序來確定。參見Creighton (1992) [第2版] **Proteins, Structures and Molecular Principles** W.H. Freeman and Company；Aguilar (2004) [編] **HPLC of Peptides and Proteins: Methods and Protocols** Humana Press；Simpson (2002) **Protein Sequencing Protocols** [第2版] Humana Press。

在需要大量本發明之多肽之情況下，本發明之多肽可使用重組技術產生，該等重組技術諸如由以下描述：Invitrogen (2002) 「**Guide to Baculovirus Expression Vector Systems (BEVs) and Insect Culture Techniques**」 **Instruction Manual**；Hatti-Kaul及Mattiasson (2003) [編] **Isolation and Purification of Proteins**；Ahmed (2004) **Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification and Characterization** CRC Press。其他重組技術諸如由例如以下描述：Bitter等人 (1987) **Methods in Enzymol.** 153: 516-544；Studier等人

(1990) **Methods in Enzymol.** 185: 60-89 ; Brisson等人 (1984) **Nature** 310: 511-514 ; Takamatsu等人 (1987) **EMBO J.** 6: 307-311 ; Coruzzi等人 (1984) **EMBO J.** 3: 1671-1680 ; 及 Brogli等人 (1984) **Science** 224: 838-843 ; Gurley等人 (1986) **Mol. Cell. Biol.** 6: 559-565 ; 及 Weissbach及 Weissbach (1988) **Methods for Plant Molecular Biology**, Academic Press, NY, 第VIII部分, 第421頁至第463頁。

多肽序列變異體

對於本文所述之任何VISTA及VISTA結合物序列，其他表徵或最佳化可藉由以下方式達成：系統地添加或移除胺基酸殘基以產生較長或較短肽，且測試該等肽及藉由使較長或較短尺寸之窗自該點沿著抗原向上或向下步移而產生之序列。將此產生新候選目標之方法與如此項技術中已知或如本文所述在免疫原性分析中測試基於該等序列之抗原分子之有效性聯用可對抗原進行進一步操控。進一步地，該等最佳化之序列可藉由如此項技術中已知及/或本文中所述之例如添加、缺失或其他突變來調整，從而使VISTA及VISTA結合物進一步最佳化(例如增加血清穩定性或循環半衰期、增加熱穩定性、增強傳遞、增強免疫原性、增加溶解度、靶向特定活體內位置或細胞類型)。

本文中所述之VISTA及VISTA結合物多肽可包含保守取代突變(亦即一或多個胺基酸由類似胺基酸取代)。舉例而言，保守性取代係指胺基酸經相同一般類別中之另一胺基酸取代，例如一個酸性胺基酸經另一酸性胺基酸取代、一個鹼性胺基酸經另一鹼性胺基酸取代，或一個中性胺基酸經另一中性胺基酸取代。

VISTA及VISTA結合物多肽序列可與SEQ ID NO: 2、4或5之多肽序列中之任何一者或多者具有至少約60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列

同源性。本發明更佳涵蓋與SEQ ID NO: 2、4或5之VISTA及VISTA結合物多肽序列之多肽序列中之任何一者或多者的至少約95%序列同源性、甚至更佳至少約98%序列同源性、且更佳至少約99%序列同源性的多肽序列。測定胺基酸序列以及核酸序列之間的同源性之方法為一般技術者所熟知。參見例如Nedelkov及Nelson (2006) **New and Emerging Proteomic Techniques** Humana Press。

因此，VISTA及VISTA結合物多肽可與多肽序列具有至少約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。舉例而言，VISTA及VISTA結合物多肽可與SEQ ID NO: 2、4或5具有至少約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。

術語同源性或一致性應理解為意謂與其他蛋白質相同之胺基酸的數目(一致性)，以百分比表示。較佳藉助於電腦程式比較既定序列與其他蛋白質來測定一致性。若彼此進行比較之序列的長度不同，則以將短序列與較長序列所共有之胺基酸數目測定為一致性百分比的方式測定一致性。一致性可通常藉助於公開可獲得之已知電腦程式測定，諸如ClustalW. Thompson等人 (1994) **Nucleic Acids Research** 22: 4673-4680。ClustalW可自歐洲分子生物學實驗室(European Molecular Biology Laboratory)公開獲得且可自多種網際網路頁面(尤其IGBMC(分子細胞及遺傳學研究所(Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire))及EBI及所有鏡像EBI網際網路頁面(歐洲生物資訊學研究所(European Bioinformatics Institute))下載。若使用ClustalW電腦程式1.8版測定例如本申請案之參考蛋白質與其他蛋白質之間的一致性，則設定以下參數：KTUPLE = 1，TOPDIAG = 5，

WINDOW = 5 , PAIRGAP = 3 , GAOPEN = 10 , GAPEXTEND = 0.05 , GAPDIST = 8 , MAXDIV = 40 , MATRIX = GONNET , ENDGAPS(OFF) , NOPGAP , NOHGAP 。亦參見在線可獲得之歐洲生物資訊學研究所(EBI)工具箱及 Smith (2002) **Protein Sequencing Protocols** [第2版] Humana Press 。

一種發現相似序列之可能情況為進行序列資料庫研究。此處，可輸入一或多個序列，正如所知，作為一次查詢。接著使用統計學電腦程式將此查詢序列與所選資料庫中存在之序列相比較。該等資料庫查詢(blast搜尋)為熟練技術人員所知且可在不同供應者處進行。若例如在NCBI(國家生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology Information))處進行該資料庫查詢，則應使用各別比較查詢之標準設置。對於蛋白質序列比較(blastp)，此等設定為：限制條件entrez = 不活化；過濾 = 較低複雜性活化；期望值 = 10；給定序列長度(word size) = 3；矩陣 = BLOSUM62；空位罰分：存在 = 11，延伸 = 1。該查詢之結果為，除其他參數之外，在資料庫中發現查詢序列與類似序列之間的一致性程度。

VISTA及VISTA結合物包括該等多肽之功能性片段。該多肽之「功能性片段」包括編碼該VISTA及VISTA結合物之基因或cDNA之片段，該片段能夠誘發免疫反應(例如體液性或細胞免疫反應)。因此，舉例而言，本發明之VISTA及VISTA結合物之片段對應於有助於抗原免疫原性之胺基酸殘基，且該片段可用於充當抗原以誘發免疫反應(例如體液性或細胞免疫反應)。本發明之此態樣亦包括本發明多肽之經差異剪接之同工型及轉錄起點。本發明之多肽亦可包含VISTA及VISTA結合物之片段、衍生物及對偶基因變異體。用於製造VISTA及VISTA結合物多肽片段之方法及材料為此項技術中所熟知。參見例如 Maniatis等人 (2001) **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** [第3

版] (Cold Spring Harbor Laboratory Press)。

變異的VISTA及VISTA結合物多肽可保留其結合其相應抗體之抗原特異性(例如變異的VISTA多肽由抗VISTA抗體結合)。完全抗原性變異體可僅含有保守性變異或非關鍵殘基或非關鍵區中之變異。抗原性變異體亦可含有相似胺基酸之取代，其不引起抗原性出現變化或出現顯著變化。或者，該等取代可在某種程度上正向或負向地影響抗原性。非抗原性變異體通常含有一或多個非保守性胺基酸取代、缺失、插入、倒位(inversion)或截短，或抗原決定基之關鍵殘基或關鍵區中之取代、插入、倒位或缺失。用於修飾VISTA及VISTA結合物多肽同時維持該等多肽對其相應抗體之特異性抗原性之分子生物學及生物化學技術為此項技術中所熟知。參見例如Ho等人 (1989) **Gene** 77(1): 51-59；Landt等人 (1990) **Gene** 96(1): 125-128；Hopp及Woods (1991) **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 78(6): 3824-3828；Kolaskar及Tongaonkar (1990) **FEBS Letters** 276(1-2): 172-174；及Welling等人 (1985) **FEBS Letters** 188(2): 215-218。

「充當VISTA促效劑(模擬物)或VISTA拮抗劑之VISTA多肽之變異體」

VISTA多肽之變異體可藉由誘變(例如不連續的點突變或VISTA多肽之截短)而產生。VISTA多肽之促效劑可實質上保留相同的VISTA多肽之天然產生之形式之生物活性或該等活性之子集。VISTA多肽之拮抗劑可藉由例如競爭地調節VISTA多肽之VISTA介導之活性而抑制VISTA多肽之天然產生形式活性中的一或多者。因此，特定生物學效應可由用具有有限功能之變異體進行治療來達成。舉例而言，個體可用具有多肽之天然產生形式之生物活性之子集的變異體治療，其相對於用VISTA多肽之天然產生之形式治療在個體中具有較少副作用。

充當VISTA促效劑(模擬物)或VISTA拮抗劑之VISTA多肽之變異

體可針對VISTA多肽促效劑或拮抗劑活性藉由篩選VISTA多肽突變體(例如截短突變體)之組合性文庫來鑑別。可用主題VISTA(PD-L3)結合劑治療之疾病先前已經鑑別且包括各種發炎、自體免疫、癌症、過敏及感染病症。尤其較佳適應症為多發性硬化症。

肽模擬物

除僅由天然產生之胺基酸組成之VISTA多肽以外，亦提供VISTA肽模擬物。在醫藥行業中，肽類似物通常用作具有與模板肽之該等性質類似之性質的非肽藥物。此等類型之非肽化合物稱為「肽模擬物(peptide mimetics或peptidomimetics)」(Fauchere (1986) **Adv. Drug Res.** 15: 29；**Advances in Amino Acid Mimetics and Peptidomimetics** (第2卷) Andrew Abell (編) (1999) JAI Press, Inc.及Evans等人 (1987) **J. Med. Chem.** 30: 1229)且通常藉助於電腦化分子模型化來開發。結構上類似於治療適用肽之肽模擬物可用於產生等效之治療性或防治性作用。肽模擬物通常在結構上與範例多肽(亦即，具有生物學或藥理學活性之多肽，諸如人類或小鼠VISTA)類似，但具有一或多個肽鍵，該一或多個肽鍵視情況經選自由以下組成之群的鍵置換： $-\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ (順式及反式)、 $-\text{COCH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 及 $-\text{CH}_2\text{SO}-$ ，該置換利用此項技術中已知及以下參考文獻進一步描述之方法進行：Spatola in *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins* Weinstein, B編, Marcel Dekker, New York, 第267頁 (1983)；Spatola, *Vega Data* (March 1983), 第1卷, 第3期, 「Peptide Backbone Modifications」；Morley (1980) **Trends. Pharm. Sci.** 第463頁至第468頁；Hudson等人 (1979) **Int. J. Pept. Prot. Res.** 14:177-185 ($-\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$)；Spatola等人 (1986) *Life. Sci.* 38:1243-1249 ($-\text{CH}_2-\text{S}-$)；Hann, (1982) **J. Chem. Soc Perkin. Trans. I** 307-314 ($-\text{CH}-\text{CH}-$ ，順式及反式)；Almquist等人 (1980) **J.**

Med. Chem. 23:1392-1398 (-COCH₂-)；Jennings-White 等人 (1982) **Tetrahedron Lett.** 23:2533 (-COCH₂-)；(-CH(OH)CH₂-)；Holladay 等人 (1983) **Tetrahedron. Lett.** 24:4401-4404 (-C(OH)CH₂-)；及Hruby (1982) **Life Sci.** 31:189-199 (-CH₂-S-)。尤其較佳之非肽鍵為-CH₂NH-。該等肽模擬物相較於多肽實施例可具有顯著優勢，包括例如：製備較經濟、化學穩定性較大、藥理學性質(半衰期、吸收、效力、功效)增強、特異性改變(例如廣譜生物活性)、抗原性降低及其他優勢。標記肽模擬物通常涉及使一或多個標記直接或經由間隔基(例如醯胺基)共價連接至肽模擬物上無干擾的位置，該等位置可藉由定量結構活性資料及/或分子模型化來預測。該等無干擾之位置一般為不與和肽模擬物結合以產生治療作用之巨分子形成直接接觸之位置。衍生化(例如標記)肽模擬物不應實質上干擾肽模擬物之所需生物學或藥理學活性。

具有相同類型D胺基酸(例如D-離胺酸代替L離胺酸)之VISTA胺基酸序列之一或多個胺基酸之系統取代可用於產生較穩定肽。另外，包含VISTA胺基酸序列或實質上一致序列變異之限制性肽可利用此項技術中已知之方法(Rizo及Gierasch (1992) **Annu. Rev. Biochem.** 61:387)產生；例如藉由添加能夠形成使肽環化之分子內雙硫橋之內部半胱胺酸殘基來產生。本文中鑑別之VISTA多肽之胺基酸序列將使熟習此項技術者能夠製造對應於VISTA肽序列及其序列變異體之多肽。該等多肽可藉由表現編碼VISTA肽序列(時常作為較大多肽之一部分)之聚核苷酸而在原核生物或真核生物宿主細胞中製造。或者，該等肽可藉由化學方法合成。在重組宿主中表現異源多肽、化學合成多肽及活體外轉譯之方法為此項技術中所熟知。某些胺基-末端及/或羧基-末端修飾及/或肽延伸至核心序列可提供有利的物理、化學、生物化學及藥理學性質，諸如：增強穩定性、增加效力及/或功效、耐血清蛋白酶

性、所需藥物動力學性質以及其他性質。肽可治療性用於治療患者疾病，例如藉由改變協同刺激來達成。

對功能而言必需之胺基酸可藉由此項技術中已知之方法來鑑別，諸如定點突變誘發或丙胺酸掃描突變誘發。Cunningham等人 (1989) **Sci.** 244: 1081-85。後者程序將單一丙胺酸突變引入分子中之各殘基處。接著測試所得突變體分子之生物活性，諸如抗原決定基結合或活體外ADCC活性。對於配位體-受體結合關鍵之位點亦可藉由結構分析(諸如結晶學、核磁共振或光親和標記)來測定。Smith等人 (1992) **J. Mol. Biol.** 224: 899-904；de Vos等人 (1992) **Sci.** 255: 306-12。

舉例而言，一類取代為保守性胺基酸取代。該等取代為用具有類似特徵之另一胺基酸取代VISTA及VISTA結合物多肽中之給定胺基酸的取代。通常視作保守性取代者為脂族胺基酸Ala、Val、Leu及Ile間的置換(一個胺基酸置換為另一胺基酸)；羥基殘基Ser與Thr互換；酸性殘基Asp與Glu交換；醯胺殘基Asn與Gln之間的取代；鹼性殘基Lys與Arg交換；芳族殘基Phe、Tyr間的置換。胺基酸改變很可能在表型上沉默之指導問題見於例如Bowie等人 (1990) **Sci.** 247: 1306-10中。因此，一般技術者應瞭解本發明者具有肽變異體，而不描繪所有特定變異體。對於胺基酸序列，熟習此項技術者應瞭解，對核酸、肽、多肽或蛋白質序列進行的改變、添加或缺失所編碼序列中單個胺基酸或小百分比胺基酸的個別取代、缺失或添加為「經保守修飾之變異體」，其中該改變使得胺基酸經化學上相似之胺基酸取代。提供功能上相似胺基酸之保守性取代表為在此項技術中所熟知。該等經保守修飾之變異體為除了且並不排除本發明之多形現象變異體、種間同系物及對偶基因。參見例如Creighton (1992), **Proteins: Structures and Molecular Properties** [第2版] W.H. Freeman。

此外，多肽常含有除二十種「天然產生之」胺基酸以外的胺基酸。另外，許多胺基酸(包括末端胺基酸)可利用自然過程(諸如處理及其他轉譯後修飾)或利用此項技術中熟知之化學修飾技術修飾。已知修飾包括(但不限於)乙醯化、醯化、ADP-核糖基化、醯胺化、黃素之共價連接、血紅素部分之共價連接、核苷酸或核苷酸衍生物之共價連接、脂質或脂質衍生物之共價連接、磷脂醯肌醇之共價連接、交聯、環化、二硫鍵形成、脫甲基化、共價交聯之形成、胱胺酸之形成、焦麩胺酸之形成、甲醯化、 γ -羧化、糖基化、GPI錨定形成、羥基化、碘化、甲基化、豆蔻醯化、氧化、蛋白水解處理、磷酸化、異戊烯化、外消旋化、硒化、硫酸化、轉運RNA介導之將胺基酸添加至蛋白質中(諸如精胺醯化)及泛素化。參見 Creighton (1992) **Proteins: Structure and Molecular Properties** [第2版] 及 Lundblad (1995) **Techniques in Protein Modification** [第1版]。可獲得關於此主題之許多詳細綜述。參見例如 Wold (1983) **Posttranslational Covalent Modification of Proteins** Acad. Press, NY；Seifter等人 (1990) **Meth. Enzymol.** 182: 626-46；及 Rattan等人 (1992) **Ann. NY Acad. Sci.** 663: 48-62。

片段

VISTA多肽之生物學活性部分包括參與VISTA分子與非VISTA分子(例如VISTA之天然配位體)之間相互作用的VISTA多肽之片段。VISTA多肽之生物學活性部分包括包含與VISTA多肽之胺基酸序列(例如SEQ ID NO: 2、4或5中所示胺基酸序列)充分一致或衍生自該等胺基酸序列之胺基酸序列的肽，其與全長VISTA多肽相比包括較少胺基酸，且展現VISTA多肽之至少一種活性。生物學活性部分通常包含具有VISTA多肽之至少一種活性之域或基元，該至少一種活性例如為調節(抑制)CD4 T細胞對抗CD3之增殖反應、以抗原特異性方式抑制同

源CD4 T細胞之增殖反應、對特定細胞激素之表現的作用。VISTA多肽之生物學活性部分可為例如長度為25、50、75、100、125、150、175、200、225個或225以上胺基酸之多肽。VISTA多肽之生物學活性部分可用作供開發調節VISTA介導之活性(例如免疫細胞活化)用之目標。

VISTA多肽之生物學活性部分可包含胞外域之至少一部分。VISTA多肽之生物學活性部分可含有胞外域之至少一部分(例如包含IgV)及以下域中之一或多者：信號肽域、跨膜域或細胞質域。此外，其他生物學活性部分(其中多肽之其他區域缺失)可藉由重組技術來製備且針對天然VISTA多肽之功能活性中之一或多者評估。

VISTA多肽可具有SEQ ID NO: 2、4或5中所示之胺基酸序列。VISTA多肽可與SEQ ID NO: 2、4或5實質上一致，且保留SEQ ID NO: 2、4或5之多肽之功能活性，但因對偶基因變異或誘變而在胺基酸序列方面不同，如本文所述。

融合蛋白質

包含VISTA及VISTA結合物多肽之融合體亦在本發明範疇內。舉例而言，融合蛋白質可連接至GST融合蛋白質上，其中VISTA及VISTA結合物多肽序列融合至GST序列之C端上。該等融合蛋白質可有助於重組VISTA及VISTA結合物多肽之純化。或者，VISTA及VISTA結合物多肽可與結合B細胞濾泡之蛋白質融合，因此啟動體液性免疫反應及T細胞活化兩者。Berney等人 (1999) **J. Exp. Med.** 190: 851-60。或者，舉例而言，VISTA及VISTA結合物多肽可與抗樹突狀細胞抗體遺傳地偶合以將抗原傳遞至免疫系統且刺激細胞免疫反應。He等人 (2004) **Clin. Cancer Res.** 10: 1920-27。本發明之嵌合或融合蛋白質可藉由標準重組DNA技術產生。舉例而言，根據習知技術，例如藉由使用用於接合之鈍端或交錯端端點、提供適當端點之限制酶消

化、酌情填入黏性末端、避免不當連接的鹼性磷酸酶處理及酶促接合將編碼不同多肽序列之DNA片段同框接合於一起。融合基因可藉由習知技術(包括自動DNA合成儀)來合成。

融合蛋白可包括C端或N端易位序列。此外，融合蛋白可包含例如用於蛋白質偵測、純化或其他應用之其他元件。偵測及純化促進域包括(但不限於)金屬螯合肽，諸如聚組胺酸段、組胺酸-色胺酸模塊或允許在固定化金屬上純化之其他域；麥芽糖結合蛋白；允許在固定化免疫球蛋白上純化之蛋白質A域；或FLAG延伸/親和純化系統(Immunex Corp, Seattle WA.)中所用之域。

融合蛋白可由本發明之蛋白質藉由與包含免疫球蛋白之恆定區的一部分免疫球蛋白融合來製備。免疫球蛋白之該部分更佳包含視情況且更佳為人類重鏈恆定區之重鏈恆定區。重鏈恆定區最佳為IgG重鏈恆定區，且視情況且最佳為Fc鏈，最佳為包含CH2及CH3域之IgG Fc片段。雖然可視情況使用任何IgG亞型，但IgG1亞型較佳。Fc鏈可視情況為已知或「野生型」Fc鏈，或者可為突變Fc鏈。參見例如美國專利申請公開案第2006/0034852號。術語「Fc鏈」亦視情況包含任何類型之Fc片段。IgG子類中數種涉及抗體恆定區介導之活性的特定胺基酸殘基已經鑑別。包括、取代或排除此等特定胺基酸從而會允許包括或排除特定免疫球蛋白恆定區介導之活性。此外，特定改變可引起Fc鏈之例如去糖基化及/或其他所需改變。可視情況作出至少某些改變以阻斷Fc之被視作不當之功能，諸如不當之免疫系統作用。參見McCafferty等人 (2002) **Antibody Engineering: A Practical Approach** (編) Oxford University Press。

在易位域(用於高效質膜表現)與新轉譯之多肽的其餘部分之間包括可裂解連接子序列，諸如因子Xa(參見例如Ottavi, (1998) **Biochimie** 80: 289-93)、枯草桿菌蛋白酶識別基元(參見例如Polyak (1997)

Protein Eng. 10: 615-19)；腸激酶(Invitrogen, San Diego, CA.)可用於促成純化。舉例而言，一種構築體可包括編碼多肽之核酸序列，其連接至六個組胺酸殘基，繼而為硫氧還原蛋白、腸激酶裂解位點(參見例如 Williams (1995) **Biochemistry** 34: 1787-97)及C端易位域。組胺酸殘基有助於偵測及純化，而腸激酶裂解位點提供自融合蛋白之其餘部分純化所需蛋白質的方式。關於編碼融合蛋白之載體的技術以及融合蛋白之應用充分描述於科學及專利文獻中。參見例如 Kroll (1993) **DNA Cell. Biol.** 12: 441-53。

融合蛋白質可為GST-VISTA融合蛋白質，其中VISTA序列融合至GST序列之C端上。該等融合蛋白質可有助於重組VISTA之純化。在另一實施例中，融合蛋白質為在其N端處含有異源信號序列之VISTA多肽。在某些宿主細胞(例如哺乳動物宿主細胞)中，VISTA之表現及/或分泌可經由使用異源信號序列而增加。在一實施例中，融合蛋白質為Ig-VISTA融合蛋白質，其中VISTA序列融合至Ig分子之一部分上。融合蛋白質之Ig部分可包括免疫球蛋白恆定區，例如人類C γ 1域或C γ 4域(例如人類IgC γ 1或人類IgC γ 4之鉸鏈、CH2及CH3區(參見例如美國專利第5,116,964號、第5,580,756號、第5,844,095號)。所得融合蛋白質可具有改變之VISTA溶解度、結合親和力、穩定性及/或價數(亦即每分子結合位點數目)且可增加蛋白質純化之效率。

尤其較佳之VISTA Ig融合體蛋白質包括偶合至免疫球蛋白恆定區(例如Fc區)上之VISTA之胞外域部分。免疫球蛋白恆定區可含有減少或消除為免疫球蛋白結構所固有之效應活性的遺傳修飾。舉例而言，編碼VISTA多肽之胞外部分之DNA可連接至編碼利用定點變突誘發修飾之人類IgG γ 1及/或IgG γ 4之鉸鏈、CH2及CH3區的DNA上，例如WO 97/28267中所教示。本發明之VISTA融合蛋白質可併入醫藥組合物中且活體內投與個體。VISTA融合蛋白質可用於影響VISTA結合搭配物

之生物利用度。VISTA融合蛋白質之使用對於治療將得益於免疫反應調節之病狀或病症而言可在治療上有用。此外，本發明之VISTA-融合蛋白質可用作免疫原，從而在個體中製造抗VISTA抗體、純化VISTA結合蛋白，及在篩選分析中鑑別抑制VISTA與其天然結合搭配物之相互作用的分子。

結合物

VISTA及VISTA結合物、結合VISTA及VISTA結合物及其片段之抗體可結合至其他部分上。該等結合物常用於製備疫苗。VISTA及VISTA結合物多肽可結合至碳水化合物(例如甘露糖、海藻糖、葡萄糖、GlcNA、麥芽糖)上，其由樹突狀細胞及巨噬細胞上存在之甘露糖受體識別。隨後之結合、聚集及受體介導之內飲及吞噬功能使得先天及應變性免疫得到增強。參見Mahnke等人 (2000) **J. Cell Biol.** 151: 673-84；Dong等人 (1999) **J. Immunol.** 163: 5427-34。

其他適於結合以引起免疫反應之部分包括(但不限於)匙孔螺血氫蛋白(KLH)、白喉類毒素、霍亂類毒素、假單胞菌(*Pseudomonas*)外蛋白A及微生物外膜蛋白(OMPS)。

多肽分離

本發明亦提供分離VISTA及VISTA結合物多肽之方法。舉例而言，可自癌症患者獲得相關細胞株或腫瘤樣品。在均質化且於清潔劑中溶解之後，以層析方式對抗原進行純化。尺寸排阻或親和層析法可用於此，且可與抗VISTA及抗VISTA-Ig結合物抗體組合使用。舉例而言，抗VISTA或抗VISTA-Ig結合物抗體可固定化在固體支撐物上(例如偶合至樹脂、磁性珠粒上)以用於簡單抗原吸附、洗滌及自固體支撐物溶離。接著針對抗原存在、表徵及鑑別進一步研究溶離之蛋白質。參見Walker (2002) **Protein Protocols Handbook** [第2版] Humana Press and Culture (2003) [編] **Protein Purification Protocols** Humana

Press。

以此方式分離之抗原可用於使用習知醫藥賦形劑及載劑物質來製備藥物。舉例而言，活體內投與於生理NaCl溶液中之經純化抗原。

另外，本發明之VISTA及VISTA結合物多肽可在活性鑑別中充當抗原作為高通量篩選之一部分。高通量篩選法為熟習此項技術者已知。Wells (2002) **High Throughout Bioanalytical Sample Preparation** Elsevier Health Sciences。

編碼VISTA及VISTA結合物之聚核苷酸

本發明亦提供編碼VISTA及VISTA結合物之核苷酸。本發明亦提供包含編碼VISTA多肽之SEQ ID NO: 1及3之核酸序列的聚核苷酸。本發明亦提供本文所述之聚核苷酸序列之片段、可與本文所述之聚核苷酸序列雜交之序列以及與本文所述之聚核苷酸序列至少約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同源之序列。

本發明亦提供包含至少一種VISTA及VISTA結合物序列之聚核苷酸，其編碼類似多肽，該等類似多肽具有不同密碼子用法、特徵在於突變(諸如一或多個核苷酸之缺失、插入或取代，天然產生或以隨機或靶向方式人工誘導)之改變之序列。本發明亦涵蓋同源核酸序列(例如，其形成本發明聚核苷酸序列之一部分)，其包括本發明聚核苷酸獨特之序列區域。

本發明亦涵蓋編碼VISTA及VISTA結合物多肽之同源物之核酸，該等同源物可與本文中所述胺基酸序列至少約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致同源，如可使用國家生物技術資訊中心(NCBI)之BlastP軟體使用預設參數測定。本

發明亦涵蓋上述聚核苷酸之片段以及具有天然產生或以隨機或靶向方式人工誘導之突變(諸如一或多個核酸缺失、插入或取代)的多肽。

核酸分子可編碼VISTA及VISTA結合物或該核酸分子之功能性片段。該核酸之「功能性片段」包括編碼該VISTA及VISTA結合物之基因或cDNA之片段，該片段能夠表現以產生能夠誘發免疫反應之VISTA及VISTA結合物(例如選擇性結合VISTA及VISTA結合物之抗體)。因此，舉例而言，本發明之VISTA及VISTA結合物之片段對應於有助於抗原免疫原性之胺基酸殘基，且該片段可用於充當抗原以誘發免疫反應(例如體液性或細胞免疫反應)。本發明之此態樣亦包括本發明核酸之經差異剪接之同工型及轉錄起點。本發明之核酸分子亦包含編碼本發明之VISTA及VISTA結合物之如上所述核酸分子之片段、衍生物及對偶基因變異體。用於製造編碼VISTA及VISTA結合物之片段之核酸的方法及材料為此項技術中所熟知。參見例如Maniatis等人(2001) **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** [第3版] Cold Spring Harbor Laboratory Press。

涵蓋SEQ ID NO: 1、3之所有或一部分之核酸分子、或直系同源物或變異體可利用聚合酶鏈反應(PCR)使用基於SEQ ID NO: 1、2、3、4或5之序列設計之合成寡核苷酸引子分離。

本發明之核酸分子可使用cDNA、mRNA，或者使用基因組DNA作為模板且使用適當寡核苷酸引子根據標準PCR擴增技術來擴增。可將由此擴增之核酸分子選殖至適當載體中且由DNA序列分析表徵。此外，對應於VISTA(PD-L3)核苷酸序列之寡核苷酸可利用標準合成技術(例如使用自動化DNA合成儀)來製備。

在一實施例中，本發明之經分離之VISTA編碼核酸分子包含SEQ ID NO: 1或3中所示之核苷酸序列或其片段。在另一實施例中，本發明之核酸分子包含作為SEQ ID NO: 1或3中所示核苷酸序列或此等核

核苷酸序列中之任一者之一部分之互補序列的核酸分子。與SEQ ID NO: 1或3中所示核苷酸序列互補之核酸分子為與SEQ ID NO: 1或3中所示核苷酸序列充分互補使得其可分別與SEQ ID NO: 1或3中所示核苷酸序列雜交藉此形成穩定雙螺旋的核酸分子。

在另一實施例中，本發明之經分離之核酸分子包含與SEQ ID NO: 1或3中所示核苷酸序列之整個長度、或此等核苷酸序列中之任一者之一部分至少約70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%一致的核苷酸序列。

此外，本發明之核酸分子可僅包含SEQ ID NO: 1或3之核酸序列之一部分，例如可用作探針或引子之片段或編碼VISTA多肽之一部分(例如VISTA-多肽之生物學活性部分)的片段。由人類PD-L2基因選殖測定之核苷酸序列允許產生為用於鑑別及/或選殖其他PD-L2家族成員以及來自其他物種之VISTA同源物而設計的探針及引子。探針/引子通常包含實質上純化之寡核苷酸。寡核苷酸通常包含在嚴格條件下與SEQ ID NO: 1或3之有義序列、SEQ ID NO: 1、3之反義序列或SEQ ID NO: 1或3之天然產生之對偶基因變異體或突變體的至少約12或15個、較佳約20或25個、更佳約30、35、40、45、50、55、60、65或75個連續核苷酸雜交的核苷酸序列區。

在一個實施例中，本發明之核酸分子包含長度大於約50至100個、100至150個、150至200個、200至250個、250至300個、300至350個、350至400個、400至450個、450至500個、500至550個、550至600個、600至650個、650至700個、700至750個、750至800個、800至850個、850至900個、900至950個或950個以上核苷酸的核苷酸序列，且其在嚴格雜交條件下與SEQ ID NO: 1或3之核酸分子或其互補序列雜交。在另一實施例中，本發明之核酸分子包含長度大於約880至900

個、900至950個、950至1000個、1000至1050個、1050至1100個、1100至1150個或1150個以上核苷酸的核苷酸序列，且其在嚴格雜交條件下與SEQ ID NO: 1或3之核酸分子或其互補序列雜交。在另一實施例中，本發明之核酸分子包含長度大於約50至100個、100至150個、150至200個、200至250個、250至300個或300個以上核苷酸的核苷酸序列，且其在嚴格雜交條件下與包含SEQ ID NO: 1或3中之編碼區之核酸分子或其互補序列雜交。在另一實施例中，本發明之核酸分子包含長度大於約50至100個、100至150個、150至200個、200至250個、250至300個、300至350個、350至400個、400至450個、450至500個、500至550個、550至600個、600至650個、650至700個、700至750個、750至800個、800至850個、850至900個、900至950個或950個以上核苷酸的核苷酸序列，包括包含SEQ ID NO: 1或3之編碼區之序列或其互補序列的至少約15個(亦即15個連續)核苷酸，且其在嚴格條件下與包含SEQ ID NO: 1或3中所示核苷酸序列、其互補序列之核酸分子雜交。

基於VISTA核苷酸序列之探針可用於偵測編碼其或同源多肽之轉錄物或基因組序列。在實施例中，探針進一步包含與其連接之標記基團，例如標記基團可為放射性同位素、螢光化合物、酶或酶輔因子。該等探針可用作診斷測試套組之一部分以用於鑑別誤表現VISTA多肽之細胞或組織，諸如藉由量測來自個體之細胞樣品中編碼VISTA之核酸含量，例如偵測VISTA mRNA含量或測定基因組VISTA基因是否已突變或缺失來進行。

除SEQ ID NO: 1及3之VISTA核苷酸序列以外，熟習此項技術者應瞭解引起VISTA多肽之胺基酸序列改變之DNA序列多形現象可存在於群體(例如人類群體)內。VISTA基因中之該遺傳多形現象因天然對偶基因變異而可存在於群體內之個體中。如本文所用，術語「基因」

及「重組基因」指代核酸分子，其包括編碼VISTA多肽(較佳為哺乳動物VISTA多肽)之開放閱讀框架，且可進一步包括非編碼調節序列及內含子。

人類或小鼠VISTA之對偶基因變異體包括功能及非功能VISTA多肽兩者。功能對偶基因變異體為人類或小鼠VISTA多肽之天然產生之胺基酸序列變異體，其維持結合天然VISTA結合搭配物及/或調節CD4⁺及CD8⁺ T細胞增殖及細胞激素產生及淋巴細胞活化的能力。功能對偶基因變異體通常將僅含有SEQ ID NO: 2、4或5之一或多個胺基酸之保守取代、或該多肽之非關鍵區中之非關鍵殘基的取代、缺失或插入。

非功能對偶基因變異體為人類或小鼠VISTA多肽之天然產生之胺基酸序列變異體，其並不具有結合天然VISTA結合搭配物及/或調節本文所述之VISTA活性中之任一者的能力。非功能對偶基因變異體通常將含有SEQ ID NO: 2、4或5之胺基酸序列之非保守取代、缺失或插入或過早截短、或該多肽之關鍵殘基或關鍵區(例如IgV域)中的取代、插入或缺失。

本發明進一步提供人類或小鼠VISTA多肽之非人類、非小鼠直系同源物。人類或小鼠VISTA多肽之直系同源物為自非人類、非小鼠生物體分離之多肽，且具有與本文所揭示之人類及鼠類VISTA多肽相同的結合活性及/或淋巴細胞活化調節活性及調節CD4⁺及CD8⁺ T細胞增殖及細胞激素產生的能力。人類或小鼠PD-L3多肽之直系同源物可易於鑑別為包含與SEQ ID NO: 2、4或5實質上一致的胺基酸序列。

可分析突變VISTA多肽之結合天然VISTA結合搭配物及/或調節天然VISTA結合搭配物活性、調節細胞內或細胞間信號傳導、調節T淋巴細胞活化及/或調節生物體免疫反應的能力。

編碼VISTA或VISTA融合蛋白質之經分離之核酸分子。可利用標

準重組DNA技術製備該等核酸分子，其至少包含可操作地連接至編碼非VISTA蛋白質、多肽或肽之第二核苷酸序列之編碼VISTA或VISTA蛋白質、多肽或肽的第一核苷酸序列。

此外，一致性廣泛地指相關核酸分子或由其編碼之蛋白質之間存在功能性及/或結構等效性。與上文所述之分子同源且構成此等分子之衍生物的核酸分子一般為此等分子之變異體，其構成修飾物且發揮相同生物功能。同時，變異體可天然產生，例如其可為來自其他物種之序列，或其可為突變體，其中此等突變體可能以天然方式存在，或藉由目標性突變誘發而引入。變異體亦可為以合成方式製備之序列。對偶基因變異體可為天然產生之變異體且亦可為以合成方式製備之變異體或由重組DNA技術產生之變異體。因遺傳密碼簡併而與本發明核酸分子不同之核酸分子構成特殊形式之衍生物。

編碼其VISTA及VISTA結合物之胺基酸序列之任何核苷酸序列亦包括在本發明範疇內。由於遺傳密碼簡併，一個以上密碼子可用於編碼特定胺基酸。使用遺傳密碼，可鑑別一或多個不同核苷酸，其各自應能夠編碼胺基酸。特定核苷酸將事實上構成實際密碼子編碼序列之機率可藉由考慮異常鹼基配對關係及特定密碼子在表現其VISTA及VISTA結合物之真核生物或原核細胞中實際使用(從而編碼特定胺基酸)之頻率來估算。該等「密碼子使用規則」係由Lathe等人, (1985) **J. Molec. Biol.** 183: 1-12揭示。

經修飾之VISTA及VISTA結合物聚核苷酸

本發明之核苷酸可為經修飾之聚核苷酸。未經修飾之核苷酸在某些應用中常並非最佳，例如傾向於由細胞核酸酶降解。對寡核苷酸之一或多個次單位進行化學修飾可賦予改良之性質，例如可使得聚核苷酸之核酸酶穩定性較大。典型寡核苷酸修飾在此項技術中為熟知的且可包括以下一或多者：(i)一或兩個非鍵聯磷酸酯氧及/或磷酸二酯

糖間鍵聯中一或多個鍵聯磷酸酯氧之改變，例如置換；(ii)核糖之組分的改變，例如置換，例如核糖上之2'羥基的修飾或置換；(iii)磷酸酯部分全部置換；(iv)天然產生之鹼基經非天然鹼基修飾或置換；(v)核糖-磷酸酯主鏈例如經肽核酸(PNA)置換或修飾；(vi)寡核苷酸之3'端或5'端之修飾；及(vii)糖之修飾，例如六員環。根據本發明使用之聚核苷酸可利用大量此項技術中熟知之手段合成，或購自各種商業供應商(LC Sciences, Houston, TX；Promega, Madison, WI；Invitrogen, Carlsbad, CA)。

反義

除編碼如上所述VISTA多肽之核酸分子以外，本發明之另一實施例係關於與其反義之經分離之核酸分子。「反義」核酸包含與編碼多肽之「有義」核酸互補，例如與雙股cDNA分子之編碼股互補或與mRNA序列互補的核苷酸序列。因此，反義核酸可以氫鍵鍵結至有義核酸。反義核酸可與整個VISTA編碼股或僅其一部分互補。在一個實施例中，反義核酸分子與編碼VISTA之核苷酸序列之編碼股之「編碼區」反義。術語「編碼區」係指核苷酸序列中包含可轉譯成胺基酸殘基之密碼子的區域。在另一實施例中，反義核酸分子與編碼PD-L之核苷酸序列之編碼股之「非編碼區」反義。術語「非編碼區」係指側接編碼區之5'及3'序列，其不轉譯成胺基酸(亦稱為5'及3'非轉譯區)。鑒於編碼本文所揭示之人類或小鼠VISTA或VISTA之編碼股序列，本發明之反義核酸可跟據沃森及克里克鹼基配對(Watson and Crick base pairing)規則設計。反義核酸分子可與VISTA mRNA之整個編碼區互補，但更佳為與VISTA mRNA之編碼或非編碼區之僅一部分反義的寡核苷酸。舉例而言，反義寡核苷酸可與圍繞VISTA或VISTA mRNA之轉譯起始位點的區域互補。反義寡核苷酸之長度可為例如約5、10、15、20、25、30、35、40、45或50個核苷酸。本發明之反義核酸分子

可使用化學合成及酶促接合反應使用此項技術中已知之程序構築。舉例而言，反義核酸分子(例如反義寡核苷酸)可使用天然產生之核苷酸或經不同修飾之核苷酸(其經設計以增加分子生物學穩定性或增加反義與有義核酸之間形成之雙螺旋物理穩定性)以化學方式合成，例如可使用硫代磷酸酯衍生物及吡啶取代之核苷酸。可用於產生反義核酸之經修飾核苷酸的實例包括5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、次黃嘌呤、黃嘌呤、4-乙醯胞嘧啶、5-(羧基羥甲基)尿嘧啶、5-羧甲基胺基甲基-2-硫尿苷、5-羧甲基胺基甲基尿嘧啶、二氫尿嘧啶、 β -D-半乳糖苷基Q核苷、肌苷、N6-異戊烯基腺嘌呤、1-甲基鳥嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鳥嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鳥嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-腺嘌呤、7-甲基鳥嘌呤、5-甲胺基甲基尿嘧啶、5-甲氧基胺基甲基-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-異戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧基乙酸(v)、氧丁氧苷(wybutoxosine)、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-胺基-3-N-2-羧丙基)尿嘧啶、(acp3)w及2,6-二胺基嘌呤。或者，反義核酸可使用核酸已以反義方向次選殖至其中之表現載體以生物學方式產生(亦即自插入之核酸轉錄之RNA具有與相關目標核酸之反義方向，進一步描述於以下分段中)。

本發明之反義核酸分子通常投與個體或原位產生，使得其與編碼VISTA或VISTA多肽之細胞mRNA及/或基因組DNA雜交或結合，藉此抑制多肽表現，例如藉由抑制轉錄及/或轉譯來抑制。雜交可藉由習知核苷酸互補性以形成穩定雙螺旋體，或例如在結合至DNA雙螺旋體之反義核酸分子的情況下，經由雙螺旋之大溝中的特定相互作用來達成。本發明之反義核酸分子之投藥途徑的實例包括直接注射於組織

部位處。或者，反義核酸分子可經修飾以靶向所選細胞且接著全身投與。舉例而言，對於全身投與，可例如藉由將反義核酸分子連接至可結合至細胞表面受體或抗原之肽或抗體來修飾反義分子以使其特異性結合至所選細胞表面上表現之受體或抗原。亦可使用本文所述之載體將反義核酸分子傳遞至細胞。為獲得反義分子之足夠細胞內濃度，在強pol II或pol III啟動子之控制下安置有反義核酸分子的載體構築體較佳。

VISTA反義核酸分子可為 α -變旋異構核酸分子。 α -變旋異構核酸分子與互補RNA形成特定雙股雜交物，其中與常見 β -單位相反，各股彼此平行。Gaultier等人 (1987) **Nucleic Acids Res.** 15: 6625-6641。反義核酸分子亦可包含2'-O-甲基核糖核苷酸(Inoue等人 (1987) **Nucleic Acids Res.** 15: 6131-6148)或嵌合RNA-DNA類似物(Inoue等人 (1987) **FEBS Lett.** 215: 327-330)。

VISTA反義核酸可為核酶。核糖核酸酶為具有核糖核酸酶活性之能夠裂解與其具有互補區之單股核酸(諸如mRNA)的催化性RNA分子。因此，核酶(例如錘頭狀核酶(描述於Haseloff及Gerlach (1988) **Nature** 334:585-591中))可用於催化裂解VISTA mRNA轉錄物，藉此抑制VISTA mRNA之轉譯。對編碼VISTA之核酸具有特異性之核酶可基於本文所揭示之VISTA cDNA之核苷酸序列(亦即SEQ ID NO: 1或3)設計。舉例而言，可構築眼原蟲(*Tetrahymena*)L-19 IVS RNA之衍生物，其中活性部位之核苷酸序列與待於編碼VISTA之mRNA中裂解之核苷酸序列互補。參見例如美國專利第4,987,071號及美國專利第5,116,742號。或者VISTA mRNA可用於自RNA分子池中選擇具有特定核糖核酸酶活性之催化性RNA。參見例如 Bartel及 Szostak (1993) **Science** 261:1411-1418。

或者，VISTA基因表現可藉由靶向與VISTA調節區(例如VISTA啟

動子及/或強化子)互補之核苷酸序列來抑制，從而形成防止PD-L3基因在目標細胞中轉錄之三螺旋結構。通常參見 Helene (1991) **Anticancer Drug Des.** 6(6):569-84；Helene等人 (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:27-36；及 Maher, L. J. (1992) **Bioessays** 14(12):807-15。

肽核酸

在另一實施例中，本發明之VISTA核酸分子可在鹼基部分、糖部分或磷酸酯主鏈處修飾以改良例如分子之穩定性、雜交或溶解度。舉例而言，核酸分子之磷酸脫氧核糖主鏈可經修飾以產生肽核酸。參見 Hyrup及Nielsen (1996) **Bioorg. Med. Chem.** 4(1): 5-23。如本文所用，術語「肽核酸」或「PNA」係指核酸模擬物，例如DNA模擬物，其中磷酸脫氧核糖主鏈經假肽主鏈置換且僅保留四個天然核鹼基。PNA之中性主鏈已經展示可允許DNA與RNA在低離子濃度之條件下特異性雜交。PNA寡聚物之合成可使用如Hyrup及Nielsen (1996) 同上及Perry-O'Keefe等人 (1996) **Proc Natl. Acad. Sci. USA** 93:14670-675中所描述之標準固相肽合成方案進行。

VISTA核酸分子之PNA可用於治療及診斷應用。舉例而言，PNA可用作反義或反基因(antigene)藥劑以藉由例如誘導轉錄或轉譯停滯或抑制複製來對基因表現進行序列特異性調節。VISTA核酸分子之PNA亦可用於基因中單鹼基對突變之分析(例如藉由PNA引導之PCR鉗進行)；在與其他酶(例如S1核酸酶(Hyrup及Nielsen (1996) 同上))組合使用時用作『人造限制酶』；或用作探針或引子以用於DNA定序或雜交(Hyrup及Nielsen (1996) 同上；Perry-O'Keefe等人 (1996) 同上)。

VISTA之PNA可藉由將親脂性或其他輔助基團連接至PNA、藉由形成PNA-DNA嵌合體、或藉由使用脂質體或此項技術中已知之其他藥物傳遞技術來修飾(例如從而增強其穩定性或細胞吸收)。舉例而

言，可產生VISTA核酸分子之PNA-DNA嵌合體，其可組合PNA及DNA之有利性質。該等嵌合體允許DNA識別酶(例如RNAse H及DNA聚合酶)與DNA部分相互作用，同時PNA部分將提供高結合親和力及特異性。PNA-DNA嵌合體可使用根據鹼基堆積、核鹼基之間鍵的數目及定向所選之適當長度之連接子來連接(Hyrup及Nielsen (1996) (同上))。PNA-DNA嵌合體之合成可如Hyrup及Nielsen (1996) 同上及Finn P. J.等人 (1996) **Nucleic Acids Res.** 24 (17):3357-63中所描述。舉例而言，DNA鏈可使用標準亞磷醯胺偶合化學過程在固體支撐物上合成，且經修飾之核苷類似物(例如5'-(4-甲氧基三苯甲基)胺基-5'-脫氧-胸苷亞磷醯胺)可用作PNA與DNA之5'端之間的橋(Mag, M.等人 (1989) **Nucleic Acids Res.** 17:5973-88)。接著，PNA單體以逐步方式偶合，從而產生具有5'PNA區段及3'DNA區段之嵌合分子(Finn P. J.等人 (1996) 同上)。或者，可合成具有5'DNA區段及3'PNA區段之嵌合分子(Peterser等人 (1975) **Bioorganic Med. Chem. Lett.** 5:1119-11124)。

寡核苷酸

寡核苷酸可包括其他附屬群，諸如肽(例如用於活體內靶向宿主細胞受體)、或有助於跨細胞膜(參見例如Letsinger等人 (1989) **Proc Natl. Acad. Sci. USA** 86:6553-6556；Lemaitre等人 (1987) **Proc Natl. Acad. Sci. USA** 84:648-652；PCT公開案第WO 88/09810號)或血腦屏障(參見例如PCT公開案第WO 89/10134號)轉運之藥劑。另外，寡核苷酸用引發雜交之裂解劑(參見例如Krol等人 (1988) **Biotechniques** 6:958-976)或插入劑(參見例如Zon (1988) **Pharm. Res.** 5:539-549)修飾。為此目的，寡核苷酸可結合至另一分子(例如肽、引發雜交之交聯劑、轉運劑或引發雜交之裂解劑)。

siRNA

小干擾RNA(siRNA)為通常長約20至25個核苷酸之雙股RNA分子類別，其結合至特定mRNA上且引導其mRNA降解，由此抑制基因轉錄(例如表現)。參見Hamilton及Baulcombe (1999) **Science** 286(5441): 950-2及Elbashir等人 (2001) **Nature** 411(6836): 494-8。亦可能運用核酶或RNA干擾(siRNA)技術，其藉由破壞信使RNA而防止基因製造功能蛋白。siRNA分子可結合至由包含SEQ ID NO: 1或3之核酸序列之VISTA DNA轉錄之VISTA mRNA上。siRNA分子可結合至由編碼SEQ ID NO: 2、4或5中所述胺基酸序列之VISTA DNA轉錄之VISTA mRNA上。

靶向由可包含SEQ ID NO: 1或3之核酸序列之VISTA DNA轉錄之VISTA mRNA之siRNA分子。編碼SEQ ID NO: 2、4或5中所述胺基酸序列之靶向由VISTA DNA轉錄之VISTA mRNA之siRNA分子。靶向VISTA之siRNA分子可包含SEQ ID NO: 38至67中之任一者之核酸序列。靶向VISTA之ORF或UTR區之siRNA分子可包含SEQ ID NO: 38至47中之任一者的胺基酸序列。僅靶向VISTA之UTR區之siRNA分子可包含SEQ ID NO: 48至57中之任一者的胺基酸序列。僅靶向VISTA之ORF區之siRNA分子可包含SEQ ID NO: 58至67中之任一者的胺基酸序列。靶向VISTA之siRNA分子可由SEQ ID NO: 38至67中之任一者之核酸序列組成。靶向VISTA之ORF或UTR區之siRNA分子可由SEQ ID NO: 38至47中之任一者的胺基酸序列組成。僅靶向VISTA之UTR區之siRNA分子可由SEQ ID NO: 48至57中之任一者胺基酸序列組成。僅靶向VISTA之ORF區之siRNA分子可由SEQ ID NO: 58至67中之任一者的胺基酸序列組成。

表1：人類VISTA之siRNA

siRNA序列	VISTA之目標區	SEQ ID NO:
GGGCACGATGTGACCTTCTACAAGA	ORF	38
CAGATGCCAAATGACTTACATCTTA	UTR3	39
GAGATGGATTGTAAGAGCCAGTTTA	UTR3	40

GGGCTTTGAGGAGAGGGTAAACATA	UTR3	41
CCTATCTCCTGACATTCACAGTTTA	UTR3	42
CAGTTTAAATAGAGACTTCCTGCCTT	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
CAGTTTAAATAGAGACTTCCTGCCTT	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
GGCAAAGATGCACCATCCAACGTGTG	ORF	62
CCATCCAACGTGTGGTGTACCCAT	ORF	63
GGATGGACAGCAACATTCAAGGGAT	ORF	64
GACAGCAACATTCAAGGGATTGAAA	ORF	65
CCCTGTCCCTGACTCTCCAAACTTT	ORF	66
CCTGACTCTCCAAACTTTGAGGTCA	ORF	67

表現

本發明之VISTA及VISTA結合物之分離及表現可藉由公認選殖程序使用基於本申請案中所揭示之VISTA及VISTA結合物核酸序列構築之探針或引子實現。相關VISTA及VISTA結合物序列亦可使用本文所揭示之序列及已知的基於電腦之搜索技術(例如BLAST序列搜索)自人類或其他物種基因組資料庫鑑別。本文揭示之假基因可用於鑑別功能性對偶基因或相關基因。

接著可使用表現載體來感染或轉染宿主細胞以使此等序列進行功能性表現。可製備此等基因及載體且使其活體外或活體內表現。熟習此項技術者應瞭解，改變及控制核酸表現所需之表型可藉由調節本發明載體內基因及核酸(例如啟動子、強化子)之表現或活性來獲得。可使用所述之任何用於增加或降低表現或活性之已知方法。

在另一實施例中，重組哺乳動物表現載體能夠引導核酸優先表

現於特定細胞類型中(例如使用組織特異性調節元件來使核酸表現)。
組織特異性調節元件為此項技術中已知。適合之組織特異性啟動子之非限制性實例包括白蛋白啟動子(肝臟特異性；Pinkert等人 (1987) *Genes Dev.* 1:268-277)、淋巴特異性啟動子(Calame及Eaton (1988) *Adv. Immunol.* 43:235-275)、T細胞受體之特定啟動子(Winoto及Baltimore (1989) **EMBO J.** 8:729-733)、及免疫球蛋白(Banerji等人 (1983) *Cell* 33:729-740；Queen及Baltimore (1983) *Cell* 33:741-748)、神經元特異性啟動子(例如神經絲啟動子；Byrne及Ruddle (1989) **Proc Natl. Acad. Sci. USA** 86:5473-5477)、胰臟特異性啟動子(Edlund等人 (1985) **Science** 230:912-916)及乳腺特異性啟動子(例如乳汁乳清啟動子；美國專利第4,873,316號及歐洲申請公開案第264,166號)。亦涵蓋發育調節啟動子，例如鼠類hox啟動子(Kessel及Gruss (1990) **Science** 249:374-379)及 α 胎蛋白啟動子(Campes及Tilghman (1989) *Genes Dev.* 3: 537-546)。

本文所提供之聚核苷酸序列可根據此項技術中已知之任何寡核苷酸合成法(諸如酶促合成或固相合成)來產生。進行固相合成之設備及試劑可自例如Applied Biosystems購得。亦可使用針對該合成之任何其他手段；聚核苷酸之實際合成充分處於熟習此項技術者能力範圍之內。參見例如Maniatis等人 (2001) **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** [第3版] Cold Spring Harbor Laboratory Press；Swamy (2008) **Laboratory Manual on Biotechnology** Rastogi Publications；Herdewijn (2005) [編] **Methods in Molecular Biology: Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications** 第 288 卷 Humana Press；及Rapley (2000) [編] **The Nucleic Acid Protocols Handbook** Humana Press。接著可藉由合成互補股且在適當條件下將各股黏接於一起，或藉由使用DNA聚合酶及適當引子序列添加互補股

來獲得雙股DNA片段。

用於操作核酸，諸如在序列中產生突變、次選殖、標記探針、定序、雜交之技術充分描述於科學及專利文獻中。參見例如Sambrook等人 (2001) (編) **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** (第3版) Cold Spring Harbor Laboratory；Ausubel等人 (2011) 編，**Current Protocols in Molecular Biology**, John Wiley & Sons, Inc., New York；Tijssen (1993) [編] **Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes**, 第I部分, **Theory and Nucleic Acid Preparation**, Elsevier, NY。

雜交及雜交強度(例如聚核苷酸間締合之強度)受此項技術中熟知之多種因素影響，包括聚核苷酸之間的互補度，及所涉及之條件的嚴格度，其受諸如以下之條件影響：鹽濃度、其他組分之存在(例如聚乙二醇存在或不存在)、雜交股之莫耳濃度及聚核苷酸股之G+C含量，所有該等條件均產生所形成雜交物的特徵性熔融溫度(T_m)。核酸雜交技術由Sambrook等人 (2001) (編) **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** [第3版] Cold Spring Harbor Laboratory及Haynes等人 (1985) **NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION, A PRACTICAL APPROACH** (IRL Press, DC) 揭示。雜交洗滌條件可包括0.2×SSC/0.1% SDS之洗滌溶液及在室溫下在旋轉下培育10分鐘(低嚴格度洗滌)；預先升溫(42℃)之0.2×SSC/0.1% SDS之洗滌溶液及在42℃下在旋轉下培育15分鐘(中等嚴格度洗滌)；及預先升溫(68℃)之0.1×SSC/0.1% SDS之洗滌溶液及在68℃下在旋轉下培育15分鐘(高嚴格度洗滌)。參見Ausubel等人 (2011) [編] **Current Protocols in Molecular Biology** John Wiley & Sons, Inc。

寡核苷酸引子可用於擴增編碼VISTA或VISTA結合物之核酸。本文所述之核酸亦可使用擴增技術定量地選殖或量測。擴增法亦為此項

技術中熟知，且包括例如聚合酶鏈反應(PCR)(Innis (1990) [編] **PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications**, Academic Press, NY. ; Innis (1995) [編] **PCR Strategies**, Academic Press, Inc., NY.)；連接酶鏈式反應(LCR)(Wu (1989) **Genomics** 4: 560 ; Landegren (1988) **Science** 241: 1077 ; Barringer (1990) **Gene** 89: 117)；轉錄擴增(Kwoh (1989) **PNAS** 86: 1173)；自主序列複製(Guatelli (1990) **PNAS** 87: 1874)；Q Beta複製酶擴增(Smith (1997) **J. Clin. Microbiol.** 35: 1477-91))；自動化Q-beta複製酶擴增分析(Burg (1996) **Mol. Cell. Probes** 10: 257-71)；及其他RNA聚合酶介導之技術(例如NASBA，Cangene, Mississauga, Ontario)。亦參見Berger (1987) **Methods Enzymol.** 152: 307-16；Sambrook等人 (2001) (編) **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** (第3版) Cold Spring Harbor Laboratory；Ausubel等人 (2011) [編] **Current Protocols in Molecular Biology**, John Wiley & Sons, Inc., New York；Maniatis等人 (2001) **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** [第3版] Cold Spring Harbor Laboratory Press；美國專利第4,683,195號及第4,683,202號；Sooknanan (1995) **Biotechnology** 13: 563-64。

設計簡併引子對之範例為此項技術中所熟知。舉例而言，一致-簡併雜合寡核苷酸引子(CODEHOP)策略電腦程式可易於獲得且自BlockMaker多重序列比對站點直接鏈接以用於自一組相關蛋白序列(諸如本文提供之VISTA及VISTA結合物序列)開始之雜合引子預測。參見例如Rose (1998) **Nucleic Acids Res.** 26: 1628-35；Singh (1998) **Biotechniques** 24: 318-19。

與本文所揭示之VISTA及VISTA結合物實質上一致之多形現象變異體、對偶基因及種間同系物可使用如上所述之核酸探針分離。或者，表現文庫可藉由用針對VISTA及VISTA結合物製造之抗血清或純

化之抗體(其亦識別且選擇性結合至VISTA或VISTA結合物同系物)以免疫學方式偵測表現之同系物而用於選殖VISTA及VISTA結合物及其多形現象變異體、對偶基因及種間同系物。

編碼VISTA及VISTA結合物之核酸可藉由使用適當(完全或簡併)引子對擴增(例如PCR)適當核酸序列而產生。擴增之核酸可為來自任何細胞或組織之基因組DNA或來源於表現VISTA或VISTA結合物之細胞的mRNA或cDNA。在宿主細胞中表現異源序列之方法為此項技術中所熟知。參見例如Maniatis等人 (2001) **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** [第3版] Cold Spring Harbor Laboratory Press。

包含VISTA及VISTA結合物之融合蛋白質

可構築編碼雜合蛋白質之序列，其包含編碼融合至易位序列上之VISTA及VISTA結合物之核酸。亦提供包含基元及抗原區之雜合VISTA及VISTA結合物。此等核酸序列可操作地連接至轉錄或轉譯控制元件，例如轉錄及轉譯起始序列、啟動子及強化子、轉錄及轉譯終止子、聚腺苷酸化序列及其他適用於使DNA轉錄成RNA之序列。在建構重組表現卡匣、載體及轉殖基因時，可使用啟動子片段來引導所需核酸在所有所需細胞或組織中表現。

融合蛋白可包含C端或N端易位序列。此外，融合蛋白可包含例如用於蛋白質偵測、純化或其他應用之其他元件。偵測及純化促進域包括例如金屬螯合肽，諸如聚組胺酸段、組胺酸-色胺酸模塊或允許在固定化金屬上純化之其他域；麥芽糖結合蛋白；允許在固定化免疫球蛋白上純化之蛋白質A域；或FLAGS延伸/親和純化系統(Immunex Corp, Seattle WA.)中所用之域。

在易位域(用於高效質膜表現)與新轉譯之多肽的其餘部分之間包括可裂解連接子序列，諸如因子Xa(參見例如Ottavi, (1998) **Biochimie** 80: 289-93)、枯草桿菌蛋白酶識別基元(參見例如Polyak (1997)

Protein Eng. 10: 615-19)；腸激酶(Invitrogen, San Diego, CA.)可用於促成純化。舉例而言，一種構築體可包括編碼多肽之核酸序列，其連接至六個組胺酸殘基，繼而為硫氧還原蛋白、腸激酶裂解位點(參見例如 Williams (1995) **Biochemistry** 34: 1787-97)及C端易位域。組胺酸殘基有助於偵測及純化，而腸激酶裂解位點提供自融合蛋白之其餘部分純化所需蛋白質的方式。關於編碼融合蛋白之載體的技術以及融合蛋白之應用充分描述於科學及專利文獻中。參見例如 Kroll (1993) **DNA Cell. Biol.** 12: 441-53。

用於VISTA及VISTA結合物重組表現之系統

可藉由科學及專利文獻中充分描述之多種習知技術將包含配位體結合區編碼序列之表現載體(呈個別表現載體形式或呈表現載體文庫形式)引入基因組中或引入細胞質或細胞核中且使其表現。參見例如 Sambrook 等人 (2001) [編] **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** (第3版) Cold Spring Harbor Laboratory；Ausubel等人 (2011) [編] **Current Protocols in Molecular Biology** John Wiley & Sons, Inc。

核酸可在可穩定或短暫表現於細胞中之表現卡匣、載體或病毒(例如游離型表現系統)中表現。可將選擇標誌物併入表現卡匣及載體中以賦予轉型之細胞及序列以可選表型。舉例而言，選擇標誌物可編碼用於游離型維持及複製，從而不需要整合至宿主基因組中。舉例而言，標誌物可編碼抗生素抗性(例如氯黴素(chloramphenicol)、卡那黴素(kanamycin)、G418、博萊黴素(bleomycin)、潮黴素(hygromycin))或除草劑抗性(例如氯磺隆(chlorosulfurone)或巴斯特(Basta))以允許選擇該等經所需DNA序列轉型之細胞。參見例如 Ausubel等人 (2011) [編] **Current Protocols in Molecular Biology** John Wiley & Sons, Inc.；及 Walker及Papley (2009) **Molecular Biology and Biotechnology**

[第5版] Royal Society of Chemistry。由於賦予對基質(如新黴素(neomycin)或潮黴素)之抗性的可選標誌物基因僅可用於組織培養物中，所以亦在活體外及活體內使用化學抗性基因作為可選標記。

為了可實現本發明聚核苷酸之細胞表現，可使用本發明之核酸構築體，其至少包括上述核酸序列之一的編碼區且進一步包括至少一個順式作用調節元件。由本發明之核酸構築體利用之啟動子較佳在轉型之特定細胞群體中具有活性。細胞類型特異性及/或組織特異性啟動子之實例為此項技術中所熟知。參見Bernardi (2003) [編] **Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells** 第38卷 Elsevier Science B.V。本發明之核酸構築體可進一步包括強化子，其可鄰近或遠離啟動子序列且可發揮上調自啟動子序列轉錄的功能。

本發明之核酸構築體較佳進一步包括適當之可選標誌物及/或複製起點。所用之核酸構築體較佳為轉運載體(shuttle vector)，其可在大腸桿菌中繁殖(其中構築體包含適當之可選標誌物及複製起點)且對於在細胞中繁殖或整合於所選基因及組織中而言為相容的。本發明之構築體可為例如質體、穿梭載體、噬菌粒、黏質體、噬菌體、病毒或人工染色體。

適合構築體之實例包括(但不限於)pcDNA3、pcDNA3.1(+/-)、pGL3、PzeoSV2(+/-)、pDisplay、pEF/myc/cyto、pCMV/myc/cyto，其各自可購自Invitrogen Co.(Carlsbad, CA.)。反轉錄病毒載體及封裝系統之實例為由Clontech(San Diego, CA.)出售者，包括Retro-X載體pLNCX及pLXSN，其允許選殖至多個選殖位點中且轉殖基因自CMV啟動子轉錄。自Mo-MuLV獲得之載體亦包括諸如pBabe，其中轉殖基因自5' LTR啟動子轉錄。

本發明之重組表現載體包含呈適於核酸在宿主細胞中表現之形式的本發明核酸，此意謂重組表現載體包括一或多個調節序列，其基

於用於表現之宿主細胞來選擇且可操作地連接至欲表現之核酸序列。在重組表現載體內，「可操作地連接」意欲意謂相關核苷酸序列以允許核苷酸序列表現的方式連接至調節序列(例如在活體外轉錄/翻譯系統中或當載體引入宿主細胞中時在宿主細胞中)。

術語「調節序列」意欲包括啟動子、強化子及其他表現控制元件(例如聚腺苷酸化信號)。該等調節序列描述於(例如)Goeddel (1990) **Gene Expression Technology: Methods in Enzymology** 185, Academic Press, San Diego, CA中。調節序列包括引導核苷酸序列在多種類型之宿主細胞中進行組成性表現的調節序列以及引導核苷酸序列僅在某些宿主細胞中表現的調節序列(例如組織特異性調節序列)。熟習此項技術者應瞭解表現載體之設計可視諸如待轉型之宿主細胞的選擇、所需蛋白質之表現含量的因素而定。本發明之表現載體可引入宿主細胞中，藉此產生由如本文所述之核酸所編碼的蛋白質或肽，包括融合蛋白或肽。

本發明之重組表現載體可經設計以在原核或真核細胞中產生變異蛋白質。舉例而言，本發明之蛋白質可在細菌細胞(諸如大腸桿菌)、昆蟲細胞(例如使用桿狀病毒表現載體)、酵母細胞或哺乳動物細胞中表現。適合之宿主細胞進一步論述於 Goeddel (1990) **Gene Expression Technology: Methods in Enzymology** 185, Academic Press, San Diego, CA中。或者，重組表現載體可在活體外例如使用T7啟動子調節序列及T7聚合酶來轉錄及轉譯。

最常在大腸桿菌中用含有引導融合蛋白或非融合蛋白表現之組成性或誘導性啟動子之載體使蛋白質在原核生物中表現。融合載體將多種胺基酸添加至其中所編碼之蛋白質中，添加至重組蛋白之胺基端或C端。該等融合載體通常用於以下三個目的：(i)提高重組蛋白表現；(ii)增加重組蛋白之溶解度；及(iii)藉由在親和純化中充當配位體

而有助於純化重組蛋白。通常，在融合表現載體中，可在融合部分與重組蛋白之接合點處引入蛋白水解裂解位點以在純化融合蛋白之後能夠自融合部分分離重組蛋白。該等酶及其同源識別序列包括因子Xa、凝血酶、PreScission、TEV及腸激酶。典型的融合體表現載體包括分別將麩胱甘肽S-轉移酶(GST)、麥芽糖E結合蛋白或蛋白質A融合至目標重組蛋白質上之pGEX(Pharmacia Biotech Inc；Smith及Johnson (1988) **Gene** 67: 31-40)、pMAL(New England Biolabs, Beverly, MA.)及pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.)。

重組哺乳動物表現載體能夠引導核酸表現於特定細胞類型中(例如使用組織特異性調節元件來使核酸表現)。組織特異性調節元件為此項技術中已知。對於蛋白質之有效製造，較佳將編碼本發明蛋白質之核苷酸序列置放在針對在所需宿主中之表現最佳化之表現控制序列的控制下。舉例而言，該等序列可包括最佳化之轉錄及/或轉譯調節序列(例如改變之Kozak序列)。

一種最大化重組蛋白在大腸桿菌中之表現的策略為使蛋白質在蛋白水解裂解重組蛋白之能力受損之宿主細菌中表現。參見例如 Gottesman (1990) **Gene Expression Technology: Methods in Enzymology** Academic Press, San Diego, CA. 185: 119-128。另一策略為改變欲插入表現載體中之核酸之核酸序列以使得各胺基酸之個別密碼子為大腸桿菌中優先使用之密碼子。參見例如 Wada等人 (1992) **Nucl. Acids Res.** 20: 2111-2118。該改變本發明之核酸序列可藉由標準DNA合成技術來進行。另一解決密碼子偏性之策略為使用BL21-codon plus細菌菌株(Invitrogen)或Rosetta細菌菌株(Novagen)，此等菌株含有稀有大腸桿菌tRNA基因之額外複本。

編碼本發明蛋白質之表現載體可為酵母表現載體。用於在酵母釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中表現之載體之實例包括

pYepSec1(Baldari等人 (1987) **EMBO J.** 6: 229-234)、pMFa(Kurjan及 Herskowitz (1982) **Cell** 30: 933-943)、pJRY88(Schultz等人 (1987) **Gene** 54: 113-123)、pYES2(Invitrogen Corporation, San Diego, CA.)及 picZ (Invitrogen Corp, San Diego, CA.)。

或者，本發明之多肽可在昆蟲細胞中使用桿狀病毒表現載體產生。可供蛋白質在經培養之昆蟲細胞(例如SF9細胞)中表現使用之桿狀病毒載體包括pAc系列(Smith等人 (1983) **Mol. Cell. Biol.** 3: 2156-2165)及pVL系列(Lucklow及 Summers (1989) **Virology** 170: 31-39)。在另一實施例中，本發明之核酸在哺乳動物細胞中使用哺乳動物表現載體來表現。哺乳動物表現載體之實例包括pCDM8(Seed (1987) **Nature** 329: 840)及pMT2PC(Kaufman等人 (1987) **EMBO J.** 6: 187-195)、pIRESpuro(Clontech)、pUB6(Invitrogen)、pCEP4 (Invitrogen) pREP4 (Invitrogen)、pcDNA3 (Invitrogen)。當用於哺乳動物細胞中時，表現載體之控制功能常由病毒調節元件提供。舉例而言，常用啟動子來源於多形瘤、腺病毒2、細胞巨大病毒、勞斯肉瘤病毒(Rous Sarcoma Virus)及猴病毒40。對於其他適用於原核生物及真核細胞兩者之表現系統，參見例如 Sambrook等人 (2001) (編) **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** (第3版) Cold Spring Harbor Laboratory。

宿主細胞可為任何原核或真核細胞。舉例而言，本發明蛋白質可在細菌細胞(諸如大腸桿菌)、昆蟲細胞、酵母、植物或哺乳動物細胞(例如中國倉鼠卵巢細胞(CHO)、COS、HEK293細胞)中產生。其他適合之宿主細胞為熟習此項技術者所知。

可經習知轉型或轉染技術將載體DNA引入原核或真核細胞中。如本文所用之術語「轉型」及「轉染」意欲指多種此項技術中公認之用於將外來核酸(例如DNA)引入宿主細胞中之技術，包括磷酸鈣或氯化鈣共沈澱、DEAE-聚葡萄糖介導之轉染、脂質體轉染或電穿孔。適

用於轉型或轉染宿主細胞之方法可見於 Sambrook 等人 (2001) [編] **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** (第3版) Cold Spring Harbor Laboratory 及其他實驗室手冊中。

可使用任何熟知的用於將外來核苷酸序列引入宿主細胞中之程序。此等程序包括使用磷酸鈣轉染、凝聚胺、原生質體融合、電穿孔、脂質體、顯微注射、質體載體、病毒載體及任何其他熟知用於將選殖之基因組DNA、cDNA、合成DNA或其他外來遺傳物質引入宿主細胞中的方法。參見例如 Sambrook 等人 (2001) (編) **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** (第3版) Cold Spring Harbor Laboratory 及 Walker 及 Papley (2009) **Molecular Biology and Biotechnology** [第5版] Royal Society of Chemistry。唯一必需的是，所用特定遺傳工程化程序能夠將至少一個核酸分子成功地引入能夠表現 VISTA 及 VISTA 結合物、或相關片段或變異體之宿主細胞中。

對於哺乳動物細胞之穩定轉染，已知視所用表現載體及轉染技術而定，僅小部分細胞可將外來DNA整合入其基因組中。為鑑別且選擇此等整合體，一般將編碼可選標誌物(例如抗生素抗性)之基因連同相關基因一起引入宿主細胞中。各種可選標誌物包括賦予抗藥性之標誌物，諸如 G418、潮黴素、嘌呤黴素 (puromycin)、殺稻瘟菌素 (blasticidin) 及甲胺喋呤。可將編碼可選標誌物之核酸於與編碼本發明蛋白質之載體相同之載體上引入宿主細胞中或可於單獨載體上引入。經引入之核酸穩定轉染之細胞可藉由藥物選擇來鑑別(例如，併有可選標誌物基因之細胞將存活，而其他細胞死亡)。

本發明之宿主細胞(諸如培養物中之原核或真核宿主細胞)可用於產生(亦即表現)本發明之蛋白質。因此，本發明進一步提供使用本發明之宿主細胞產生本發明之蛋白質的方法。在一個實施例中，該方法包含在適合培養基中培養本發明之宿主細胞(其中引入有編碼本發明

蛋白質之重組表現載體)，從而產生本發明蛋白質。在另一實施例中，該方法進一步包含自培養基或宿主細胞分離本發明蛋白質。

在將表現載體引入細胞中之後，在有利於相關受體、片段或變異體表現的條件下培養轉染之細胞，接著使用標準技術自培養物中回收該相關受體、片段或變異體。該等技術之實例在此項技術中為熟知的。參見例如WO 00/06593。

結合VISTA或VISTA結合物之抗體

本發明亦提供選擇性結合VISTA及VISTA結合物之抗體，包括(但不限於)單株及人類化單株抗體。選擇性結合VISTA及VISTA結合物之抗體可與藥物載劑及其他抗體(例如抗PD-L1、PD-L2或CTLA-4抗體)一起摻合在組合物中。

經分離之VISTA多肽或其部分或片段可用作免疫原，從而使用多株及單株抗體製備之標準技術產生結合VISTA之抗體。可使用全長VISTA多肽，或者本發明提供VISTA之抗原性肽片段用作免疫原。在一個實施例中，VISTA之抗原性肽包含SEQ ID NO: 2、4或5中所示胺基酸序列之至少8個胺基酸殘基，且涵蓋VISTA之抗原決定基，使得針對肽產生之抗體與VISTA多肽一起形成特異性免疫複合物。抗原性肽較佳包含至少10個胺基酸殘基，更佳包含至少15個胺基酸殘基，甚至更佳包含至少20個胺基酸殘基，且最佳包含至少30個胺基酸殘基。抗原性肽所涵蓋之較佳抗原決定基為位於多肽胞外域之VISTA之區域，例如親水性區域以及具有較高抗原性之區域。

VISTA免疫原通常用於藉由用免疫原免疫接種適合之個體(例如兔、山羊、小鼠或其他哺乳動物)而製備抗體。適當免疫原性製備物可含有例如以重組方式表現之VISTA多肽或以化學方式合成之VISTA多肽。製劑可進一步包括佐劑，諸如弗氏(Freund's)完全或不完全佐劑或類似免疫刺激劑。用免疫原性VISTA製備物免疫接種適合之個體

誘導多株抗VISTA抗體反應。

抗體可包含分子量為約23,000道爾頓(「輕鏈」)之兩條相同多肽輕鏈及分子量為53,000至70,000(「重鏈」)之兩條相同重鏈。參見Edelman (1971) **Ann. NY. Acad. Sci.** 190: 5。四條鏈以「Y」組態由二硫鍵連接，其中起始在「Y」組態之口部處開始輕鏈支托重鏈。「Y」組態之「分支」部分命名為F_{ab}區；「Y」組態之主幹部分命名為F_c區。胺基酸序列定向為自「Y」組態頂部之N端末端至各鏈底部之C端末端。N端末端具有對產生其之抗原具有特異性的可變區，且長度為約100個胺基酸，輕鏈與重鏈之間且各抗體間存在輕微變異。

可變區在各鏈中連接至恆定區，該恆定區延伸鏈之剩餘長度且在特定抗體類別內不隨抗體特異性(亦即產生抗體之抗原)而變。存在決定免疫球蛋白分子類別之五個已知主要恆定區類別(例如對應於 γ 、 μ 、 α 、 δ 及 ϵ 重鏈恆定區之IgG、IgM、IgA、IgD及IgE)。恆定區或類別決定抗體之後續效應功能，包括補體活化(Kabat (1976) **Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry** [第2版] 第413頁至第436頁；Holt, Rinehart, Winston)及其他細胞反應(Andrews等人 (1980) **Clinical Immunobiology** 1-18；Kohl等人 (1983) **Immunology** 48: 187)，而可變區決定將與其起反應之抗原。輕鏈分類為 κ 或 λ 。各重鏈類別可用 κ 或 λ 輕鏈製備。當由融合瘤或由B細胞產生免疫球蛋白時，輕鏈與重鏈彼此共價鍵結，且兩條重鏈之「尾區」部分彼此藉由共價二硫鍵鍵結。

在該等條件下特異性結合至抗體可能需要針對對特定蛋白質之特異性而選擇的抗體。舉例而言，針對來自特定物種(諸如大鼠、小鼠或人類)之精子鹼性蛋白產生的多株抗體可經選擇以僅獲得對精子鹼性蛋白具特異性免疫反應性而對除精子鹼性蛋白之多形變異體及對偶基因以外的其他蛋白質不具特異性免疫反應性的多株抗體。此選擇

可藉由除去與來自其他物種之精子鹼性蛋白分子交叉反應的抗體來達成。可使用多種免疫分析形式來選擇對特定蛋白質具特異性免疫反應性的抗體。舉例而言，常規使用固相ELISA免疫分析來選擇對蛋白質具有特異性免疫反應性的抗體。對於可用於測定特異性免疫反應性之免疫分析形式及條件之說明，參見例如Harlow及Lane (1998) **USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL** Cold Spring Harbor Laboratory。特異性或選擇性反應通常為至少兩倍背景信號或噪聲且較通常大於約10至100倍背景。

抗體可經篩選以鑑別結合至VISTA之特異性抗原決定基(例如在IgV域或其他特定域中)之抗體及/或選擇對VISTA蛋白質具有較高親和力及親合力之抗體。另外，篩選此等抗體以鑑別調節VISTA對活體外及活體內免疫性及免疫細胞之特異性功能及作用之抗體。舉例而言，可進行分析以探查特定抗VISTA抗體對由VISTA負向調節之免疫功能(包括利用CD4⁺或CD8⁺ T細胞之細胞激素產生、CD28協同刺激、CD4⁺ T細胞增殖及原態及記憶CD4⁺ T細胞增殖等)的調節作用(若有的話)。在一實施例中，進行分析以鑑別潛在治療性抗VISTA抗體，在存在VISTA-Ig時，該等抗體活體外增強VISTA-Ig之抑制，而此等抗VISTA抗體活體內相反地表現，亦即其為免疫抑制的。本發明涵蓋特異性結合至136個胺基酸胞外域(例如胺基酸1至50、50至100、100至136)之抗VISTA抗體及其用途、特異性結合IgV之抗體、特異性結合主幹區之抗體、特異性結合跨膜區之抗體及特異性結合VISTA細胞質區之抗體。本申請案中鑑別此等特異性區域。

在另一實施例中，重組哺乳動物表現載體能夠引導核酸優先表現於特定細胞類型中(例如使用組織特異性調節元件來使核酸表現)。組織特異性調節元件為此項技術中已知。適合之組織特異性啟動子之非限制性實例包括白蛋白啟動子(肝臟特異性；Pinkert等人 (1987))

Genes Dev. 1:268-277)、淋巴特異性啟動子(Calame及Eaton (1988) Adv. Immunol. 43:235-275)、T細胞受體之特定啟動子(Winoto及Baltimore (1989) **EMBO J.** 8:729-733)、及免疫球蛋白(Banerji等人 (1983) Cell 33:729-740; Queen及Baltimore (1983) Cell 33:741-748)、神經元特異性啟動子(例如神經絲啟動子; Byrne及Ruddle (1989) **Proc Natl. Acad. Sci. USA** 86:5473-5477)、胰臟特異性啟動子(Edlund等人 (1985) **Science** 230:912-916)及乳腺特異性啟動子(例如乳汁乳清啟動子; 美國專利第4,873,316號及歐洲申請公開案第264,166號)。亦涵蓋發育調節啟動子, 例如鼠類hox啟動子(Kessel及Gruss (1990) **Science** 249:374-379)及 α 胎蛋白啟動子(Campes及Tilghman (1989) Genes Dev. 3: 537-546)。

多株抗體

多株抗體為源自用抗原免疫接種之動物之血清的抗體分子之異質群體。選擇性結合VISTA及VISTA結合物之多株抗體利用此項技術中眾所周知之方法製備。參見例如Howard及Kaser (2007) **Making and Using Antibodies: A Practical Handbook** CRC Press。

單株抗體

單株抗體含有對抗原具特異性之實質上均質之抗體群體, 該群體含有實質上相似之抗原決定基結合位點。單株抗體可利用熟習此項技術者已知之方法獲得。參見例如Kohler及Milstein (1975) **Nature** 256: 495-497; 美國專利第4,376,110號; Ausubel等人 [編] (2011) **CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY**, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, NY.; 及Harlow及Lane (1998) **USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL** Cold Spring Harbor Laboratory; Colligan等人 (2005) [編] **Current Protocols in Immunology** Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, NY。該

等抗體可為任何免疫球蛋白種類，包括IgG、IgM、IgE、IgA、GILD及其任何亞類。產生本發明抗體之雜交瘤可活體外、原位或活體內培養。

嵌合抗體

嵌合抗體為不同部分源自不同動物物種的分子，諸如具有源自鼠類抗體之可變區及人類免疫球蛋白恆定區者，其主要用於在應用中降低免疫原性且在製備中提高產率，例如，其中鼠類單株抗體由融合瘤產生之產率較高，但對人類之免疫原性較高，因此使用人類鼠類嵌合單株抗體。嵌合抗體及其製備方法為此項技術中已知。參見Cabilly等人 (1984) **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 81: 3273-3277；Morrison等人 (1994) **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 81: 6851-6855, Boulianne等人 (1984) **Nature** 312: 643-646；Neuberger等人 (1985) **Nature** 314: 268-270；歐洲專利申請案173494 (1986)；WO 86/01533 (1986)；歐洲專利申請案184187 (1986)；歐洲專利申請案73494 (1986)；Sahagan等人 (1986) **J. Immunol.** 137: 1066-1074；Liu等人 (1987) **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 84: 3439-3443；Sun等人 (1987) **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 84: 214-218；Better等人 (1988) **Science** 240: 1041-1043；及 Harlow 及 Lane (1998) **USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL** Cold Spring Harbor Laboratory；美國專利第5,624,659號。

人類化抗體

人類化抗體經工程化而含有甚至更類似於人類之免疫球蛋白域，且僅併入源自動物之抗體的互補決定區。此可藉由檢查單株抗體可變區之高變環序列且使其適於人類抗體鏈之結構來達成。參見例如美國專利第6,187,287號。同樣地，產生人類化抗體之其他方法目前為此項技術中熟知。參見例如美國專利第5,225,539號、第5,530,101號、第5,585,089號、第5,693,762號、第6,054,297號、第6,180,370

號、第6,407,213號、第6,548,640號、第6,632,927號及第6,639,055號；Jones等人(1986) **Nature** 321: 522-525；Reichmann等人(1988) **Nature** 332: 323-327；Verhoeyen等人(1988) **Science** 239: 1534-36；及Zhiqiang An (2009) [編] **Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic** John Wiley & Sons, Inc。

抗體片段

除完整免疫球蛋白(或其重組對應物)之外，亦可合成包含抗原決定基結合位點之免疫球蛋白片段(例如Fab'、F(ab')₂或其他片段)。「片段」或最小免疫球蛋白可使用重組免疫球蛋白技術來設計。舉例而言，用於本發明中之「Fv」免疫球蛋白可藉由合成融合之輕鏈可變區及重鏈可變區而產生。抗體之組合亦相關，例如雙功能抗體，其包含兩種不同之Fv特異性。免疫球蛋白之抗原結合片段包括(但不限於)SMIP(小分子免疫藥物)、駱駝抗體、奈米抗體及IgNAR。

抗個體基因型抗體

抗個體基因型(抗Id)抗體為識別一般與抗體之抗原結合位點有關之獨特決定子的抗體。Id抗體可藉由用製備抗Id抗體之抗體將與抗體之來源相同之物種及遺傳類型(例如小鼠品系)的動物免疫接種來製備。經免疫接種之動物將藉由產生此等個體基因型決定子之抗體(抗Id抗體)而識別且回應免疫接種抗體之個體基因型決定子。參見例如美國專利第4,699,880號。抗Id抗體亦可用作「免疫原」以在另一動物體內誘導免疫反應，產生所謂之抗抗Id抗體。抗抗Id可與誘導抗Id之原始抗體在抗原決定基上一致。因此，藉由使用抗體之個體基因型決定子之抗體，有可能鑑別表現具有一致特異性之抗體之其他純系。

工程化且經修飾之抗體

本發明之抗體可進一步使用具有一或多個源自抗體起始物質之VH及/或VL序列的抗體以工程化經修飾之抗體來製備，該經修飾之抗

體之性質相較於起始抗體可已有改變。抗體可藉由修飾一或兩個可變區(亦即VH及/或VL)內，例如一或多個CDR區及/或一或多個構架區內之一或多個殘基來工程化。或者或另外，抗體可藉由修飾恆定區內之殘基以例如改變抗體之效應功能來工程化。

可執行之一類可變區工程化為CDR移植。抗體主要經由位於六個重鏈及輕鏈互補決定區(CDR)內之胺基酸殘基與靶抗原相互作用。出於此原因，在個別抗體之間，CDR內之胺基酸序列比CDR外之序列差異更大。由於CDR序列負責多數抗體-抗原相互作用，因此可能藉由構築包括移植至來自具有不同性質之不同抗體之構架序列上的來自特異性天然產生之抗體之CDR序列的表現載體來表現模仿特異性天然產生之抗體之性質的重組抗體。參見例如Riechmann等人 (1998) **Nature** 332: 323-327；Jones等人 (1986) **Nature** 321: 522-525；Queen等人 (1989) **Proc. Natl. Acad. U.S.A.** 86: 10029-10033；美國專利第5,225,539號、第5,530,101號、第5,585,089號、第5,693,762號及第6,180,370號。

適合之構架序列可自公共DNA資料庫或公開之參考文獻獲得，其包括生殖系抗體基因序列。舉例而言，人類重鏈及輕鏈可變區基因之生殖系DNA序列可見於「VBase」人類生殖系序列資料庫(可在網際網路上獲得)以及以下中：Kabat, E. A.等人 (1991) **Sequences of Proteins of Immunological Interest** [第5版]U.S. Department of Health and Human Services, NIH出版物第91-3242號；Tomlinson等人 (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；及Cox等人 (1994) **Eur. J Immunol.** 24: 827-836。

另一類可變區修飾為使VH及/或VL CDR1、CDR2及/或CDR3區

內之胺基酸殘基突變，從而改良相關抗體之一或多種結合性質(例如親和力)。可進行定點變突誘發或PCR介導之誘變以引入突變，且對抗體結合或其他相關功能性質之作用可在適當活體外或活體內分析中評估。較佳可引入保守性修飾(如本文所論述)。突變可為胺基酸取代、添加或缺失，但較佳為取代。此外，通常CDR區內不大於一個、兩個、三個、四個或五個殘基得以改變。

本發明之經工程設計抗體包括其中已對VH及/或VL內之構架殘基進行修飾(例如，以改良抗體性質)者。通常作出該等構架修飾以降低該抗體之免疫原性。舉例而言，一種方法為使一或多個構架殘基「回復突變」成相應生殖系序列。更特定言之，已經受體細胞突變之抗體可含有與由其衍生該抗體之生殖系序列不同的構架殘基。該等殘基可藉由比較抗體構架序列與抗體所源自之生殖系序列來鑑別。

除構架區或CDR區內所作之修飾以外，或取而代之，本發明之抗體可經工程化以包括Fc區內之修飾通常以改變該抗體之一或多種功能性質，諸如血清半衰期、補體結合、Fc受體結合及/或抗原依賴性細胞毒性。此外，本發明之抗體可經化學修飾(例如可將一或多個化學部分連接至抗體)或經修飾以改變其糖基化，再次改變抗體之一或多種功能性質。該等實施例進一步描述於下文中。Fc區中之殘基編號為Kabat之EU索引之編號。

CH1之絞鏈區可經修飾以使絞鏈區中半胱胺酸殘基之數目有所改變，例如增加或減少。參見美國專利第5,677,425號。CH1之絞鏈區中半胱胺酸殘基之數目可經改變以例如有助於輕鏈與重鏈組裝或增加或降低抗體之穩定性。

抗體之Fc絞鏈區可經突變以縮短抗體之生物半衰期。更特定而言，可將一或多個胺基酸突變引入Fc-絞鏈片段之CH2-CH3域界面區中，以使抗體對葡萄球菌蛋白A(*Staphylococcal protein A*；SpA)之結

合性相對於原生Fc-鉸鏈域對SpA之結合性有所削弱。例如參見美國專利第6,165,745號。

抗體可經修飾以延長其生物半衰期。多種方法可行。舉例而言，可引入以下一或多個突變：T252L、T254S、T256F。參見美國專利第6,277,375號。或者，為了增加生物半衰期，抗體在CH1或CL區內改變以含有自IgG之Fc區之CH2域之兩個環中獲取的補救受體結合抗原決定基。參見例如美國專利第5,869,046號及第6,121,022號。

Fc區可藉由用不同胺基酸殘基置換至少一個胺基酸殘基以改變抗體之效應功能來改變。舉例而言，選自胺基酸殘基234、235、236、237、297、318、320及322之一或多個胺基酸可經不同胺基酸殘基置換，以使抗體對效應配位體之親和力改變，但保留親本抗體之抗原結合能力。親和力可能有所改變之效應配位體可為例如Fc受體或補體之C1組分。參見美國專利第5,624,821號及第5,648,260號。

抗體之糖基化可經修飾。舉例而言，可產生去糖基化抗體(亦即抗體缺乏糖基化)。糖基化可經改變以例如增強抗體對抗原之親和力。該等碳水化合物修飾可藉由例如改變抗體序列內一或多個糖基化位點來達成。舉例而言，可進行一或多個胺基酸取代以消除一或多個可變區構架糖基化位點，從而消除該位點處之糖基化。該去糖化可增加抗體對抗原之親和力。參見例如美國專利第5,714,350號及第6,350,861號。

或者或另外，可製備糖基化類型有改變的抗體，諸如岩藻糖基殘基之量有所降低之低岩藻糖基化抗體或平分型GlcNac結構有所增加之抗體。已證明該等改變之糖化模式將增加抗體之ADCC能力。該等碳水化合物修飾可藉由例如使抗體在糖基化機構有所改變之宿主細胞中表現來達成。糖基化機構有所改變之細胞已在此項技術中加以描述且可用作宿主細胞以表現本發明之重組抗體，從而產生糖基化有所改

變之抗體。參見美國專利申請公開案第2004/0110704號及Yamane-Ohnuki等人 (2004) **Biotechnol Bioeng.** 87: 614-22 ; EP 1,176,195 ; WO 2003/035835 ; Shields等人 (2002) **J. Biol. Chem.** 277: 26733-26740 ; WO 99/54342 ; Umana等人 (1999) **Nat. Biotech.** 17: 176-180 ; 及Tarentino等人 (1975) **Biochem.** 14: 5516-23 。

抗體可經聚乙二醇化以例如延長抗體之生物(例如血清)半衰期。為使抗體聚乙二醇化，通常使該抗體或其片段與聚乙二醇(PEG)，諸如PEG之反應性酯或醛衍生物在其中一或多個PEG基團附著於該抗體或抗體片段上之條件下反應。較佳以反應性PEG分子(或類似反應性水溶性聚合物)經由醯化反應或烷基化反應進行聚乙二醇化。

本發明亦提供實質上與本文所述之抗體、抗體片段、雙功能抗體、SMIP、駱駝抗體、奈米抗體、IgNAR、多肽、可變區及CDR同源的變異體及等效物。此等變異體及等效物可含有例如保守性取代突變(亦即一或多個胺基酸經相似胺基酸取代)。舉例而言，保守性取代係指胺基酸經相同一般類別中之另一胺基酸取代，例如一個酸性胺基酸經另一酸性胺基酸取代、一個鹼性胺基酸經另一鹼性胺基酸取代，或一個中性胺基酸經另一中性胺基酸取代。

抗體結合物

另外，抗體(或其片段)可結合至治療性部分(諸如細胞毒素、治療劑或放射性金屬離子)上。細胞毒素或細胞毒性劑包括對細胞有害之任何製劑。實例包括紫杉醇(taxol)、細胞遲緩素B(cytochalasin B)、短桿菌肽D(gramicidin D)、溴化乙錠、吐根素(emetine)、絲裂黴素(mitomycin)、依託泊苷(etoposide)、特諾波賽(tenoposide)、長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、秋水仙鹼(colchicin)、阿黴素(doxorubicin)、道諾黴素(daunorubicin)、二羥基炭疽菌素二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌(mitoxantrone)、光神黴素

(mithramycin)、放線菌素D(actinomycin D)、1-脫氫睪固酮、糖皮質激素、普魯卡因(procaine)、丁卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛爾(propranolol)及嘌呤黴素及其類似物或同系物。治療劑包括(但不限於)抗代謝藥(例如甲胺喋呤、6-巰基嘌呤、6-硫鳥嘌呤、阿糖胞苷(cytarabine)、5-氟尿嘧啶達卡巴嗪(decarbazine))、烷化劑(例如二氯甲基二乙胺(mechlorethamine)、噻替哌(thioepa)苯丁酸氮芥(chlorambucil)、美法侖(melphalan)、卡莫司汀(carmustine)(BSNU)及洛莫司汀(lomustine)(CCNU)、環磷醯胺、白消安(busulfan)、二溴甘露醇、鏈佐黴素(streptozotocin)、絲裂黴素C、及順式二氯二胺鉑(II)(DDP)順鉑)、蔥環黴素(例如道諾黴素(以前為柔毛黴素)及阿黴素)、抗生素(例如更生黴素(以前為放線菌素)、博萊黴素、光神黴素及胺茴黴素(anthracycline)(AMC))及抗有絲分裂劑(例如長春新鹼及長春鹼)。

工程化抗體之方法

具有本文揭示之VH及VL序列的抗體可用於藉由修飾VH及/或VL序列或其所連接之恆定區來形成新變異型抗體。因此，本發明之變異體抗體之結構特徵用於形成在結構上相關之變異體抗體，該等變異體抗體保留本發明之抗體之至少一種功能性質，諸如結合至VISTA及VISTA結合物。舉例而言，一個抗VISTA變異體抗體或抗VISTA結合物變異體抗體之一或多個CDR區或其突變可與已知構架區及/或其他CDR以重組方式組合，從而如本文所述形成本發明之其他以重組方式工程化之抗VISTA或抗VISTA結合物抗體(例如結合VISTA及VISTA結合物之抗體)。工程化方法之起始物質可為本文提供之一或多個VH及/或VK序列或其一或多個CDR區。為形成經工程化之抗體，不需要實際製備(亦即表現成蛋白質)具有本文提供之一或多個VH及/或VK序列或其一或多個CDR區的抗體。而是，使用序列中所含之資訊作為起始

物質來形成源自原始序列之「第二代」序列且接著製備「第二代」序列且使其表現成蛋白質。可使用標準分子生物學技術來製備及表現改變之抗體序列。

由改變之抗體序列編碼之抗體可保留由本文提供之方法及序列產生之抗VISTA或抗VISTA結合物抗體的一個、一些或所有功能性質，該等功能性質包括以特定KD水準或較低KD水準結合至變異體VISTA或變異體VISTA結合物及/或調節免疫細胞活性、及/或選擇性結合至所需目標細胞(諸如結腸直腸癌、肺癌、前列腺癌、胰腺癌、卵巢癌、胃癌及肝癌)。改變之抗體的功能性質可使用此項技術中可利用及/或本文所述之標準分析來評估。

突變可隨機或選擇性地沿著所有或一部分抗VISTA或抗VISTA結合物抗體編碼序列引入，且所得經修飾之抗VISTA或抗VISTA結合物抗體可針對結合活性及/或其他所需功能性質進行篩選。參見WO 2011/120013。

編碼選擇性結合VISTA或VISTA結合物之抗體之核酸

本發明之另一實施例係關於編碼結合VISTA及VISTA結合物之本發明之抗體的核酸分子。核酸可存在於全細胞中、細胞溶解物中或以部分純化或實質上純形式存在。核酸可藉由利用標準技術自其他細胞組分或其他污染物(例如其他細胞核酸或蛋白質)純化而分離，該等標準技術包括鹼性/SDS處理、CsCl顯帶、管柱層析、瓊脂糖凝膠電泳以及此項技術中熟知之其他標準技術。參見 Ausubel 等人 (2011) **Current Protocols in Molecular Biology** John Wiley & Sons, Inc。本發明之核酸可例如為DNA或RNA且可能或可能不含有內含子序列。核酸可為cDNA分子。

本發明之核酸可使用標準分子生物學技術獲得。對於藉由融合瘤(例如下文所進一步描述由帶有人類免疫球蛋白基因之轉殖基因小

鼠製備之融合瘤)表現之抗體，編碼由融合瘤產生之抗體之輕鏈及重鏈的cDNA可藉由標準PCR擴增或cDNA選殖技術獲得。對於自免疫球蛋白基因文庫(例如使用噬菌體呈現技術)獲得之抗體，編碼該抗體之核酸可自文庫回收。

特定而言，簡併密碼子取代可藉由產生例如一或多個所選密碼子之第三個位置經混合鹼基及/或脫氧肌苷殘基取代的序列來達成。Batzer等人 (1991) **Nucleic Acid Res.** 19: 5081；Ohtsuka等人 (1985) **J. Biol. Chem.** 260: 2605-08；Rossolini等人 (1994) **Mol. Cell. Probes** 8: 91-98。

一旦獲得編碼VH及VL區段之DNA片段，即可進一步藉由標準重組DNA技術操作此等DNA片段，以例如使該等可變區基因轉化為全長抗體鏈基因、轉化為Fab片段基因或scFv基因。在此等操作中，使編碼VL或VH之DNA片段可操作地連接至編碼另一蛋白質之另一DNA片段，諸如抗體恆定區或柔性連接子。

編碼VH區的分離之DNA可藉由使該編碼VH之DNA可操作地連接至另一編碼重鏈恆定區(CH1、CH2及CH3)之DNA分子而轉化成全長重鏈基因。人類重鏈恆定區基因之序列在此項技術中為已知的(參見例如 Kabat 等人 (1991) **Sequences of Proteins of Immunological Interest**, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 出版物第91-3242號)且包含此等區域之DNA片段可藉由標準PCR擴增來獲得。重鏈恆定區可為IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恆定區，但最佳為IgG1或IgG4恆定區。對於Fab片段重鏈基因而言，可使編碼VH之DNA可操作地連接至另一僅編碼重鏈CH1恆定區之DNA分子。

可藉由使編碼VL之DNA與編碼輕鏈恆定區(CL)之另一DNA分子可操作地連接而將編碼VL區之經分離的DNA轉化成全長輕鏈基因(以

及Fab輕鏈基因)。人類輕鏈恆定區基因之序列在此項技術中為已知的(參見例如Kabat等人 (1991) **Sequences of Proteins of Immunological Interest**, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 出版物第91-3242號)且包含此等區域之DNA片段可藉由標準PCR擴增來獲得。輕鏈恆定區可為 κ 或 λ 恆定區, 但最佳為 κ 恆定區。

為形成scFv基因, 使編碼VH之DNA片段及編碼VL之DNA片段可操作地連接至編碼柔性連接子(例如編碼胺基酸序列(Gly4-Ser)₃)之另一片段, 以使VH序列及VL序列可表現為相鄰單鏈蛋白質, 其中VL與VH區藉由柔性連接子連接。參見例如Bird等人 (1988) **Science** 242: 423-426; Huston等人 (1988) **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 85: 5879-5883; McCafferty等人 (1990) **Nature** 348: 552-554。

製造抗體及其片段之方法

本發明亦提供製造抗體及其片段之方法。製造抗體之方法為一般技術者所熟知。舉例而言, 製造嵌合抗體之方法目前為此項技術中所熟知。參見例如美國專利第4,816,567號; Morrison等人 (1984) **PNAS USA** 81: 8651-55; Neuberger等人 (1985) **Nature** 314: 268-270; Boulianne等人 (1984) **Nature** 312: 643-46。

舉例而言, 抗體或抗原結合片段可藉由基因工程化而產生。在此技術中, 如同其他方法, 使產生抗體之細胞對所需抗原或免疫原敏感。使用自產生抗體之細胞分離之信使RNA作為模板以使用PCR擴增製得cDNA。藉由將擴增之免疫球蛋白cDNA之適當部分插入表現載體中來產生各自含有保留初始抗原特異性之一個重鏈基因及一個輕鏈基因的載體之文庫。藉由將重鏈基因文庫與輕鏈基因文庫組合來建構組合文庫。此舉產生共表現重鏈及輕鏈(類似於抗體分子之Fab片段或抗原結合片段)之純系的文庫。將帶有此等基因之載體共轉染至宿主細胞中。當在轉染之宿主中誘導抗體基因合成時, 重鏈與輕鏈蛋白質自

行組裝，從而產生活性抗體，其可藉由用抗原或免疫原篩選而偵測。

本發明之抗體及其片段亦可藉由使用為一般技術者所熟知之習知技術構築含有操縱子及編碼抗體重鏈之DNA序列的表現載體來製備，其中編碼抗體特異性所需之CDR的DNA序列源自非人類細胞來源，而編碼抗體鏈之其餘部分的DNA序列源自人類細胞來源。此外，本發明係關於載體，尤其質體、黏質體、病毒、噬菌體及其他在基因工程化中常見之載體，其含有本發明之上述核酸分子。載體中所含之核酸分子可連接至調節元件，其確保在原核及真核細胞中進行轉錄。

載體含有有助於操作之元件以使外來蛋白質表現在目標宿主細胞中。宜首先在細菌宿主(例如大腸桿菌)中操作序列及產生用於轉型之DNA，且載體通常將包括有助於該等操作之序列，包括細菌複製起點及適當之細菌選擇標誌物。選擇標誌物編碼為選擇性培養基中生長的轉型之宿主細胞存活或生長所需的蛋白質。非經含有選擇基因之載體轉型之宿主細胞將無法在培養基中存活。典型選擇基因編碼賦予對抗生素或其他毒素之抗性，補充營養缺陷性缺乏或提供不可自複合培養基得到之關鍵營養素的蛋白質。此項技術中描述用於酵母轉型之例示性載體及方法。參見例如Burke等人 (2000) **Methods in Yeast Genetics** Cold Spring Harbor Laboratory Press。

相關編碼之多肽序列可操作地連接至使得多肽在酵母細胞中表現之轉錄及轉譯調節序列。此等載體組分可包括(但不限於)以下中之一或多者：強化子元件、啟動子及轉錄終止序列。亦可包括使多肽分泌之序列(例如信號序列)。

核酸在經置放而與另一核酸序列呈功能關係時為「可操作地連接的」。舉例而言，若信號序列之DNA表現成參與多肽分泌之前蛋白，則其可操作地連接至多肽之DNA；若啟動子或強化子影響序列轉錄，則其可操作地連接至編碼序列。一般而言，「可操作地連接」廣

泛地指連續連接之DNA序列，且在分泌性前導序列之情況下，指連續且處於閱讀框架中之DNA序列。然而，增強子不必為相鄰的。

啟動子為位於結構基因之起始密碼子上游(5')(一般在約100 bp至1000 bp範圍內)且控制其可操作地連接之特定核酸序列轉錄及轉譯的非轉譯序列。該等啟動子屬於多種類別：誘導性、組成性及阻遏型啟動子(例如，其回應於不存在阻遏子而提高轉錄量)。誘導性啟動子可回應於培養條件之某種改變(例如存在或不存在營養素或溫度改變)而引起DNA在其控制下之轉錄量有所提高。

第二表現載體可使用為一般技術者所熟知之相同習知方式產生，該表現載體含有操縱子及編碼抗體輕鏈之DNA序列，其中編碼為抗體特異性所需之CDR的DNA序列源自非人類細胞來源，較佳源自家兔B細胞來源，而編碼抗體鏈之其餘部分的DNA序列源自人類細胞來源。

藉由為一般技術者所熟知之習知技術將表現載體轉染至宿主細胞中，產生轉染之宿主細胞，藉由為一般技術者所熟知之習知技術培養該轉染之宿主細胞，產生該等抗體多肽。

可用上文所述之兩種表現載體共轉染宿主細胞，第一表現載體含有編碼操縱子及源自輕鏈之多肽的DNA且第二載體含有編碼操縱子及源自重鏈之多肽的DNA。兩種載體含有不同之可選標誌物，但較佳使得重鏈與輕鏈多肽達成實質上相等之表現。或者，可使用單個載體，該載體包括編碼重鏈及輕鏈多肽之DNA。重鏈及輕鏈之編碼序列可包含cDNA、基因組DNA或兩者。

用於表現抗體及其片段之宿主細胞可為細菌細胞(諸如大腸桿菌)或真核細胞。可使用用於此目的之明確類型之哺乳動物細胞，諸如骨髓瘤細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)、NSO或HEK293細胞株。

可構築載體之一般方法、產生宿主細胞所需之轉染方法以及由

該等宿主細胞產生抗體及其片段所需之培養方法均包括習知技術。雖然用於產生抗體之細胞株較佳為哺乳動物細胞株，但可使用任何其他適合之細胞株，諸如細菌細胞株，諸如源自大腸桿菌之細菌菌株，或酵母細胞株。

同樣，在產生後，可根據此項技術中之標準程序，諸如交叉流過濾、硫酸銨沈澱及親和管柱層析來純化抗體。

使用動物產生結合VISTA或VISTA結合物之抗體

選擇性結合VISTA及VISTA結合物之本發明之抗體可為人類單株抗體。針對VISTA及VISTA結合物引導之該等人類單株抗體可使用攜帶人類免疫系統而非小鼠系統之一部分之轉殖基因或轉染色體小鼠產生。此等轉殖基因及轉染色體小鼠包括本文中分別稱作HuMAb Mouse®及KM Mouse®之小鼠，且在本文中統稱為「人類Ig小鼠」。HuMAb小鼠®(Medarex, Inc.)含有編碼未重排人類重鏈(μ 及 γ)及 κ 輕鏈免疫球蛋白序列之人類免疫球蛋白基因微衛星基因座(miniloci)以及使內源性 μ 及 κ 鏈基因座不活化之靶向突變。參見例如Lonberg等人 (1994) **Nature** 368(6474): 856-859。因此，小鼠展現小鼠IgM或 κ 之表現減少，且回應於免疫接種，所引入之人類重鏈及輕鏈轉殖基因經歷類別轉換及體細胞突變以產生較高親和力的人類IgG κ 單株。Lonberg (1994) **Handbook of Experimental Pharmacology** 113: 49-101；Lonberg及Huszar (1995) **Intern. Rev. Immunol.** 13: 65-93；及Harding及Lonberg (1995) **Ann. NY. Acad. Sci.** 764: 536-546。HuMAb Mouse®之製備及使用及由該等小鼠攜帶之基因組修飾進一步描述於以下中：Taylor等人 (1992) **Nucleic Acids Research** 20: 6287-6295；Chen等人 (1993) **International Immunology** 5: 647-656；Tuailon等人 (1993) **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90: 3720-3724；Choi等人 (1993) **Nature Genetics** 4: 117-123；Chen等人 (1993) **EMBO J.** 12: 821-830；

Tuailon等人 (1994) **J. Immunol.** 152: 2912-2920 ; Taylor等人 (1994) **International Immunology** 6: 579-591 ; 及 Fishwild 等人 (1996) **Nature Biotechnology** 14: 845-851。進一步參見美國專利第5,545,806號、第5,569,825號、第5,625,126號、第5,633,425號、第5,789,650號、第5,877,397號、第5,661,016號、第5,814,318號、第5,874,299號、第5,770,429號及第5,545,807號；WO 92/03918、WO 93/12227、WO 94/25585、WO 97/13852、WO 98/24884、WO 99/45962及WO 01/14424。

本發明之人類抗VISTA及抗VISTA-Ig結合物抗體(例如選擇性結合VISTA及VISTA結合物之抗體)可使用在轉殖基因及轉染色體上攜帶人類免疫球蛋白序列之小鼠(諸如攜帶人類重鏈轉殖基因及人類輕鏈轉染色體之小鼠)產生。在本文中稱作「KM mice®」之該等小鼠詳細描述於WO 02/43478中。

更進一步地，表現人類免疫球蛋白基因之替代性轉殖基因動物系統可在此項技術中獲得且可用於產生本發明之抗VISTA及抗VISTA-Ig結合物抗體。舉例而言，可使用稱為Xenomouse(Abgenix, Inc.)之替代性轉殖基因系統；該等小鼠描述於例如美國專利第5,939,598號、第6,075,181號、第6,114,598號、第6,150,584號及第6,162,963號中。

此外地，表現人類免疫球蛋白基因之替代性轉染色體動物系統可在此項技術中獲得且可用於產生本發明之抗VISTA及抗VISTA-Ig結合物抗體。舉例而言，可使用帶有人類重鏈轉染色體及人類輕鏈轉染色體之稱為「TC小鼠」之小鼠。參見Tomizuka等人 (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 722-727。此外，此項技術中已描述攜帶人類重鏈及輕鏈轉染色體之牛(Kuroiwa等人 (2002) **Nature Biotechnology** 20: 889-894)且可用於產生本發明之抗VISTA及抗VISTA-Ig結合物抗體。

本發明之人類單株抗體亦可使用噬菌體呈現方法篩選人類免疫球蛋白基因文庫來製備。用於分離人類抗體之該等噬菌體呈現方法在此項技術中經建立。參見例如美國專利第5,223,409號、第5,403,484號、第5,571,698號、第5,427,908號、第5,580,717號、第5,969,108號、第6,172,197號、第5,885,793號、第6,521,404號、第6,544,731號、第6,555,313號、第6,582,915號及第6,593,081號。

本發明之人類單株抗體亦可使用SCID小鼠製備，在該等SCID小鼠中，人類免疫細胞已經復原，從而在免疫後可產生人類抗體反應。參見例如美國專利第5,476,996號及第5,698,767號。

當人類Ig小鼠用於產生本發明之人類抗體時，該等小鼠可用VISTA及VISTA結合物多肽之經純化或增濃之製備物免疫接種，如由Lonberg等人 (1994) *Nature* 368(6474): 856-859；Fishwild等人 (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851；WO 98/24884及WO 01/14424所述。小鼠在首次輸注時較佳為6至16週齡。舉例而言，VISTA及VISTA結合物之經純化或重組之製備物(5 µg至50 µg)可用於腹膜內免疫接種人類Ig小鼠。

其他人在使用各種抗原方面的先前經驗已展示，當最初用於完全弗氏佐劑中之抗原進行腹膜內(IP)免疫接種，繼而每隔一週用於不完全弗氏佐劑中之抗原進行IP免疫接種一次(達總共6次)時，轉殖基因小鼠起反應。然而，亦發現除弗氏佐劑以外的佐劑為有效的。另外，發現全細胞在不存在佐劑下具較高免疫原性。可在免疫方案過程期間藉由由後眼眶取血獲得血漿樣品來監測免疫反應。血漿利用ELISA篩選(如下文所述)，且具有充分效價之抗VISTA或抗VISTA-Ig人類免疫球蛋白之小鼠可用於融合。可在處死且移出脾前3天用抗原以靜脈內方式使小鼠增強免疫。預期各次免疫可能需要進行2-3次融合。對於各抗原，通常使6至24隻小鼠免疫。通常使用HCo7及HCo12品系。另

外，HCo7及HCo12轉殖基因可在具有兩種不同人類重鏈轉殖基因(HCo7/HCo12)之單個小鼠體內共同繁殖。或者或另外，可使用KM Mouse®品系。

產生製造本發明之人類單株抗體之融合瘤

為產生可產生本發明之人類單株抗體的融合瘤，可分離來自經免疫接種之小鼠的脾細胞及/或淋巴結細胞且使其融合至適當之永生細胞株，諸如小鼠骨髓瘤細胞株。可針對抗原特異性抗體之產生篩選所得之融合瘤。舉例而言，可用50% PEG使來自經免疫接種之小鼠的脾淋巴細胞之單細胞懸浮液融合至六分之一數目之P3X63-Ag8.653非分泌型小鼠骨髓瘤細胞(ATCC，CRL 1580)。可將約 2×10^5 個細胞接種於平底微量滴定盤中，繼而在含有以下之選擇性培養基中培育兩週：20%胎牛血清、18%「653」條件培養基、5% origen(IGEN)、4 mM L-麩醯胺酸、1 mM丙酮酸鈉、5 mM HEPES、0.055 mM 2-巰基乙醇、50單位/毫升青黴素(penicillin)、50 mg/ml鏈黴素(streptomycin)、50 mg/ml慶大黴素(gentamycin)及 $1 \times \text{HAT}$ (Sigma；HAT在融合後24小時添加)。在約兩週後，可在用HT替換HAT之培養基中培養細胞。接著可藉由ELISA針對人類單株IgM及IgG抗體篩選個別孔。在出現廣泛融合瘤生長後，通常可在10至14天後觀測培養基。可重接種分泌抗體之融合瘤，再篩選，且若針對人類IgG仍呈陽性，則可藉由限制稀釋法次選殖單株抗體至少兩次。接著可在活體外培養穩定之次純系以在組織培養基中產生少量抗體以供表徵。

為純化人類單株抗體，可使所選融合瘤在兩公升旋轉燒瓶中生長以純化單株抗體。可過濾上清液且濃縮，隨後用蛋白質A-瓊脂糖(Pharmacia, Piscataway, N.J.)進行親和層析。可藉由凝膠電泳及高效液相層析檢驗溶離之IgG以確保純度。可將緩衝溶液交換成PBS，且可使用1.43消光係數藉由OD280測定濃度。可等分單株抗體且儲存

於-80°C下。

轉殖基因動物

本發明之宿主細胞亦可用於製造非人類轉殖基因動物。舉例而言，在一個實施例中，本發明之宿主細胞為受精之卵母細胞或已引入編碼VISTA之序列的胚胎幹細胞。該等宿主細胞可接著用於形成外源性VISTA序列已引入基因組中之非人類轉殖基因動物或內源性VISTA序列已改變之同源重組動物。該等動物適用於研究VISTA之功能及/或活性且適用於鑑別及/或評估VISTA活性之調節劑。如本文所用，「轉殖基因動物」為非人類動物，較佳為哺乳動物，更佳為嚙齒動物，諸如大鼠或小鼠，其中該等動物細胞中之一或多者包括轉殖基因。轉殖基因動物之其他實例包括非人類靈長類動物、綿羊、狗、牛、山羊、雞、兩棲動物及其類似動物。轉殖基因為外源性DNA，其整合至細胞之基因組(自該基因組產生轉殖基因動物)中且其保留在成熟動物之基因組中，藉此在轉殖基因動物之一或多種細胞類型或組織中引導所編碼之基因產物之表現。如本文所用，「同源重組動物」為非人類動物，較佳為哺乳動物，更佳為小鼠，其中內源性VISTA基因已在動物發育之前藉由內源性基因與引入該動物細胞(例如動物之胚胎細胞)中之外源性DNA分子之間的同源重組而改變。本發明之轉殖基因動物可藉由以下方式形成：將編碼VISTA之核酸引入(例如藉由顯微注射、反轉錄病毒感染)經受精之卵母細胞之雄原核，且允許該卵母細胞在假孕雌性寄養動物中發育。SEQ ID NO: 1或4之VISTA cDNA序列可作為轉殖基因引入非人類動物之基因組中。或者，可將人類VISTA基因之非人類同源物(諸如猴或大鼠VISTA基因)用作轉殖基因。或者，VISTA基因同源物(諸如另一VISTA家族成員)可基於與SEQ ID NO: 1或3之VISTA cDNA序列雜交而分離且用作轉殖基因。內含子序列及聚腺苷酸化信號亦可包括於轉殖基因中以增加轉殖基因之

表現效率。組織特異性調節序列可操作地連接於VISTA轉殖基因以引導VISTA多肽表現至特定細胞中。經由胚胎操作及顯微注射產生轉殖基因動物(尤其諸如小鼠之動物)的方法在此項技術中已變成習知的，且描述於例如以下中：Leder等人之美國專利第4,736,866號及第4,870,009號；Wagner等人之美國專利第4,873,191號；及Hogan, B., *Manipulating the Mouse Embryo*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)。類似方法用於製備其他轉殖基因動物。轉殖基因創始動物可基於其基因組中存在VISTA轉殖基因及/或在動物之組織或細胞中表現VISTA mRNA來鑑別。轉殖基因創始動物可接著用於繁育攜帶該轉殖基因之其他動物。此外，攜帶編碼VISTA多肽之轉殖基因之轉殖基因動物可另外繁育成攜帶其他轉殖基因之其他轉殖基因動物。

為了形成同源重組動物，製備載體，其含有VISTA基因之至少一部分，該VISTA基因中已引入缺失、添加或取代以藉此改變(例如功能上地破壞)該VISTA基因。VISTA基因可為人類或鼠類基因(例如SEQ ID NO: 1或3之cDNA)。

在另一實施例中，可產生含有所選系統之轉殖基因非人類動物，該等系統允許轉殖基因之經調節之表現。此類系統之一個實例為噬菌體P1之cre/loxP重組酶系統。對於cre/loxP重組酶系統之說明，參見例如Lakso等人 (1992) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 89:6232-6236。重組酶系統之另一實例為釀酒酵母之FLP重組酶系統(O'Gorman等人 (1991) *Science* 251:1351-1355。若cre/loxP重組酶系統用於調節轉殖基因之表現，則需要含有編碼Cre重組酶及所選多肽兩者之轉殖基因之動物。該等動物可經由「雙」轉殖基因動物之結構，例如藉由使兩種轉殖基因動物(一種含有編碼所選多肽之轉殖基因且另一種含有編碼重組酶之轉殖基因)交配來提供。

亦可根據 Wilmut 等人 (1997) **Nature** 385: 810-813、WO 97/07668 及 WO 97/07669 中所述方法產生本文所述之非人類轉殖基因動物之純系。簡言之，可分離來自轉殖基因動物之細胞(例如體細胞)，且誘導其退出生長週期且進入 G0 期。接著，可例如經由使用電脈衝將休眠細胞融合至來自與分離休眠細胞之物種相同之物種之動物的去核卵母細胞上。接著培養再構築之卵母細胞，使得其發育至桑椹胚或胚胎階段，隨後轉移至假孕雌性寄養動物中。出身於此雌性寄養動物之後代為動物之純系，自其分離細胞(例如體細胞)。

標記

本文所述之多肽、結合物及抗體可經轉譯後修飾以添加效應物部分，諸如化學連接基團、可偵測部分，諸如螢光染料、酶、受質、生物發光物質、放射性物質、化學發光部分、細胞毒性劑、放射性物質或功能性部分。

如此項技術中已知，多種實體(例如配位體)可偶合至寡核苷酸上。配位體可包括天然產生之分子或重組或合成分子。例示性配位體包括(但不限於)親合素(avidin)、生物素、肽、肽模擬物、聚離胺酸(PLL)、聚乙二醇(PEG)、mPEG、陽離子基、精胺、亞精胺、聚胺、促甲狀腺素、促黑素、凝集素、醣蛋白、界面活性蛋白 A、黏蛋白、糖基化聚胺基酸、轉鐵蛋白、適體、免疫球蛋白(例如抗體)、胰島素、轉鐵蛋白、白蛋白、糖、親脂性分子(例如類固醇、膽汁酸、膽固醇、膽酸及脂肪酸)、維生素 A、維生素 E、維生素 K、維生素 B、葉酸、B12、核黃素、生物素、吡哆醛、維生素輔因子、脂多醣、激素及激素受體、凝集素、碳水化合物、多價碳水化合物、放射性標記之標記、螢光染料及其衍生物。參見例如美國專利第 6,153,737 號、第 6,172,208 號、第 6,300,319 號、第 6,335,434 號、第 6,335,437 號、第 6,395,437 號、第 6,444,806 號、第 6,486,308 號、第 6,525,031 號、第

6,528,631號、及第6,559,279號。

另外，可將部分添加至抗原或抗原決定基以延長活體內半衰期(例如，藉由延長自血流清除之時間)。該等技術包括例如添加PEG部分(亦稱為聚乙二醇化)且為此項技術中所熟知。參見美國專利申請公開案第2003/0031671號。

本文所述之抗原、抗體或其抗原結合片段在其經由非隨機化學或物理相互作用與固體標記締合時可「連接」至基質。可經由共價鍵連接。然而，連接無須為共價或永久性連接。物質可經由「間隔分子」或「連接基團」連接至標記。該等間隔分子為具有連接至生物物質之第一部分以及連接至標記之第二部分的分子。因此，當連接至標記時，間隔分子分離標記與生物物質，但連接至兩者。將生物物質(例如標記)連接至標記的方法在此項技術中為熟知的，且包括(但不限於)化學偶合。

可偵測標記

本文所述之VISTA及VISTA結合物可經轉譯後修飾以添加效應物標記，諸如化學連接基團；可偵測標記，諸如螢光染料、酶、受質、生物發光物質、放射性物質及化學發光標記；或功能標記，諸如抗生素、蛋白質、抗生物素蛋白、生物素、細胞毒素、細胞毒性劑及放射性物質。其他例示性酶包括(但不限於)辣根過氧化酶、乙醯膽鹼酯酶、鹼性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶及螢光素酶。其他例示性螢光物質包括(但不限於)若丹明(rhodamine)、螢光素、異硫氰酸螢光素、傘酮、二氯三嗪基胺、藻紅素及丹醯氯。其他例示性化學發光標記包括(但不限於)魯米諾(luminol)。其他例示性生物發光物質包括(但不限於)螢光素、螢光素酶及水母發光蛋白。其他例示性放射性物質包括(但不限於)銻-213(^{213}Bs)、碳-14(^{14}C)、碳-11(^{11}C)、氯-18(^{18}Cl)、鉻-51(^{51}Cr)、鈷-57(^{57}Co)、鈷-60(^{60}Co)、銅-64(^{64}Cu)、銅-67(^{67}Cu)、鎢-

^{165}Dy 、鉕- ^{169}Er 、氟- ^{18}F 、鎳- ^{67}Ga 、鎳- ^{68}Ga 、鎳- ^{68}Ge 、鈦- ^{166}Ho 、銦- ^{111}In 、碘- ^{125}I 、碘- ^{123}I 、碘- ^{124}I 、碘- ^{131}I 、銥- ^{192}Ir 、鐵- ^{59}Fe 、氬- ^{81}Kr 、鉛- ^{212}Pb 、鐳- ^{177}Lu 、鉬- ^{99}Mo 、氮- ^{13}N 、氧- ^{15}O 、鈀- ^{103}Pd 、磷- ^{32}P 、鉀- ^{42}K 、銑- ^{186}Re 、銑- ^{188}Re 、銣- ^{81}Rb 、銣- ^{82}Rb 、釷- ^{153}Sm 、銨- ^{75}Se 、鈉- ^{24}Na 、銦- ^{82}Sr 、銦- ^{89}Sr 、硫- ^{35}S 、鎝- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、鉭- ^{201}Tl 、氫(^3H)、氙- ^{133}Xe 、鐳- ^{169}Yb 、鐳- ^{177}Yb 及釔- ^{90}Y 。

細胞毒性劑

對於製造細胞毒性劑，可使用此項技術中已知之技術將本發明之VISTA多肽及VISTA結合物連接、或可操作地連接至毒素上。已知可結合至本發明之多肽或抗體上之多種毒素。實例包括：許多有用植物來源、真菌來源或甚至細菌來源之毒素，該等毒素例如包括：各種A鏈毒素，尤其蓖麻毒素A鏈；核糖體不活化蛋白質，諸如沙泊寧(saporin)或白樹素(geloinin)； α -帶麴菌素(α -sarcin)；曲黴菌素；侷限麴菌素；及核糖核酸酶，諸如胎盤核糖核酸酶，血管生成；白喉毒素；或假單胞菌外毒素。結合本發明使用之較佳毒素部分為已經處理以修飾或移除碳水化合物殘基之毒素A鏈，去糖基化A鏈。美國專利第5,776,427號。

本文所述之VISTA及VISTA結合物可結合至細胞毒性劑，該等細胞毒性劑包括(但不限於)甲胺喋呤、胺基蝶呤、6-巰基嘌呤、6-硫鳥嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶達卡巴嗪；烷化劑，諸如二氯甲基二乙胺、噻替哌、苯丁酸氮芥、美法倫、卡莫司汀(BSNU)、絲裂黴素C、洛莫司汀(CCNU)、1-甲基亞硝基脲、環磷醯胺、二氯甲基二乙胺、白消安(busulfan)、二溴甘露醇、鏈佐黴素、絲裂黴素C、順式二氯二胺

鉑(II)(DDP)順鉑及卡鉑(佳鉑帝(paraplatin))；蔥環黴素，包括道諾黴素(以前為柔毛黴素)、阿黴素(阿德力黴素(adriamycin)、地托比星(detorubicin)、洋紅黴素(carminomycin)、伊達比星(idarubicin)、表阿黴素(epirubicin)、米托蔥醌及比生群(bisantrene)；抗生素，包括更生黴素(放線菌素D)、博萊黴素、卡奇黴素(calicheamicin)、光神黴素及胺茴黴素(AMC)；及抗有絲分裂劑，諸如長春花屬生物鹼(vinca alkaloid)、長春新鹼及長春鹼。其他細胞毒性劑包括太平洋紫杉醇(paclitaxel)(TAXOL[®])、蓖麻毒素、假單胞菌外毒素、吉西他濱(gemcitabine)、細胞遲緩素B、短桿菌素D、溴化乙錠、吐根素、依託泊苷、特諾波賽、秋水仙鹼、二羥基炭疽菌素二酮、1-去脫氫睪固酮、糖皮質激素、普魯卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛爾、嘌呤黴素、丙卡巴肼(procarbazine)、脘脲、天冬醯胺酶、皮質類固醇、米托坦(mytotane)(O,P'-(DDD))、干擾素及此等細胞毒性劑之混合物。

其他細胞毒性劑包括(但不限於)化學治療劑，諸如卡鉑、順鉑、太平洋紫杉醇、吉西他濱、卡奇黴素、阿黴素、5-氟尿嘧啶、絲裂黴素C、放線菌素D、環磷醯胺、長春新鹼、博萊黴素、VEGF拮抗劑、EGFR拮抗劑、鉑、紫杉醇、伊立替康、5-氟尿嘧啶、吉西他濱、甲醯四氫葉酸(leucovorine)、類固醇、環磷醯胺、美法侖、長春花屬生物鹼(例如長春鹼、長春新鹼、長春地辛(vindesine)及長春瑞濱(vinorelbine))、氮芥、酪胺酸激酶抑制劑、放射療法、性激素拮抗劑、選擇性雄激素受體調節劑、選擇性雌激素受體調節劑、PDGF拮抗劑、TNF拮抗劑、IL-1拮抗劑、白介素(例如IL-12或IL-2)、IL-12R拮抗劑、毒素結合之單株抗體、腫瘤抗原特異性VISTA單株、Erbix[®]、Avastin[®]、帕妥珠單抗(Pertuzumab)、抗CD20抗體、Rituxan[®]、歐克力單抗(ocrelizumab)、奧法姆單抗(ofatumumab)、DXL625、Herceptin[®]或其任何組合。來自植物及細菌之毒性酶(諸如

蓖麻毒素、白喉毒素及假單胞菌毒素)可結合至人類化抗體或其結合片段以產生細胞類型特異性殺死試劑。Youle等人 (1980) **Proc. Nat'l Acad. Sci. USA** 77: 5483 ; Gilliland等人 (1980) **Proc. Nat'l Acad. Sci. USA** 77: 4539 ; Krolick等人 (1980) **Proc. Nat'l Acad. Sci. USA** 77: 5419。其他細胞毒性劑包括細胞毒性核糖核酸酶。參見美國專利第 6,653,104號。

本文所述之VISTA蛋白質可結合至發射 α 或 β 粒子之放射性核素上(例如放射免疫結合物)。該等放射性同位素包括(但不限於) β -發射體，諸如磷-32(^{32}P)、釷-47(^{47}Sc)、銅-67(^{67}Cu)、鎵-67(^{67}Ga)、釷-88(^{88}Y)、釷-90(^{90}Y)、碘-125(^{125}I)、碘-131(^{131}I)、釷-153(^{153}Sm)、鐳-177(^{177}Lu)、釷-186(^{186}Re)、釷-188(^{188}Re)；及 α -發射體，諸如砒-211(^{211}At)、鉛-212(^{212}Pb)、鉍-212(^{212}Bi)、鉍-213(^{213}Bi)或錒-225(^{225}Ac)。

將本文所述之VISTA及VISTA結合物結合至標記上之方法為此項技術中已知，諸如由Hunter等人 (1962) **Nature** 144: 945、David等人 (1974) **Biochemistry** 13: 1014、Pain等人 (1981) **J. Immunol. Meth.** 40: 219及Nygren (1982) **Histochem and Cytochem**, 30: 407描述之該等方法。

基質

本文所述之VISTA及VISTA結合物可連接至基質上。此項技術中已知之許多基質(例如固體支撐物)適用於與本文所述之VISTA及VISTA結合物一起使用。該基質可經改質而含有通道或其他組態。參見Fung (2004) [編] **Protein Arrays: Methods and Protocols** Humana Press and Kambhampati (2004) [編] **Protein Microarray Technology** John Wiley & Sons。

基質材料包括(但不限於)丙烯酸系物、瓊脂糖、硼矽玻璃、碳

(例如碳奈米纖維薄片或小球)、乙酸纖維素、纖維素、陶瓷、凝膠、玻璃(例如無機、經控制之孔、經改質、鹼石灰或官能化玻璃)、乳膠、磁性珠粒、膜、金屬、類金屬、硝化纖維素、NYLON[®]、光纖束、有機聚合物、紙、塑膠、聚丙烯醯嗎啉、聚(4-甲基丁烯)、聚(對苯二甲酸乙二酯)、聚(丁酸乙烯酯)、聚丙烯醯胺、聚丁烯、聚碳酸酯、聚乙烯、聚對苯二甲酸乙二酯、聚甲醛、聚甲基丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚丙烯、多醣、聚苯乙烯、聚胺基甲酸酯、聚乙酸乙烯酯、聚氯乙烯、聚偏二氟乙烯(PVDF)、聚乙烯吡咯啉酮、螺縈、樹脂、橡膠、半導體材料、SEPHAROSE[®]、二氧化矽、矽、苯乙烯共聚物、TEFLON[®]及多種其他聚合物。

基質無須為平坦的且可包括任何類型之形狀，包括球形形狀(例如珠粒)或圓柱形形狀(例如纖維)。連接至固體支撐物之物質可連接至固體支撐物之任何部分(例如，可連接至多孔固體支撐物材料之內部部分)。

基質主體可呈珠粒、盒、管柱、圓柱體、圓盤、器皿(例如玻璃皿、皮氏培養皿(PETRI dish))、纖維、膜、過濾器、微量滴定盤(例如96孔微量滴定盤)、多刃棒狀物、網狀物、小球、盤、環、桿狀物、圓筒、薄片、載片、條狀物、托盤、管或小瓶形式。基質可為單一個別主體(例如單個管、單個珠粒)、大量複數個基質主體(例如具有10個管之試管架、若干珠粒)，或其組合(例如包含複數個微量滴定盤的托盤、經珠粒填充之管柱、經珠粒填充之微量滴定盤)。

VISTA及VISTA結合物可在其與固體襯底經由非隨機的化學或物理相互作用結合時「連接」至基質上。可經由共價鍵連接。然而，連接無須為共價或永久性連接。物質可經由「間隔分子」或「連接基團」連接至基質。該等間隔分子為具有連接至生物物質之第一部分以及連接至基質之第二部分的分子。因此，當連接至基質時，間隔分子

分離基質與生物物質，但連接至兩者。將生物物質(例如標記)連接至基質的方法在此項技術中為熟知的，且包括(但不限於)化學偶合。

可使用支撐且含有用於固相合成反應之固相的盤(諸如微量滴定盤)。微量滴定盤可容納用作固相之珠粒。「粒子」或「微粒」或「奈米粒子」或「珠粒」或「微珠粒」或「微球體」在本文中意謂具有任何多種形狀或大小之微粒物質。形狀一般可為球形，但並非必需為球形，可為例如圓柱形或多面體。如由熟習此項技術者所瞭解，粒子可包含多種材料，視其用途而定，包括(但不限於)交聯澱粉；聚葡萄糖；纖維素；蛋白質；有機聚合物，包括苯乙烯聚合物，諸如聚苯乙烯及甲基苯乙烯以及其他苯乙烯共聚物；塑膠；玻璃；陶瓷；丙烯酸聚合物；磁性反應性材料；膠體；鈦石膠(thoriasol)；碳石墨；二氧化鈦；耐綸(nylon)；乳膠；及TEFLON[®]。參見例如「Microsphere Detection Guide」, Bangs Laboratories, Fishers, IN。

本文所述之VISTA及VISTA結合物可連接至本文所述之任何形式之基質(珠粒、盒、管柱、圓柱體、圓盤、器皿(例如玻璃皿、皮氏培養皿)、纖維、膜、過濾器、微量滴定盤(例如96孔微量滴定盤)、多刃棒狀物、網狀物、小球、盤、環、桿狀物、圓筒、薄片、載片、條狀物、托盤、管或小瓶)上。特定而言，粒子或珠粒可為膠凝材料之組分或可為各別組分，諸如由多種合成塑膠(例如聚苯乙烯)製成之乳膠珠粒。標記(例如抗生蛋白鏈菌素)可結合至基質(例如珠粒)。

醫藥組合物

「醫藥組合物」係指適於投與哺乳動物之化學或生物組合物。該等組合物可經特定調配以用於經由許多途徑中之一或多者投與，該等途徑包括(但不限於)經頰、上表皮、硬膜外、吸入、動脈內、心內、腦室內、皮內、肌肉內、鼻內、眼內、腹膜內、脊柱內、鞘內、靜脈內、經口、非經腸、經由灌腸劑或栓劑經直腸、皮下

(subcutaneous、subdermal)、舌下、經皮及經黏膜。另外，可藉助於注射劑、粉末、液體、凝膠、滴劑或其他投藥方式進行投藥。

「醫藥賦形劑」或「醫藥學上可接受之賦形劑」為當中調配有活性治療劑之載劑，通常為液體。在本發明之一個實施例中，活性治療劑為本文所述之人類化抗體或其一或多個片段。賦形劑一般不向調配物提供任何藥理學活性，但其可提供化學及/或生物穩定性及釋放特徵。例示性調配物可見於例如Grennaro (2005) [編] **Remington: The Science And Practice Of Pharmacy [第21版]**中。

醫藥組合物在製造及儲存條件下通常須為無菌且穩定的。本發明預期醫藥組合物以凍乾形式存在。組合物可調配成溶液、微乳液、脂質體或適於高藥物濃度之其他有序結構。載劑可為含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇及液體聚乙二醇)及其適合混合物之溶劑或分散介質。本發明進一步涵蓋在醫藥組合物中包括穩定劑。

本文所述之多肽、結合物及抗體可調配至各種劑型之醫藥組合物中。為了製備本發明之醫藥組合物，可將作為活性成分之至少一種VISTA及VISTA結合物與適當載劑及添加劑根據熟習醫藥調配技術者所熟知之技術密切混合。參見Grennaro (2005) [編] **Remington: The Science and Practice of Pharmacy [第21版]**。舉例而言，本文所述之抗體可在磷酸鹽緩衝鹽水(pH 7.2)中調配且作為5.0 mg/mL透明無色液體溶液供應。

同樣，液體製劑之組合物包括溶液、乳液、分散液、懸浮液、糖漿及酞劑，其中適合載劑及添加劑包括(但不限於)水、醇、油、二醇、防腐劑、調味劑、著色劑及懸浮劑。非經腸投與之典型製劑包含活性成分，其中載劑為諸如無菌水或非經腸可接受之油，包括(但不限於)聚乙二醇、聚乙烯吡咯啉酮、卵磷脂、花生油或芝麻油，其中

亦可包括其他有助於溶解或防腐之添加劑。在溶液之情況下，其可凍乾成粉末，隨後在即將使用之前復原。對於分散液及懸浮液，適當載劑及添加劑包括水性樹膠、纖維素、矽酸鹽或油。

對於所述實施例中之各者，VISTA及VISTA結合物可藉由多種劑型投與。涵蓋任何為一般技術者所知之生物學上可接受之劑型及其組合。該等劑型之實例包括(不限於)可復原粉末、酞劑、液體、溶液、懸浮液、乳液、散劑、顆粒、粒子、微粒、可分散顆粒、扁膠劑、吸入劑、氣溶膠吸入劑、貼片、粒子吸入劑、植入物、儲槽式植入物、可注射劑(包括皮下、肌肉內、靜脈內及皮內)、輸注劑及其組合。

在多數情況下，較佳於組合物中包括等滲劑，例如糖、多元醇(諸如甘露糖醇或山梨糖醇)或氯化鈉。可藉由在組合物中包括延緩吸收劑(例如單硬脂酸鹽及明膠)來達成可注射組合物之延長吸收。此外，本文所述之化合物可調配成延時釋放調配物，例如包括緩慢釋放聚合物之組合物。VISTA及VISTA結合物可與將防止化合物快速釋放之載劑一起製備，諸如控制釋放調配物，包括植入物及微囊密封傳遞系統。可使用生物可降解之生物相容性聚合物，諸如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、膠原蛋白、聚原酸酯、聚乳酸及聚乳酸系、聚乙醇酸共聚物(PLG)。許多製備該等調配物之方法為熟習此項技術者所知。

亦可在組合物中併入輔助性活性化合物。

舉例而言，組合物可進一步包含所需抗原(例如腫瘤抗原)或另一免疫調節化合物，諸如Toll樣受體促效劑、1型干擾素(諸如 α 及 β 干擾素)及CD40促效劑(諸如促效CD40抗體及抗體片段，較佳為抗人類CD40促效抗體及抗體片段)或其他免疫增強劑或抑制劑(諸如PD-L1、PD-L2、CTLA4融合蛋白質及對其具有特異性之抗體)。

包含VISTA之組合物可進一步包含抗原或其他免疫促效劑。抗原

可以與組合之其他組分組合可有效針對抗原產生免疫反應的量投與。舉例而言，抗原可以約100 $\mu\text{g/kg}$ 至約100 mg/kg 之量投與。在一些實施例中，抗原可以約10 $\mu\text{g/kg}$ 至約10 mg/kg 之量投與。在一些實施例中，抗原可以約1 mg/kg 至約5 mg/kg 之量投與。然而，構成有效產生免疫反應之量之抗原之特定量在一定程度上視某些因素而定，該等因素諸如為所投與之特定抗原、所投與之特定促效劑及其量、所投與之特定促效劑及其量、免疫系統狀態、促效劑及抗原之投與方法及次序、調配物所投與之物種及所需治療結果。因此，一般闡述構成抗原之有效量的量並非切實可行。然而，一般技術者可在適當考慮該等因素的情況下容易地確定適當量。

抗原可為能夠產生Th1免疫反應之任何物質，該Th1免疫反應可包括例如以下中之一或多者：CD8+ T細胞反應、NK T細胞反應、 γ/δ T細胞反應或Th1抗體反應。適合之抗原包括(但不限於)肽；多肽；脂質；醣脂；多醣；碳水化合物；聚核苷酸；朊病毒；活的或不活化細菌；病毒或真菌；及細菌、病毒、真菌、原蟲、腫瘤來源或生物體來源之抗原、毒素或類毒素。

此外，某些當前實驗性抗原，尤其諸如並不產生較強免疫反應之重組蛋白質、醣蛋白及肽之物質可結合本發明之佐劑組合使用。例示性實驗性次單位抗原包括與病毒性疾病有關之抗原，諸如為腺病毒、AIDS、水痘、細胞巨大病毒、登革熱、貓類白血病、雞瘟、A型肝炎、B型肝炎、HSV-1、HSV-2、豬霍亂、A型流感、B型流感、日本腦炎、麻疹、副流感、狂犬病、呼吸道融合性病毒、輪狀病毒、疣及黃熱病。

抗原可為癌症抗原或腫瘤抗原。術語癌症抗原及腫瘤抗原可互換使用且指代由癌細胞區別地表現之抗原。因此，癌症抗原可用於區別地靶向針對癌細胞之免疫反應。癌症抗原可因此潛在地刺激腫瘤特

異性免疫反應。某些癌症抗原由正常細胞編碼，儘管未必由正常細胞表現。一些此等抗原之特徵可為通常在正常細胞中沉默(亦即不表現)之抗原、僅在某些分化階段表現之抗原、及暫時表現之抗原(諸如胚胎抗原及胎兒抗原)。其他癌症抗原可經突變體細胞基因(諸如致癌基因(例如活化ras致癌基因)、抑制基因(例如突變體p53)、或由內部缺失或染色體易位產生之融合蛋白質)編碼。其他癌症抗原可由諸如由RNA及DNA腫瘤病毒攜帶之病毒基因編碼。

腫瘤抗原之實例包括MAGE；MART-1/Melan-A；gp100；二肽基肽酶IV(DPPUV)；腺苷脫胺酶結合蛋白(ADAbp)；親環蛋白b；結腸直腸相關抗原(CRC)-C017-1A/GA733；癌胚抗原(CEA)及其抗原的抗原決定基CAP-1及CAP-2；etv6；am11；前列腺特異性抗原(PSA)及其抗原的抗原決定基PSA-1、PSA-2及PSA-3；前列腺特異性膜抗原(PSMA)；T細胞受體/CD3-ζ鏈；腫瘤抗原之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)；腫瘤抗原之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；酪胺酸酶；p53；MUC家族；HER2/neu；p21ras；RCAS1；α-胎蛋白；ε-鈣黏附蛋白；α-索脛素；β-索脛素；γ-索脛素；p120ctn；gp10.sup.Pmel117；PRAME；NY-ESO-1；cdc27；腺瘤息肉病大腸桿菌蛋白(APC)；胞襯蛋白；連接蛋白37；Ig-個體基因型；p15；gp75；GM2及GD2神經節苷脂；病毒產物，諸如人乳頭狀瘤病毒蛋白；腫瘤抗原之Smad家族；Imp-1；PIA；編碼EBV之核抗原(EBNA)-

1；腦肝糖磷酸化酶；SSX-1；SSX-2(HOM-MEL-40)；SSX-3；SSX-4；SSX-5；SCP-1及CT-7；及c-erbB-2。

癌症或腫瘤及與該等腫瘤相關(但非排他性地)之特異性腫瘤抗原包括急性淋巴母細胞性白血病(etv6、aml1、親環蛋白b)、B細胞淋巴瘤(Ig-個體基因型)、神經膠質瘤(E-鈣黏附蛋白、 α -索脛素、 β -索脛素、 γ -索脛素、p120ctn)、膀胱癌(p21ras)、膽癌(p21ras)、乳房癌(MUC家族、HER2/neu、c-erbB-2)、子宮頸癌(p53、p21ras)、結腸癌(p21ras、HER2/neu、c-erbB-2、MUC家族)、結腸直腸癌(結腸直腸相關抗原(CRC)-CO17-1A/GA733、APC)、絨膜癌(CEA)、上皮細胞癌(親環蛋白b)、胃癌(HER2/neu、c-erbB-2、ga733醣蛋白)、肝細胞癌(α -胎蛋白)、霍奇金淋巴瘤(Hodgkin lymphoma)(Imp-1、EBNA-1)、肺癌(CEA、MAGE-3、NY-ESO-1)、淋巴樣細胞來源之白血病(親環蛋白b)、黑色素瘤(p53蛋白、gp75、癌胚抗原、GM2及GD2神經節苷脂、Melan-A/MART-1、cdc27、MAGE-3、p21ras、gp100.sup.Pmel117)、骨髓瘤(MUC家族、p21ras)、非小細胞肺癌(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(前列腺特異性抗原(PSA)及其抗原的抗原決定基PSA-1、PSA-2及PSA-3、PSMA、HER2/neu、c-erbB-2、ga733醣蛋白)、腎癌(HER2/neu、c-erbB-2)、子宮頸及食道之鱗狀細胞癌(病毒產物，諸如人乳頭狀瘤病毒蛋白)、睪丸癌(NY-ESO-1)、及T細胞白血病(HTLV-1抗原決定基)。

熟習此項技術者將能經由常規實驗例如藉由本文中揭示內容及以下中之教示指導來測定投藥之有效劑量及頻率：Goodman等人 (2011) **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics** [第12版]；Howland等人 (2005) **Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology** [第2版]；及Golan, (2008) **Principles of**

Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy [第2版]。亦參見 Grennaro (2005) [編] **Remington: The Science and Practice of Pharmacy** [第21版]。

投藥途徑

本文所述之組合物可以下列途徑中之任一者投與：經頰、上表皮、硬膜外、輸注、吸入、動脈內、心內、腦室內、皮內、肌肉內、鼻內、眼內、腹膜內、脊柱內、鞘內、靜脈內、經口、非經腸、經肺、經由灌腸劑或栓劑經直腸、皮下、舌下、經皮及經黏膜。較佳之投藥途徑為靜脈內注射或輸注。投藥可為局部投藥，其中組合物直接在接近於疾病(例如腫瘤)部位處、在疾病部位局部、附近、疾病部位處、周圍或四周投與；或全身投藥，其中給與患者組合物且組合物廣泛地通過身體，藉此達至疾病部位。局部投藥(例如注射)可藉由向患有疾病及/或受疾病影響及/或疾病徵候及/或症狀具活動性或有可能出現(例如腫瘤部位)之細胞、組織、器官及/或器官系統投藥來達成。投藥可為具有局部效應之局部投藥，組合物直接施加至需要其作用之地方(例如腫瘤部位)。

對於所述實施例中之各者，化合物可利用如此項技術中已知之多種劑型投與。涵蓋任何為一般技術者所知之生物學上可接受之劑型及其組合。該等劑型之實例包括(但不限於)可咀嚼錠劑、快速溶解錠劑、起泡錠劑、可復原粉末、酏劑、液體、溶液、懸浮液、乳液、錠劑、多層錠劑、雙層錠劑、膠囊、軟明膠膠囊、硬明膠膠囊、囊片、口含錠、可咀嚼口含錠、珠粒、散劑、膠狀物、顆粒、粒子、微粒、可分散顆粒、扁膠劑、灌洗劑、栓劑、乳膏劑、表面劑、吸入劑、氣溶膠吸入劑、貼片、粒子吸入劑、植入物、儲槽式植入物、可攝取劑、可注射劑(包括皮下、肌肉內、靜脈內及皮內)、輸注劑及其組合。

混雜物可包括之其他化合物為例如醫藥惰性成分(例如固體及液體稀釋劑)，諸如乳糖、右旋糖、蔗糖、纖維素、澱粉或磷酸鈣(對於錠劑或膠囊)、橄欖油或油酸乙酯(對於軟膠囊)及水或植物油(對於懸浮液或乳液)；潤滑劑，諸如二氧化矽、滑石、硬脂酸、硬脂酸鎂或硬脂酸鈣及/或聚乙二醇；膠凝劑，諸如膠態黏土；增稠劑，諸如黃耆樹膠或海藻酸鈉；黏合劑，諸如澱粉、阿拉伯樹膠、明膠、甲基纖維素、羧甲基纖維素或聚乙烯吡咯啉酮；崩解劑，諸如澱粉、海藻酸、海藻酸鹽或羥基乙酸澱粉鈉；起泡混合物；染料；甜味劑；濕潤劑，諸如卵磷脂、聚山梨醇酯或硫酸月桂酯；及其他治療上可接受之輔助成分，諸如保濕劑、防腐劑、緩衝劑及抗氧化劑，其為已知用於該等調配物之添加劑。

用於經口投藥之液體分散液可為糖漿、乳液、溶液或懸浮液。糖漿可含有例如蔗糖或蔗糖以及甘油及/或甘露糖醇及/或山梨糖醇作為載劑。懸浮液及乳液可含有載劑，例如天然樹膠、瓊脂、海藻酸鈉、果膠、甲基纖維素、羧甲基纖維素或聚乙烯醇。

在其他實施例中，本發明提供套組，其包括一或多個包含藥物劑量單位之容器，該等藥物劑量單位包含有效量之一或多種本發明抗體及其片段。套組可包括說明書、用法說明書、標籤、銷售資訊、警告或資訊小冊子。

劑量

本發明之任何實施例之治療組合中之VISTA或VISTA結合物的量可根據諸如以下的因素變化：疾病病況、年齡、性別、體重、患者病史、風險因素、疾病誘因、投藥途徑、先前存在之治療方案(例如與其他藥物可能的相互作用)及個體體重。給藥方案可經調整以提供最佳治療反應。舉例而言，可投與單次快速給藥(bolus)，可隨時間推移投與若干分次劑量，或可按治療情況之緊急需要指示按比例減小或

增加劑量。

出於投藥簡便性及劑量均一性考慮，將非經腸組合物調配成單位劑型尤其有利。如本文所用之單位劑型係指適合作為單一劑量用於所治療哺乳動物個體的物理個別單元；各單元含有經計算以產生所需治療作用之預定量的抗體及其片段以及所需醫藥載劑。本發明之單位劑型的規格由以下因素支配且直接視以下因素而定：抗體及其片段之獨特特徵及欲達成之特定治療作用，及混配該等抗體及其片段以治療個體之敏感性之技術內所固有之限制因素。在治療本發明之抗體及其片段或其適當醫藥組合物可具有效性之哺乳動物(例如人類)之病狀的治療性使用中，可投與有效量之本發明抗體及其片段。適用於本發明之劑量可為組合物、醫藥組合物或任何其他本文所述之組合物。

劑量可以單次劑量、兩次劑量、三次劑量、四次劑量及/或五次劑量投與。該等劑量可單獨、同時及依序投與。

劑型可為一般技術者已知之釋放形式。本發明之組合物可經調配以提供活性成分之立即釋放或活性成分之持續或控制釋放。在持續釋放或控制釋放製劑中，活性成分可以一定速率進行釋放以使得血液含量在延長時段(例如4至24小時)內維持在治療範圍內，但低於毒性含量。較佳劑型包括立即釋放、延長釋放、脈衝式釋放、可變釋放、控制釋放、定時釋放、持續釋放、延遲釋放、長效劑型及其組合，且在此項技術中為已知的。

如本文所定義，蛋白質或多肽之治療有效量(亦即有效劑量)處於每公斤體重約0.001至30 mg，較佳每公斤體重約0.01至25 mg，更佳每公斤體重約0.1至20 mg，及甚至更佳每公斤體重約1至10 mg、每公斤體重2至9 mg、每公斤體重3至8 mg、每公斤體重4至7 mg，或每公斤體重5至6 mg範圍內。熟練技術人員應瞭解，某些因素可能影響有效治療個體所需之劑量，包括(但不限於)疾病或病症之嚴重度、先前治

療、個體一般健康狀況及/或年齡及存在之其他疾病。此外，用治療有效量之蛋白質、多肽或抗體治療個體可包括單一治療或較佳可包括一系列治療。

在一個較佳實例中，每週一次用每公斤體重約0.1至20 mg範圍內之抗體、蛋白質或多肽治療個體，持續約1至10週，較佳2至8週，更佳約3至7週，及甚至更佳約4、5或6週。亦應瞭解，用於治療之抗體、蛋白質或多肽之有效劑量在特定治療過程中可增加或降低。劑量改變可因如本文所述之診斷分析之結果而出現且變得顯而易見。

應瞭解，組合物之藥理學活性可使用此項技術中已知之標準藥理學模型監測。此外，應瞭解，包含VISTA及VISTA結合物、抗體或其抗原結合片段之組合物可併入或封裝在適合之聚合物基質或膜中以用於定點傳遞，或可用能夠實現定點傳遞之特定靶向藥劑功能化。此等技術以及其他藥物傳遞技術為此項技術中所熟知。確定用於特定情形之最佳劑量處於熟習此項技術者之能力範圍內。參見例如Grennaro (2005) [編] **Remington: The Science and Practice of Pharmacy** [第21版]。

治療方法

本文所述之VISTA及VISTA結合物可用於治療發炎病症、自體免疫疾病、抑制CD4⁺ T細胞增殖、抑制CD8⁺ T細胞增殖、抑制CD4⁺ T細胞細胞激素產生及抑制CD8⁺ T細胞細胞激素產生之方法中，該等方法包含向有需要之個體投與有效量之VISTA及VISTA結合物。另外，本文所述之VISTA及VISTA結合物可用於製造用於治療自體免疫疾病、抑制CD4⁺ T細胞增殖、抑制CD8⁺ T細胞增殖、抑制CD4⁺ T細胞細胞激素產生及抑制CD8⁺ T細胞細胞激素產生之藥物，該等藥物包含有效量之本文所述之VISTA及VISTA結合物。本文所述之VISTA及VISTA結合物可與醫藥學上可接受之載劑摻合以製造用於治療自體免

疫疾病、抑制CD4⁺ T細胞增殖、抑制CD8⁺ T細胞增殖、抑制CD4⁺ T細胞細胞激素產生及抑制CD8⁺ T細胞細胞激素產生之組合物，該組合物包含有效量之本文所述之VISTA或VISTA結合物。

本文中所述之治療性方法可包含投與PD-L3或VISTA，VISTA為一種新穎的且在結構上不同的Ig超家族抑制性配位體，其胞外域帶有與B7家族配位體PD-L1之同源性。此分子在本文中可互換地稱為PD-L3或VISTA或T細胞活化之V域免疫球蛋白抑制因子(VISTA)。VISTA主要表現在造血區室內且在骨髓APC及T細胞上經高度調節。VISTA抑制性路徑之治療性介入術代表調節一種新穎方法，其調節T細胞介導之免疫性以用於治療多種癌症。VISTA多肽、結合物、核酸、配位體及其調節劑可適用於調節免疫性(尤其T細胞免疫)以用於治療自體免疫病症及發炎病症。

VISTA、VISTA結合物(例如VISTA-Ig)及抗VISTA抗體治療癌症(包括(但不限於)膀胱癌、卵巢癌及黑色素瘤)、自體免疫病症及發炎病症之用途。另外，本發明尤其關於VISTA蛋白質、尤其多聚VISTA蛋白質及表現其之病毒載體(例如腺病毒)治療在治療上需要免疫抑制之病狀(諸如過敏、自體免疫病症及發炎病狀)之用途。

患者可表現自體免疫疾病之症狀或患者不具有症狀。本文所述之方法可在活體外或離體在細胞(例如人類細胞)上使用。或者，該方法可作為活體內(例如治療性)方案之一部分在個體中存在之細胞上進行。

本發明提供治療處於病症風險中(或易發病症)之個體的防治性及治療性方法，該病症之特徵在於VISTA(PD-L3)蛋白質之不充分或過度產生或產生與VISTA(PD-L3)野生型蛋白質相比活性減少或異常之VISTA(PD-L3)蛋白質形式。此外，本發明之抗VISTA(PD-L3)抗體可用於偵測及分離VISTA(PD-L3)蛋白質、調節VISTA(PD-L3)蛋白質之

生物利用度及調節VISTA(PD-L3)活性，例如藉由調節VISTA(PD-L3)與其反受體之相互作用來調節。

本發明之用途及方法

本文所述之VISTA分子(例如VISTA核酸分子)、多肽、多肽同源物及抗體及抗體片段可用於以下方法中之一或多者：a)篩選分析；b)預測性醫學(例如診斷分析、預後分析及監測臨床試驗)；及c)治療方法(例如治療性及防治性方法，例如藉由上調或下調免疫反應來進行)。如本文所述，本發明之VISTA(PD-L3)多肽具有以下活性中之一或多者：1)結合其天然結合搭配物及/或調節其天然結合搭配物之活性；2)調節細胞內或細胞間信號傳導；3)調節T淋巴細胞之活化；4)調節生物體(例如哺乳動物生物體，諸如小鼠或者人類)之免疫反應。本發明之經分離之核酸分子可用於例如表現VISTA(PD-L3)多肽(例如在基因療法應用中在宿主細胞中經由重組表現載體表現)；偵測VISTA(PD-L3) mRNA(例如在生物樣品中)或VISTA(PD-L3)基因中之基因變化；及調節VISTA(PD-L3)活性，如下文進一步描述。VISTA(PD-L3)多肽可用於治療特徵在於VISTA(PD-L3)多肽不充分或過度產生或產生VISTA(PD-L3)抑制劑之病狀或病症。另外，VISTA(PD-L3)多肽可用於對於天然產生之VISTA(PD-L3)結合搭配物篩選；針對調節VISTA(PD-L3)活性之藥物或化合物篩選；以及治療特徵在於VISTA(PD-L3)多肽不充分或過度產生或產生與VISTA(PD-L3)野生型多肽相比活性減少、異常或不當之VISTA(PD-L3)多肽形式的病狀或病症(例如免疫系統病症，諸如嚴重聯合免疫缺陷、多發性硬化症、全身性紅斑性狼瘡症、I型糖尿病、淋巴增生症候群、發炎性腸病、過敏症、哮喘、移植物抗宿主疾病及移植排斥反應；對諸如細菌及病毒之感染性病原體的免疫反應；及免疫系統癌症，諸如淋巴瘤及白血病)。此外，本發明之抗VISTA(PD-L3)抗體可用於偵測及分

離 VISTA(PD-L3)多肽、調節 VISTA(PD-L3)多肽之生物利用度及調節 VISTA(PD-L3)活性，例如藉由調節 VISTA(PD-L3)與其天然結合搭配物之間的相互作用來調節。

用作治療學之抗 VISTA(PD-L3)抗體可基於以下事實選擇：在可溶性 VISTA(PD-L3)-蛋白質(例如 VISTA(PD-L3)-Ig 融合蛋白質)存在下，抗 VISTA 抗體增強 VISTA(PD-L3)對 VISTA(PD-L3)相關免疫功能之抑制作用。此為十分出乎意外的，因為此等抗 VISTA 抗體活體內表現與自其活體外對免疫性作用預期之表現相反(亦即此等抗 VISTA 單株抗體為免疫抑制的)。

本發明之重要態樣係關於調節 VISTA(PD-L3)表現或活性或與其天然結合搭配物相互作用之方法，與療法有關，VISTA(PD-L3)已展示抑制 CD28 協同刺激、抑制免疫細胞之 TCR 活化、抑制活化免疫細胞(CD4+及 CD8+ T 細胞)之增殖、抑制 T 細胞產生細胞激素(IL-2、 γ 干擾素)及向免疫細胞傳送抑制性信號。因此，T 細胞上 VISTA(PD-L3)之活性及/或表現以及 VISTA(PD-L3)與其結合搭配物之間的相互作用)可經調節以便調節免疫反應。由於 VISTA(PD-L3)結合至抑制性受體(在 T 細胞上)，故 VISTA(PD-L3)活性之上調應當引起免疫反應之下調，而 VISTA(PD-L3)活性之下調應當引起免疫反應之上調。在一實施例中，VISTA(PD-L3)結合至抑制性受體。如先前指示，反直覺地，由本申請者製造之 VISTA(PD-L3)特異性抗體(該等抗體活體外(在 VISTA(PD-L3)-Ig 存在下)增強 VISTA(PD-L3)-Ig 融合蛋白質之抑制性活性(亦即，此等抗體增強 VISTA(PD-L3)相關活性之抑制，該等活性諸如為 VISTA(PD-L3)對細胞激素產生、T 細胞增殖、分化或活化及其他先前指示之功能的作用))與活體內將預期的相反地表現，亦即已發現此等抗體在活體內為免疫抑制的。

本發明之調節性方法涉及使細胞與 VISTA(PD-L3)多肽或調節與

該細胞相關之 VISTA(PD-L3)多肽活性之活性中之一或多者的藥劑(例如調節 VISTA(PD-L3)之表現或活性及/或調節 VISTA(PD-L3)與其天然結合搭配物之相互作用的藥劑)接觸。調節 VISTA(PD-L3)多肽活性之其他藥劑可為如本文所述之藥劑，諸如核酸或多肽、VISTA(PD-L3)多肽之天然產生之結合搭配物、VISTA(PD-L3)抗體、VISTA(PD-L3)促效劑或拮抗劑、VISTA(PD-L3)促效劑或拮抗劑之肽模擬物、VISTA(PD-L3)肽模擬物或其他小分子。VISTA(PD-L3)之可溶形式亦可用於干擾 VISTA(PD-L3)與其天然結合搭配物或配位體中之任一者的結合。

調節 VISTA(PD-L3)之表現之藥劑為例如反義核酸分子、三重寡核苷酸、核酶或用於表現 VISTA(PD-L3)多肽之重組載體。舉例而言，可合成與圍繞 VISTA(PD-L3)多肽轉譯起始位點之區域互補的寡核苷酸。可將一或多種反義寡核苷酸通常以 200 µg/ml 添加至細胞培養基中，或投與患者以防止 VISTA(PD-L3)多肽之合成。反義寡核苷酸由細胞吸收且與 VISTA(PD-L3) mRNA 雜交以防止轉譯。或者，可使用結合雙股 DNA 以形成三重構築體從而防止 DNA 解旋及轉錄之寡核苷酸。作為任一者之結果，VISTA(PD-L3)多肽之合成經阻斷。當調節 VISTA(PD-L3)表現時，該調節較佳藉由除剔除 VISTA(PD-L3)基因以外之手段進行。

藉助於控制 VISTA(PD-L3)在細胞中之量而調節表現之藥劑亦調節細胞中 VISTA(PD-L3)活性之總量。在一個實施例中，調節 VISTA(PD-L3)之藥劑刺激一或多種 VISTA(PD-L3)活性。該等刺激藥劑之實例包括已引入細胞中之活性 VISTA(PD-L3)多肽及編碼 VISTA(PD-L3)之核酸分子。在另一實施例中，藥劑抑制一或多種 VISTA(PD-L3)活性。該等抑制性藥劑之實例包括反義 VISTA(PD-L3)核酸分子、抗 VISTA(PD-L3)抗體、VISTA(PD-L3)抑制劑及在個體篩

選分析中鑑別之化合物。在另一實施例中，抑制性藥劑為抗VISTA(PD-L3)抗體與抗PD-L1或抗PD-L2抗體之組合。此等調節性方法可活體外進行(例如藉由使細胞與藥劑接觸來進行)或藉由使藥劑與細胞活體內接觸來進行(例如藉由向個體投與藥劑來進行)。因此，本發明提供治療患有將得益於VISTA(PD-L3)多肽上調或下調之病狀或病症(例如特徵在於VISTA(PD-L3)多肽或核酸分子之不當、不充分或異常表現或活性之病症)之個體的方法。在一個實施例中，該方法涉及投與藥劑(例如由本文所述之篩選分析鑑別之藥劑)、或調節(例如上調或下調)VISTA(PD-L3)表現或活性之藥劑的組合。在另一實施例中，該方法涉及投與VISTA(PD-L3)多肽或核酸分子作為療法以抵消減少、異常或不當之VISTA(PD-L3)表現或活性。

本發明提供一種預防個體之與異常或不當之VISTA(PD-L3)表現或活性有關之疾病或病狀的方法，該方法藉由向個體投與VISTA(PD-L3)多肽或調節VISTA(PD-L3)表現或至少一種VISTA(PD-L3)活性之藥劑來進行。處於由異常或不當VISTA(PD-L3)表現或活性引起或造成之疾病或病症風險中的個體可利用例如本文所述之診斷或預後分析中之任一者或組合來鑑別。可在表現VISTA(PD-L3)異常之症狀特徵之前進行防治性藥劑之投與，使得疾病或病症得以預防或延遲其進展。視VISTA(PD-L3)異常之類型而定，可例如使用VISTA(PD-L3)多肽、VISTA(PD-L3)促效劑或VISTA(PD-L3)拮抗劑(例如抗VISTA(PD-L3)抗體)藥劑以用於治療個體。可基於本文所述之篩選分析確定適當藥劑。

VISTA及VISTA結合物可與其他化學治療劑、細胞毒性劑、抗體(例如抗PD-L1、PD-L2或CTLA-4抗體)、淋巴激素或造血生長因子摻合。VISTA及VISTA結合物亦可與以下組合投與：另一抗體、淋巴激素、細胞毒性劑(例如抑制DNA、RNA或蛋白質合成之部分、放射性

核素或核糖體抑制蛋白，例如 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{188}Re 、 ^{90}Y 、長春地辛、甲胺喋呤、阿德力黴素、順鉑、商陸抗病毒蛋白、假單胞菌外毒素A、蓖麻毒蛋白、白喉毒素、蓖麻毒素A鏈或細胞毒性磷脂酶)、免疫抑制劑(例如環孢靈、來氟米特、甲胺喋呤、硫唑嘌呤、巯基嘌呤、更生黴素、他克莫司或西羅莫司)或造血生長因子。VISTA及VISTA結合物可用化學發光標記、順磁標記(例如鋁、錳、鉑、氧、鏷、鐳、釷、釷或鐳)、MRI對比劑、螢光標記、生物發光標記或放射性標記來標記。在本文中所述之方法中，第二藥劑可與抗體同時或相繼投與。舉例而言，第二藥劑可為下調免疫反應之藥劑(例如PD-L1、PD-L2或CTLA-4融合蛋白質或對其具有特異性之抗體)。

在一個實施例中，治療患有自體免疫疾病之個體之方法包含向可接受第二療法之個體投與VISTA及VISTA結合物。第二療法之實例包括化學療法、放射療法、免疫療法、光線療法、冷凍療法、毒素療法、激素療法或手術。因此，本發明涵蓋方法及組合物結合標準抗癌療法之用途。待治療之患者可處於任何年齡。熟習此項技術者將認識到，存在及發展可與VISTA或VISTA結合物結合使用之其他抗癌療法。

劑量之測定在一般技術者之技能水準內。VISTA及VISTA結合物可在一週或不到一週內、常在一至三天之時間內投以用於急性治療，或可在數個月或數年內用於慢性治療。一般而言，VISTA及VISTA結合物之治療有效量為足以及在自體免疫疾病中產生臨床上明顯變化之量。

即使在免疫細胞上不存在協同刺激性受體(例如CD28或ICOS)之情況下，亦可發生如由抑制性受體轉導之抑制性信號，且因此其並非僅為抑制性受體與協同刺激性受體之間針對結合協同刺激性分子的競爭功能(Fallarino等人 (1998) **J. Exp. Med.** 188: 205)。向免疫細胞傳

遞抑制性信號可引起免疫細胞中之無反應、惰能或計畫式細胞死亡。抑制性信號之傳遞較佳經由並不涉及細胞凋亡之機制運作。

自體免疫疾病

本文所述之VISTA多肽、多聚VISTA多肽、VISTA融合蛋白質(例如VISTA-Ig)及抗VISTA抗體可用於供治療自體免疫疾病用之組合物、用途及方法。

T細胞活化之含有V域免疫球蛋白之抑制因子(VISTA)為與免疫球蛋白(Ig)超家族有關之家族的成員，其對免疫系統發揮深遠影響。Ig超家族由許多關鍵免疫調節劑(諸如B7家族配位體及受體)組成。經最佳表徵之協同刺激性配位體為B7.1及B7.2，其屬於Ig超家族且表現在專職性APC上，且其受體為CD28及CTLA-4。

B7家族配位體已擴大至包括協同刺激性B7-H2(ICOS配位體)及B7-H3以及協同抑制性B7-H1(PD-L1)、B7-DC(PD-L2)、B7-H4(B7S1或B7x)及B7-H6。Brandt等人 (2009) **J Exp Med** 206, 1495-1503；Greenwald等人 (2005) **Annu Rev Immunol** 23: 515-548。因此，已鑑別其他CD28家族受體。ICOS表現在活化T細胞上且結合至B7-H2。ICOS為正向協同調節因子，其對T細胞活化、分化及功能很重要。Dong等人 (2001) **Nature** 409, 97-101。另一方面，計劃式死亡1(PD-1)負向調節T細胞反應。PD-1^{-/-}小鼠發生狼瘡樣自體免疫疾病或自體免疫性擴張型心肌病。Nishimura等人 (2001) **Science** 291: 319-322。近來，CD80已鑑別為將抑制性信號轉導至T細胞中之PD-L1之第二受體。Butte等人 (2007) **Immunity** 27, 111-122。兩種抑制性B7家族配位體PD-L1及PD-L2具有獨特的表現模式。PD-L2以誘導方式表現在DC及巨噬細胞上，而PD-L1廣泛表現在造血細胞及非造血細胞兩種類型上。與PD-1受體之免疫抑制性作用一致，使用PD-L1^{-/-}及PD-L2^{-/-}小鼠之研究已顯示兩種配位體在抑制T細胞增殖及細胞激素產生方面具

有重疊作用。此時，VISTA似乎為選擇性表現之造血細胞(由此將其與PD-L1在分佈方面區分開來)，且很可能在負向調節自體免疫疾病發展方面起關鍵作用。

一種新穎且在結構上不同之Ig超家族抑制性配位體，其胞外域帶有與B7家族配位體PD-L1的最高同源性。儘管其系統發生學上最接近親緣物為PD-L1，但其因其適當程度之相似性(20%)而並不指定為PD-L名稱。其具有93 aa細胞質域，除可能的蛋白激酶C結合位點之外，其不具有明顯的信號轉導基元。參見圖4。VISTA為負向調節性配位體且基於以下事實：

可溶性VISTA-Ig融合蛋白質抑制活體外CD4⁺及CD8⁺ T細胞增殖及細胞激素產生。使用PD-1^{-/-} T細胞觀察到抑制，指示PD-1並非VISTA受體。

APC上VISTA之過度表現抑制活體外CD4⁺及CD8⁺ T細胞增殖。

腫瘤細胞上VISTA過度表現損害疫苗接種腫瘤之宿主中之抗腫瘤免疫性。

VISTA^{-/-}小鼠產生發炎表型，確定VISTA具有免疫抑制功能。VISTA^{-/-} DC與WT DC相比刺激較多T細胞增殖。

抗VISTA單株抗體(13F3)阻斷活體外VISTA⁺ APC對T細胞反應之VISTA誘導之抑制以增強T細胞活化。

抗VISTA單株抗體加重EAE且使活體內致腦炎的Th17頻率增加。

抗VISTA單株抗體在多種(6種)鼠類腫瘤模型中誘導腫瘤緩解，且此等模型中源自骨髓之抑制性細胞(MDSC)上之VISTA表現極高，提示VISTA⁺ MDSC抑制腫瘤特異性免疫。

本文所述之VISTA多肽、多聚VISTA多肽、VISTA融合蛋白質(例如VISTA-Ig)、由核酸序列SEQ ID NO: 38至67中之任一者組成的siRNA分子及抗VISTA抗體可用於供治療自體免疫疾病或病症用之組

合物、用途及方法。自體免疫疾病或病症之實例包括(但不限於)後天性免疫不全症候群(AIDS)、後天脾萎縮、急性前葡萄膜炎、急性播散性腦脊髓炎(ADEM)、急性痛風性關節炎、急性壞死性出血性腦白質炎、急性或慢性竇炎、急性化膿性腦膜炎(或其他中樞神經系統發炎病症)、急性嚴重發炎、艾迪森氏病、腎上腺炎、成人發作型糖尿病(II型糖尿病)、成人發作型特發性副甲狀腺低能症(AOIH)、無 γ 球蛋白血症、顆粒球缺乏症、血管炎病(包括血管炎(包括大血管血管炎(包括風濕性多肌痛及巨細胞性(高安氏)關節炎))、過敏病狀、過敏性接觸性皮炎、過敏性皮炎、過敏性肉芽腫性血管炎、過敏性過敏病症、過敏性神經炎、過敏反應、斑禿、全禿、阿爾波特氏症候群、肺泡炎(例如過敏性肺泡炎及纖維化肺泡炎)、阿茲海默氏病、澱粉樣變性、肌萎縮性側索硬化(ALS；葛雷克氏病)、嗜伊紅血球相關病症(例如嗜伊紅血球增多)、全身性過敏反應、僵直性脊椎炎、血管擴張、抗體介導之腎炎、抗GBM/抗TBM腎炎、抗原-抗體複合物介導之疾病、抗腎小球基底膜病、抗磷脂抗體症候群、抗磷脂症候群(APS)、口瘡、口瘡性口炎、再生不能性貧血、心律不整、動脈硬化、動脈硬化病症、關節炎(例如類風濕性關節炎，諸如急性關節炎、慢性類風濕性關節炎)、慢性漸進性關節炎、變形性關節炎、蛔蟲病、麩黴腫(或含有嗜伊紅血球之肉芽腫)、麴菌病、無精液症、哮喘(例如支氣管哮喘及自體免疫哮喘)、共濟失調毛細管擴張症、共濟失調硬化、動脈粥樣硬化、自閉症、自體免疫血管性水腫、自體免疫再生不能性貧血、自體免疫萎縮性胃炎、自體免疫糖尿病、睪丸及卵巢之自體免疫疾病(包括自體免疫睪丸炎及卵巢炎)、與膠原病有關之自體免疫病症、自體免疫自主神經障礙、自體免疫耳部疾病(例如自體免疫內耳疾病(AIED))、自體免疫內分泌疾病(包括甲狀腺炎，諸如自體免疫甲狀腺炎)、自體免疫腸病症候群、自體免疫性腺衰竭、自體免疫聽力損

失、自體免疫溶血、自體免疫肝炎、自體免疫肝臟病症、自體免疫高脂質血症、自體免疫性免疫缺乏症、自體免疫內耳疾病(AIED)、自體免疫心肌炎、自體免疫嗜中性球減少症、自體免疫胰臟炎、自體免疫多內分泌病、第I型自體免疫多腺體症候群、自體免疫視網膜病變、自體免疫血小板減少性紫癜(ATP)、自體免疫甲狀腺病、自體免疫蕁麻疹、自體免疫介導之胃腸疾病、軸突及神經元神經病變、巴婁病、白塞氏病、良性家族性及缺血再灌注損傷、良性淋巴細胞性血管炎、伯格氏病(IgA腎病變)、養鳥者肺、失明、伯克氏病、阻塞性細支氣管炎(非移植)伴有NSIP、支氣管炎、支氣管肺炎麴菌病、布魯頓氏症候群、大疱性類天疱瘡、卡普蘭氏症候群、心肌病變、心血管缺血、卡斯曼氏症候群、乳糜瀉、口炎性腹瀉(麩質性腸病)、小腦退化、大腦缺血及伴有血管形成之疾病、恰加斯氏病、通道病(例如癲癇症)、CNS通道病、脈絡膜視網膜炎、脈絡膜炎、自體免疫血液學病症、慢性活動性肝炎或自體免疫慢性活動性肝炎、慢性接觸性皮炎、慢性嗜伊紅血球肺炎、慢性疲勞症候群、慢性肝炎、慢性過敏性肺炎、慢性發炎性關節炎、慢性發炎性髓鞘脫失多發性神經病變(CIDP)、慢性難治發炎、慢性黏膜與皮膚性念珠菌病、慢性神經病變(例如IgM多發性神經病變或IgM介導之神經病變)、慢性阻塞性氣管疾病、慢性肺部發炎疾病、慢性復發性多灶性骨髓炎(CRMO)、慢性甲狀腺炎(橋本氏甲狀腺炎)或亞急性甲狀腺炎、徹奇-斯全司症候群、癍痕性類天疱瘡/良性黏膜類天疱瘡、CNS發炎病症、CNS血管炎、腹腔病、柯剛氏症候群、冷凝集素病、息肉狀結腸炎、結腸炎(諸如潰瘍性結腸炎、膠原性結腸炎)、涉及T細胞浸潤及慢性發炎反應之病狀、先天性心臟傳導阻滯、先天性風疹感染、庫姆氏陽性貧血、冠狀動脈疾病、科沙奇病毒性心肌炎、CREST症候群(鈣質沉著、雷諾氏症候群)、克羅恩氏病、冷球蛋白血症、庫欣氏症候群、睫狀體炎(例如慢性睫狀體炎、

異時性睫狀體炎、虹膜睫狀體炎或福斯氏睫狀體炎)、囊腫性纖維化、細胞激素誘發之毒性、聾症、退化性關節炎、髓鞘脫失疾病(例如自體免疫髓鞘脫失疾病)、髓鞘脫失神經病變、登革熱、疱疹樣皮炎及異位性皮炎、皮炎(包括接觸性皮炎)、皮肌炎、具有急性發炎組分之皮膚病、德維克氏病(視神經脊髓炎)、糖尿病性大動脈病症、糖尿病性腎病變、糖尿病性視網膜病變、戴-布二氏貧血、彌漫性間質性肺纖維化、擴張型心肌病、盤狀狼瘡、涉及白血球滲出之疾病、卓斯勒氏症候群、杜普伊特倫氏攣縮、埃可病毒感染、濕疹(包括過敏性或異位性濕疹)、腦炎(諸如羅氏腦炎及邊緣葉及/或腦幹腦炎)、腦脊髓炎(例如過敏性腦脊髓炎及實驗性過敏性腦脊髓炎(EAE))、動脈內增生、心內膜炎、內分泌性眼病變、子宮內膜異位症、心肌內膜纖維化、晶狀體過敏性眼內炎、眼內炎、過敏性腸炎、嗜伊紅血球增多-肌痛症候群、嗜伊紅血球性筋膜炎、流行性角膜結膜炎、後天性大皰性表皮鬆懈(EBA)、鞏膜外層、鞏膜外層炎、EB病毒感染、持久性隆起性紅斑、多形紅斑、麻風結節性紅斑、結節性紅斑、胎兒紅血球母細胞增多症、食道蠕動功能障礙、原發性混合型冷球蛋白血症、篩骨病、伊文氏症候群、實驗性過敏性腦脊髓炎(EAE)、因子VIII缺乏症、農民肺、風濕熱、費爾提氏症候群、肌肉纖維疼痛、纖維化肺泡炎、絲蟲病、局部區段性腎小球硬化症(FSGS)、食物中毒、額葉萎縮、胃萎縮、巨細胞性關節炎(顛關節炎)、巨細胞性肝炎、巨細胞性多肌痛、絲球體腎炎、伴有及不伴有腎病症候群之絲球體腎炎(GN)(諸如慢性或急性絲球體腎炎(例如原發性GN))、古德帕斯徹氏症候群、痛風性關節炎、顆粒球輸注相關症候群、肉芽腫病(包括淋巴瘤樣肉芽腫病)、伴有多血管炎之肉芽腫病(GPA)、肉芽腫性葡萄膜炎、格雷氏病、古立安-白瑞症候群、點狀牛皮癬、陣發性血紅素尿、黑-里二氏病、橋本氏病、橋本氏腦炎、橋本氏甲狀腺炎、血色

病、溶血性貧血或免疫性溶血性貧血(包括自體免疫溶血性貧血(AIHA))、溶血性貧血、A型血友病、亨-舍二氏紫癜、妊娠疱疹、人類免疫缺乏病毒(HIV)感染、痛覺過敏、低 γ 球蛋白血症、性腺低能症、副甲狀腺低能症、特發性糖尿病尿崩症、特發性面神經麻痺、特發性甲狀腺功能低下、特發性IgA腎病變、特發性膜性GN或特發性膜性腎病、特發性腎病症候群、特發性肺纖維化、特發性脂肪瀉、特發性血小板減少性紫癜(ITP)、IgA腎病變、IgE介導之疾病(例如全身性過敏反應以及過敏性及異位性鼻炎)、IgG4相關硬化性疾病、侷限性迴腸炎、免疫複合物腎炎、與由細胞激素及T淋巴細胞介導之急性及遲發型過敏症有關之免疫反應、免疫介導之GN、免疫調節性脂蛋白(包括成人或急性呼吸窘迫症候群(ARDS))、包涵體肌炎、感染性關節炎、由抗精子抗體所致之不孕症、全部或部分葡萄膜發炎、發炎性腸病(IBD)、發炎性過度增殖性皮膚疾病、發炎性肌病、胰島素依賴型糖尿病(第1型)、胰島炎、間質性膀胱炎、間質性肺病、間質肺纖維化、虹膜炎、缺血再灌注病症、關節發炎、青少年關節炎、青少年皮肌炎、青少年糖尿病、青少年發作型(第I型)糖尿病(包括兒童胰島素依賴型糖尿病(IDDM))、青少年發作型類風濕性關節炎、川崎氏症候群、乾躁性角膜結膜炎、錐蟲病、藍伯-伊頓症候群、利什曼體病、麻風病、白血球減少症、白血球黏附缺乏症、白血球破碎性血管炎、白血球減少症、扁平苔癬、硬化性苔癬、木質性結膜炎、線性IgA皮膚病、線性IgA疾病(LAD)、呂弗勒氏症候群、類狼瘡性肝炎、狼瘡(包括腎炎、大腦炎、兒童、非腎、腎外、盤狀、脫髮)、狼瘡(SLE)、播散性紅斑狼瘡、萊姆關節炎、萊姆病、淋巴間質性肺炎、瘡疾、男性及女性自體免疫不孕症、上頷骨病、中血管血管炎(包括川崎氏病及結節性多動脈炎)、膜狀增生性或膜增生性GN(MPGN)(包括第I型及第II型)及快速進行性GN、膜性GN(膜性腎病)、美尼爾氏

病、腦膜炎、顯微性結腸炎、顯微性多血管炎、偏頭痛、微小腎病變、混合型結締組織病(MCTD)、感染性單核細胞增多症、莫倫氏潰瘍、穆-哈二氏病、多灶性運動神經病變、多發性內分泌衰竭、多器官損傷症候群(諸如繼發於敗血症、創傷或出血之多器官損傷症候群)、多器官損傷症候群、多發性硬化症(MS)(諸如脊髓-眼MS)、多發性硬化症、流行性腮腺炎、肌肉病症、重症肌無力(諸如胸腺瘤相關重症肌無力)、重症肌無力、心肌炎、肌炎、發作性睡病、壞死性小腸結腸炎及透壁性結腸炎，及自體免疫發炎性腸病；壞死性、皮膚性或過敏性血管炎；新生兒狼瘡症候群(NLE)、腎病、腎病症候群、神經疾病、視神經脊髓炎(德維克氏)、視神經脊髓炎、神經性肌強直、嗜中性球減少症、非癌性淋巴細胞增多症、非肉芽腫性葡萄膜炎、非惡性胸腺瘤、眼部及眼眶發炎病症、眼部癍痕性類天疱瘡、卵巢炎、交感神經性眼炎、眼陣攣肌陣攣症候群(OMS)、眼陣攣或眼陣攣肌陣攣症候群(OMS)，及感覺神經病變、視神經炎、肉芽腫性睪丸炎、骨關節炎、復發性風濕病、胰臟炎、全血球減少症、PANDAS(與鏈球菌有關之兒童自體免疫神經精神病症)、腫瘤伴生小腦退化、腫瘤伴生症候群；腫瘤伴生症候群，包括神經腫瘤伴生症候群(例如藍伯-伊頓肌無力症候群或伊頓-藍伯症候群)；寄生物疾病，諸如利什曼原蟲；陣發性夜間血紅素尿(PNH)、帕-羅二氏症候群、睫狀體平坦部炎(周邊葡萄膜炎)、帕-特二氏症候群、小病毒感染；類天疱瘡，諸如大疱性類天疱瘡及皮膚類天疱瘡；天疱瘡(包括尋常天疱瘡)、紅斑性天疱瘡、落葉狀天疱瘡、天疱瘡黏膜類天疱瘡、天疱瘡、消化性潰瘍、週期性麻痺、周邊神經病變、靜脈周邊性腦脊髓炎、惡性貧血、惡性貧血、晶狀體抗原性葡萄膜炎、肺硬化、POEMS症候群；結節性多動脈炎，第I型、第II型及第III型；原發性慢性多發性關節炎、多軟骨炎(例如難治或復發性多軟骨炎)、多內分泌腺自體免疫疾病、多內

分泌不足、多腺體症候群(例如自體免疫多腺體症候群(或多腺體內分泌病症候群))、風濕性多肌痛、多發性肌炎、多發性肌炎/皮肌炎、多發性神經病變、急性多神經根炎、心切開術後症候群、後葡萄膜炎或自體免疫葡萄膜炎、心肌梗塞後症候群、心包切開術後症候群、鏈球菌感染後腎炎、疫苗接種後症候群、早老性癡呆、原發性膽汁性肝硬化、原發性甲狀腺功能低下、原發性特發性黏液水腫；原發性淋巴細胞增多症，其包括單株B細胞淋巴細胞增多症(例如良性單株 γ 球蛋白病及意義未明之單株 γ 球蛋白病MGUS)；原發性黏液水腫、原發性進行性MS(PPMS)及復發-緩解型MS(RRMS)、原發性硬化性膽管炎、孕酮皮炎、進行性全身性硬化症、增生性關節炎；牛皮癬，諸如斑塊型牛皮癬；牛皮癬、牛皮癬性關節炎、肺泡蛋白沈積症、肺部浸潤性嗜伊紅血球增多、純紅血球貧血或再生不良(PRCA)、純紅血球再生不良、化膿性或非化膿性竇炎、膿皰性牛皮癬及指甲牛皮癬、腎盂炎、壞疽性膿皮病、奎汶氏甲狀腺炎、雷諾氏症候群、反應性關節炎、反覆流產、血壓反應降低、反射性交感神經失養症、難治型脂肪瀉、萊特爾氏病或症候群、復發性多軟骨炎、心肌或其他組織再灌注損傷、再灌注損傷、呼吸窘迫症候群、腿不寧症候群、視網膜自體免疫、腹膜後纖維化、雷諾氏症候群、風濕性疾病、風濕熱、風濕病、類風濕性關節炎、類風濕性脊椎炎、風疹病毒感染、塞氏症候群、類肉瘤病、血吸蟲病、施密特症候群、SCID及EB病毒相關疾病、鞏膜、鞏膜炎、指硬皮病、硬皮病(包括全身性硬皮病)、硬化性膽管炎、播散性硬化；硬化，諸如全身性硬化症；感覺神經性聽力損失、血清反應陰性脊椎關節炎、席漢氏症候群、夏爾曼氏症候群、矽肺病、休格連氏症候群、精子及睪丸自體免疫、蝶竇炎、斯-約二氏症候群、僵人症候群、亞急性細菌性心內膜炎(SBE)、亞急性皮膚紅斑狼瘡、突發性聽力損失、蘇薩克氏症候群、西登哈姆氏舞蹈病、交感神經性眼

炎、全身性紅斑性狼瘡症(SLE)(例如皮膚SLE)、全身性壞死性血管炎及ANCA相關血管炎，諸如徹奇-斯全司血管炎或症候群(CSS)；運動失調、高安氏動脈炎、毛細血管擴張、顱動脈炎/巨細胞性動脈炎、血栓閉塞性脈管炎；血小板減少症(例如由心肌梗塞患者所顯現)，包括血栓性血小板減少性紫癰(TTP)，及自體免疫或免疫介導之血小板減少症，諸如特發性血小板減少性紫癰(ITP)，包括慢性或急性ITP；血小板減少性紫癰(TTP)、甲狀腺中毒症、組織損傷、托-享二氏症候群、中毒性表皮壞死溶解、中毒性休克症候群、輸血反應、嬰兒期短暫性低 γ 球蛋白血症、橫貫性脊髓炎、熱帶肺性嗜伊紅血球增多、結核病、潰瘍性結腸炎、未分化型結締組織病(UCTD)、蕁麻疹(例如慢性過敏性蕁麻疹及慢性特發性蕁麻疹，包括慢性自體免疫蕁麻疹)、葡萄膜炎(例如前葡萄膜炎)、葡萄膜視網膜炎、瓣膜炎、血管功能障礙、血管炎、脊椎關節炎、水皰性皮膚病、白斑病、韋格納氏肉芽腫病(現稱作伴有多血管炎之肉芽腫病(GPA))、維斯科特-奧爾德里奇症候群及x性聯高IgM症候群。

癌症治療

本文所述之VISTA多肽、多聚VISTA多肽、VISTA融合蛋白質(例如VISTA-Ig)、由SEQ ID NO: 38至67之核酸序列中之任一者組成的siRNA分子及抗VISTA抗體可用於供治療癌症(例如腫瘤)用之組合物、用途及方法。

癌症實例包括但不限於：癌瘤、淋巴瘤、胚細胞瘤、肉瘤及白血病。該等癌症之更特定的實例包括鱗狀細胞癌、肺癌(包括小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌及肺鱗狀細胞癌)、腹膜癌、肝細胞癌、胃癌(包括胃腸癌)、胰臟癌、神經膠母細胞瘤、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝細胞瘤、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜癌或子宮癌、唾液腺癌、腎癌、肝癌、前列腺癌、外陰癌、甲狀腺

癌、肝癌及各種類型之頭頸癌，以及B細胞淋巴瘤(包括低級/濾泡性非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)；小淋巴細胞(SL)NHL；中級/濾泡性NHL；中級彌漫性NHL；高級免疫母細胞性NHL；高級淋巴母細胞NHL；高級小無核裂細胞NHL；巨大腫塊(bulky disease)NHL；套細胞淋巴瘤；AIDS相關淋巴瘤；及瓦爾登斯特倫氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's Macroglobulinemia))；慢性淋巴細胞性白血病(CLL)；急性淋巴母細胞性白血病(ALL)；毛細胞性白血病；慢性骨髓母細胞性白血病；多發性骨髓瘤及移植後淋巴組織增生病症(PTLD)。

術語可用本發明治療之癌症包括(但不限於)癌瘤、淋巴瘤、母細胞瘤、肉瘤及白血病或淋巴惡性病。該等癌症之更特定的實例包括膀胱癌、卵巢癌、黑色素瘤、鱗狀細胞癌、肺癌(包括小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌及肺鱗狀細胞癌)、腹膜癌、肝細胞癌、胃癌(包括胃腸癌)、胰臟癌、神經膠母細胞瘤、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝細胞瘤、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜癌或子宮癌、唾液腺癌、腎癌、肝癌、前列腺癌、外陰癌、甲狀腺癌、肝癌及各種類型之頭頸癌，以及B細胞淋巴瘤(包括低級/濾泡性非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)；小淋巴細胞(SL)NHL；中級/濾泡性NHL；中級彌漫性NHL；高級免疫母細胞性NHL；高級淋巴母細胞NHL；高級小無核裂細胞NHL；巨大腫塊NHL；套細胞淋巴瘤；AIDS相關淋巴瘤；及瓦爾登斯特倫氏巨球蛋白血症)；慢性淋巴細胞性白血病(CLL)；急性淋巴母細胞性白血病(ALL)；毛細胞性白血病；慢性骨髓母細胞性白血病；及移植後淋巴組織增生病症(PTLD)，以及與母斑病有關之異常血管增生、水腫(諸如與腦腫瘤有關)及梅格斯氏症候群(Meigs' syndrome)。癌症較佳選自由以下組成之群：乳癌、結腸直腸癌、直腸癌、非小細胞肺癌、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、腎細胞癌、前列腺癌、肝癌、胰臟癌、軟組織肉瘤、卡波西氏肉瘤(kaposi's sarcoma)、

類癌瘤、頭頸癌、黑色素瘤、卵巢癌、間皮瘤及多發性骨髓瘤。癌症可為早期晚期(包括轉移性)膀胱癌、卵巢癌或黑色素瘤。癌症可為結腸直腸癌。可用本發明治療之癌性病狀包括轉移性癌症，其中由源自骨髓之抑制性細胞表現之VISTA抑制抗腫瘤反應及抗侵襲性免疫反應。本發明之方法尤其適用於治療已形成血管之腫瘤。

本發明亦適於與化學療法或放射療法或其他生物製劑組合治療癌症且適於增強其(亦即在個體中)活性，其中由源自骨髓之抑制性細胞表現之VISTA抑制抗腫瘤反應及化學療法或放射療法之功效或生物製劑功效。根據本發明可使用展現抗癌活性之任何化學治療劑。化學治療劑較佳可選自由以下組成之群：烷基化劑、抗代謝物、葉酸類似物、嘧啶類似物、嘌呤類似物及相關抑制劑、長春花生物鹼、表鬼臼毒素、抗生素、L-天冬醯胺酶、拓撲異構酶抑制劑、干擾素、鉑配位錯合物、經蔥二酮取代之脲、甲基胍衍生物、腎上腺皮質抑制劑、腎上腺類固醇、孕酮、雌激素、抗雌激素劑、雄激素、抗雄激素劑及促性腺激素釋放激素類似物。化學治療劑更佳可選自由以下組成之群：5-氟尿嘧啶(5-FU)、甲醯四氫葉酸(LV)、伊立替康、奧賽力鉑(oxaliplatin)、卡培他濱(capecitabine)、太平洋紫杉醇及多烯紫杉醇(doxetaxel)。兩種或兩種以上化學治療劑可呈混合液形式用於與抗VEGF抗體之投藥組合投與。一種較佳組合化學療法為基於氟尿嘧啶之組合化學療法，包含5-FU及一或多種其他化學治療劑。組合化學療法之適合之給藥方案為此項技術中已知且描述於例如Saltz等人(1999) **Proc ASCO** 18:233a及Douillard等人 (2000) **Lancet** 355: 1041-7中。生物製劑可為另一免疫增效劑，諸如PD-L1、PD-L2、CTLA-4及PD-L1、PD-L2、CTLA-4融合蛋白質之抗體以及細胞激素、生長因子拮抗劑及促效劑、激素及抗細胞激素抗體。

過敏症

本文所述之VISTA多肽、多聚VISTA多肽、VISTA融合蛋白質(例如VISTA-Ig)及抗VISTA抗體可用於供治療過敏症(例如對過敏原之過敏反應)用之組合物、用途及方法。

過敏原之實例包括蟎抗原及花粉抗原。

代表性過敏性疾病包括支氣管哮喘、過敏性鼻炎、異位性皮炎以及花粉及昆蟲過敏。過敏素質為可由過敏父母之子女遺傳之遺傳因子。家族性過敏性疾病亦稱為異位性疾病，且遺傳傳遞之病理性因素為異位性素質。「異位性皮炎」為異位性疾病之一般術語，尤其為伴隨有皮炎症狀之疾病。較佳實例包括選自由以下組成之群的過敏性病狀：濕疹、過敏性鼻炎、枯草熱、蕁麻疹及食物過敏。過敏性病狀包括濕疹、過敏性鼻炎或鼻傷風、枯草熱、支氣管哮喘、蕁麻疹(麻疹)及食物過敏以及其他異位性病狀。

發炎病狀及發炎疾病

本文所述之VISTA多肽、多聚VISTA多肽、VISTA融合蛋白質(例如VISTA-Ig)、由SEQ ID NO: 38至67之核酸序列中之任一者組成的siRNA分子及抗VISTA抗體可用於供治療發炎病狀及發炎疾病用之組合物、用途及方法。

發炎病狀及發炎疾病包括(但不限於)風濕性疾病(例如類風濕性關節炎、骨關節炎、牛皮癬性關節炎)、脊椎關節病(例如僵直性脊椎炎、反應性關節炎、萊特爾氏症候群)、結晶性關節病(例如痛風、假性痛風、焦磷酸鈣沈積病)、多發性硬化症、萊姆病、風濕性多肌痛；結締組織疾病(例如全身性紅斑性狼瘡症、全身性硬化症、多發性肌炎、皮肌炎、休格連氏症候群)；血管炎病(例如結節性多動脈炎、韋格納氏肉芽腫病、徹奇-斯全司症候群)；發炎病狀，包括創傷或局部缺血之後果、類肉瘤病；血管疾病，包括動脈粥樣硬化性血管疾病、動脈粥樣硬化及血管阻塞性疾病(例如動脈粥樣硬化、缺血性

心臟病、心肌梗塞、中風、周邊血管疾病)及血管支架再狹窄；眼部疾病，包括葡萄膜炎、角膜病、虹膜炎、虹膜睫狀體炎及白內障。

發炎病狀亦包括(但不限於)酸逆流/胃灼熱、痤瘡、尋常痤瘡、過敏及敏感、阿茲海默氏病、哮喘、動脈粥樣硬化及血管阻塞性疾病(例如動脈粥樣硬化、缺血性心臟病、心肌梗塞、中風、周邊血管疾病)及血管支架再狹窄、自體免疫疾病、支氣管炎、癌症、心臟炎、白內障、乳糜瀉、慢性疼痛、慢性前列腺炎、肝硬化、結腸炎、結締組織病(例如全身性紅斑性狼瘡症、全身性硬化症、多發性肌炎、皮肌炎、休格連氏症候群)、角膜病、克羅恩氏病、結晶性關節病(例如痛風、假性痛風、焦磷酸鈣沈積病)、癡呆、皮炎、糖尿病、乾眼症、濕疹、水腫、氣腫、肌肉纖維疼痛、胃腸炎、齒齦炎、絲球體腎炎、心臟病、肝炎、高血壓、過敏、發炎性腸病；發炎病狀，包括創傷或局部缺血之後果；胰島素抗性、間質性膀胱炎、虹膜睫狀體炎、虹膜炎、關節疼痛/關節炎/類風濕性關節炎、萊姆病、代謝症候群(症候群X)、多發性硬化症、肌炎、腎炎、肥胖症；眼部疾病，包括葡萄膜炎；骨量減少、骨質疏鬆症、帕金森氏症、骨盆發炎性疾病、牙周病、多動脈炎、多軟骨炎、風濕性多肌痛、牛皮癬、再灌注損傷、風濕性關節炎、風濕性疾病(例如類風濕性關節炎、骨關節炎、牛皮癬性關節炎)、類風濕性關節炎、類肉瘤病、硬皮病、竇炎、休格連氏症候群、結腸痙攣、脊椎關節病(例如僵直性脊椎炎、反應性關節炎、萊特爾氏症候群)、全身性念珠菌病、肌腱炎、移植排斥反應、UTI、陰道炎；血管疾病，包括動脈粥樣硬化性血管疾病；血管炎病(例如結節性多動脈炎、韋格納氏肉芽腫病、徹奇-斯全司症候群)及血管炎。

移植物抗宿主疾病

本文所述之VISTA多肽、多聚VISTA多肽、VISTA融合蛋白質(例

如VISTA-Ig)、由SEQ ID NO: 38至67之核酸序列中之任一者組成的siRNA分子及抗VISTA抗體可用於供治療移植物抗宿主疾病(GVHD)用之組合物、用途及方法。

本發明亦提供一種治療移植物抗宿主疾病(GVHD)之方法，其包含投與有效量之VISTA融合蛋白質、視情況為VISTA-Ig融合蛋白質或多聚VISTA蛋白質。治療移植物抗宿主疾病(GVHD)、急性移植物抗宿主疾病、慢性移植物抗宿主疾病、與幹細胞移植相關之急性移植物抗宿主疾病、與幹細胞移植相關之慢性移植物抗宿主疾病、與骨髓移植相關之急性移植物抗宿主疾病、與同種異體造血幹細胞移植(HSCT)相關之急性移植物抗宿主疾病或與骨髓移植相關之慢性移植物抗宿主疾病之方法可包含投與有效量之VISTA融合蛋白質、視情況為VISTA-Ig融合蛋白質或多聚VISTA蛋白質。

移植物抗宿主疾病(GVHD)可為移植物抗宿主疾病(GVHD)、急性移植物抗宿主疾病、慢性移植物抗宿主疾病、與幹細胞移植相關之急性移植物抗宿主疾病、與幹細胞移植相關之慢性移植物抗宿主疾病、與骨髓移植相關之急性移植物抗宿主疾病、與同種異體造血幹細胞移植(HSCT)相關之急性移植物抗宿主疾病或與骨髓移植相關之慢性移植物抗宿主疾病。所治療之患者可具有移植物抗宿主疾病(GVHD)之至少一種症狀，視情況其中該患者展現急性GVHD，包括(但不限於)腹痛、腹部抽筋、腹瀉、發熱、黃疸、皮疹、嘔吐及體重損失。患者可具有慢性移植物抗宿主疾病(GVHD)之至少一種症狀，包括(但不限於)乾眼症、口乾燥、脫髮、肝炎、肺病症、胃腸道病症、皮疹及皮膚增厚。患者可能已經或可能將要接受同種異體幹細胞或骨髓移植。患者可能已經或可能將要接受自體性幹細胞或骨髓移植。

診斷方法

選擇性結合VISTA及VISTA結合物之抗VISTA及抗VISTA結合物

抗體、由SEQ ID NO: 38至67之核酸序列中之任一者組成的siRNA分子及其抗原結合片段可用於診斷方法以用於偵測VISTA及VISTA結合物之存在或不存在。抗VISTA及抗VISTA結合物抗體可用於包含以下之方法：(a)使測試樣品與結合VISTA或VISTA結合物之抗體或其片段接觸；及(b)分析抗體-抗原決定基複合物。抗體-抗原決定基複合物可藉由西方墨點法、放射免疫分析、ELISA(酶聯結免疫吸附劑分析)、「夾心」免疫分析、免疫沈澱分析、沈澱反應、凝膠擴散沈澱反應、免疫擴散分析、凝集分析、補體固定分析、免疫組織化學分析、螢光免疫分析及蛋白質A免疫分析來偵測。樣品可為組織生物檢體、淋巴、尿、腦脊髓液、羊水、發炎性滲出物、血液、血清、大便或自結腸直腸道收集之液體。

選擇性結合VISTA及VISTA結合物之抗體可為重組的。選擇性結合VISTA及VISTA結合物之抗體片段可為Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、CDR、互補位或能夠結合抗原之抗體的部分。選擇性結合VISTA及VISTA結合物之抗體可為嵌合、人類化、抗個體基因型、單鏈、雙功能或共特異性的。選擇性結合VISTA及VISTA結合物之抗體可為片段結合至標記上，該標記包括(但不限於)化學發光標記、順磁標記(例如鋁、錳、鉑、氧、鐳、鐳、釷、釷或鐳)、MRI對比劑、螢光標記、生物發光標記或放射性標記。

另外，VISTA及VISTA結合物、選擇性結合VISTA及VISTA結合物之抗體及其抗原結合片段可連接至固體支撐物(例如珠粒、試管、薄片、培養皿或測試條帶)，諸如陣列。

該方法可包含利用以下方式使VISTA多肽或VISTA結合物成像：正電子發射斷層照相(PET)、CCD弱光監測系統、x射線、CT掃描、閃爍攝影術、光聲成像、單光子發射電腦斷層攝影術(SPECT)、磁共振成像(MRI)、超音波、順磁成像及內窺鏡光學同調斷層攝影術。

篩選分析

本發明提供一種鑑別調節劑之方法(「篩選分析」)，該等調節劑亦即候選或測試化合物或藥劑(例如肽、肽模擬物、小分子或其他藥物)，其結合至VISTA多肽，對例如VISTA表現或VISTA活性具有刺激或抑制作用，或對VISTA與其天然結合搭配物之間的相互作用具有刺激或抑制作用。

篩選結合至VISTA多肽或其生物學活性部分、例如調節VISTA多肽與其天然結合搭配物相互作用之能力之候選或測試化合物的分析可包含使候選化合物與VISTA多肽接觸，且針對調節VISTA多肽與其天然結合搭配物相互作用之能力進行測試。篩選結合至VISTA蛋白質或多肽或其生物學活性部分或調節其活性之候選或測試化合物的分析可包含接觸VISTA多肽，且針對VISTA多肽與候選藥劑之間的結合進行測試。篩選對由VISTA負向調節之免疫功能具有刺激或抑制作用之候選或測試化合物(諸如在本文中經鑑別或基於其對VISTA與其天然結合搭配物之間的相互作用)的分析。此等VISTA相關功能包括例如抑制細胞激素產生(例如T細胞產生之IL-2、 γ 干擾素、抑制中度CD28協同刺激、抑制CD4+及CD8+ T細胞增殖、抑制原態及記憶CD4+ T細胞之增殖及抑制TCR活化而不誘導細胞凋亡)。本發明之測試化合物可使用此項技術中已知之組合文庫方法中之多種途徑中之任一者獲得，包括：生物文庫；可空間定址平行固相或溶液相文庫；需要解迴旋之合成文庫方法；「一珠粒一化合物」文庫方法；及使用親和層析選擇之合成文庫方法。生物文庫途徑限於肽文庫，而其他四種途徑適用於肽、非肽寡聚物或化合物之小分子文庫。Lam (1997) **Anticancer Drug Des.** 12: 145。

分析可為細胞表現VISTA多肽或其生物學活性部分之基於細胞之分析，該分析包含使VISTA多肽或其生物學活性部分與測試化合物接

觸，及測定測試化合物調節VISTA活性之能力。測定測試化合物調節VISTA活性之能力可藉由監測例如VISTA結合至其天然結合搭配物及調節免疫細胞活性之能力來實現。免疫細胞可為T細胞、B細胞或骨髓細胞。測定測試化合物調節VISTA結合至其反受體之能力可例如藉由以下方式實現：使VISTA與放射性同位素或酶促標記偶合以監測測試化合物調節VISTA結合至表現VISTA反受體之T細胞的能力。測定測試化合物結合VISTA之能力可例如藉由以下方式實現：使化合物與放射性同位素或酶促標記偶合，使得化合物與VISTA之結合可藉由偵測複合物中標記之VISTA化合物來測定。

分析可用於測定化合物與VISTA相互作用的能力而不標記反應物中之任一者。舉例而言，微生理記錄儀(microphysiometer)可用於偵測化合物與VISTA之相互作用，而不標記化合物或VISTA。McConnell, H. M.等人, (1992) **Science** 257:1906-1912。微生理記錄儀(例如細胞感應器(Cytosensor))為使用光可定址電位測定感測器(LAPS)量測細胞酸化其環境之速率的分析儀器。此酸化速率變化可用作化合物與VISTA之間的相互作用之指示物。

分析可為基於細胞之分析，該分析包含使表現VISTA結合搭配物之T細胞與測試化合物接觸，且測定測試化合物調節(例如刺激或抑制)VISTA結合搭配物之活性的能力。測定測試化合物調節VISTA結合搭配物之活性之能力可例如藉由測定VISTA多肽結合VISTA結合搭配物或與VISTA結合搭配物相互作用的能力來實現。

測定VISTA多肽或其生物學活性片段結合VISTA結合搭配物或與VISTA結合搭配物相互作用之能力可藉由如上針對測定直接結合所述之方法中的一者實現。在一實施例中，測定VISTA多肽結合VISTA結合搭配物或與VISTA結合搭配物相互作用之能力可藉由測定結合搭配物活性來實現。舉例而言，結合搭配物之活性可藉由偵測細胞第二信

使(例如酪胺酸激酶或磷酸酶活性)之誘導、偵測適當基質之催化/酶促活性、偵測報導基因(包含可操作地連接至編碼可偵測標記(例如螢光素酶)之核酸的目標反應性調節元件)之誘導或偵測目標調節細胞反應來測定。舉例而言，測定VISTA多肽結合天然VISTA結合搭配物或與天然VISTA結合搭配物相互作用之能力可藉由以下方式實現：在增殖分析中量測化合物調節免疫細胞協同刺激或抑制之能力，或干擾VISTA多肽結合識別VISTA多肽之一部分之抗體的能力。在一個實施例中，調節T細胞活化之化合物可藉由測定化合物調節T細胞增殖或細胞激素產生之能力來鑑別。在一實施例中，調節T細胞活化之化合物可藉由測定化合物在超過一種抗原濃度下調節T細胞增殖或細胞激素產生之能力來鑑別。

分析可為無細胞分析，其中VISTA多肽或其生物學活性部分與測試化合物接觸且測定測試化合物結合VISTA多肽或其生物學活性部分之能力。欲用於本發明分析中之VISTA多肽之較佳生物學活性部分包括參加與非VISTA分子相互作用之片段，例如結合至VISTA結合搭配物之胞外域之至少一部分。測試化合物對VISTA多肽之結合可如上所述直接或間接測定。

分析可為無細胞分析，其中VISTA多肽或其生物學活性部分與測試化合物接觸，且測定測試化合物調節(例如刺激或抑制)VISTA多肽或其生物學活性部分活性之能力。測定測試化合物調節VISTA多肽活性之能力可例如藉由利用如上針對測定直接結合所述之方法中之一者測定VISTA多肽結合至VISTA結合搭配物的能力來實現。本發明之無細胞分析可使用多肽(例如VISTA多肽或其生物學活性部分，或VISTA所結合之結合搭配物)之可溶性及/或膜結合形式。在使用多肽之膜結合形式(例如細胞表面VISTA)之無細胞分析情況下，可能需要使用增溶劑使得多肽之膜結合形式在溶液中得以維持。該等增溶劑之實例包

括非離子型清潔劑，諸如正辛基葡萄糖苷、正十二烷基葡萄糖苷、正十二烷基麥芽糖苷、辛醯基-N-甲基葡萄糖醯胺、癸醯基-N-甲基葡萄糖醯胺、Triton® X-100、Triton® X-114、Thesit、異十三烷基聚(乙二醇醚) n 、3-[(3-膽醯胺基丙基)二甲基銨基]-1-丙烷磺酸酯(CHAPS)、3-[(3-膽醯胺基丙基)二甲基銨基]-2-羥基-1-丙烷磺酸酯(CHAPSO)或N-十二烷基.dbd.N,N-二甲基-3-銨基-1-丙烷磺酸酯。

在分析方法中，可能需要將VISTA或其結合搭配物固定化以有助於自該等多肽中之一者或兩者之未複合形式中分離複合形式以及適應分析之自動化。在存在及不存在候選化合物情況下測試化合物與VISTA多肽之結合、或VISTA多肽與其結合搭配物之相互作用可在適於含有該等反應物之任何容器中實現。該等容器之實例包括微量滴定盤、試管及微量離心管。在一個實施例中，可提供融合蛋白質，其添加允許多肽中之一者或兩者結合至基質上之域。舉例而言，谷胱甘肽-S-轉移酶/VISTA融合蛋白質或谷胱甘肽-S-轉移酶/結合搭配物融合蛋白質可吸附至谷胱甘肽SEPHAROSE®珠粒(Sigma Chemical, St. Louis, Mo.)或谷胱甘肽衍生之微量滴定盤上，其接著與測試化合物或測試化合物及非吸附之結合搭配物多肽或VISTA多肽組合，且混合物在有助於複合物形成之條件下(例如在生理條件下以達成鹽及pH值)培育。在培育後，洗滌珠粒或微量滴定盤孔以移除任何未結合之組分，在珠粒之狀況下固定基質，且例如上文所述直接或間接測定複合物形成。或者，可使複合物與基質解離，且使用標準技術測定VISTA結合含量或活性。其他將多肽固定於基質上之技術亦可用於本發明之篩選分析中。測定測試化合物調節VISTA多肽之活性之能力可藉由測定測試化合物調節分子活性之能力來實現，該分子在VISTA下游例如藉由與VISTA結合搭配物之細胞質域相互作用而起作用。舉例而言，可如先前所述測定第二信使之含量、相互作用分子對適當目標之活性或相互

作用子與適當目標之結合。

VISTA表現之調節劑可在細胞與候選化合物接觸且測定細胞中VISTA mRNA或多肽之表現的方法中鑑別。將VISTA mRNA或多肽在候選化合物存在下之表現含量與在不存在候選化合物情況下VISTA mRNA或多肽之表現含量相比。若變化在統計學上顯著，則候選化合物可接著基於此比較鑑別為VISTA表現之調節劑。

VISTA多肽可在雙雜交分析或三雜交分析中用作「誘餌蛋白質」(參見例如美國專利第5,283,317號；Zervos等人 (1993) **Cell** 72:223-232；Madura等人 (1993) **J. Biol. Chem.** 268:12046-12054；Bartel等人 (1993) **Biotechniques** 14:920-924；Iwabuchi等人 (1993) **Oncogene** 8:1693-1696；及WO 94/10300)，從而鑑別結合至VISTA或與VISTA相互作用(「VISTA結合蛋白」、「VISTA結合搭配物」或「VISTA-bp」)且與VISTA活性有關之其他多肽。該等VISTA結合蛋白亦很有可能利用VISTA多肽或VISTA目標而參與信號傳播，作為例如VISTA介導之信號路徑之下游元件。或者，該等VISTA結合多肽可為VISTA抑制劑。雙雜交系統係基於大部分轉錄因子之模組化性質，其由可分離DNA結合及活化域組成。簡言之，該分析使用兩種不同之DNA構築體。在一個構築體中，將編碼VISTA多肽之基因融合至編碼已知轉錄因子(例如GAL-4)之DNA結合域之基因上。在另一構築體中，將來自DNA序列文庫之編碼未鑑別多肽(「捕食物」或「樣品」)之DNA序列融合至編碼已知轉錄因子之活化域之基因。若「誘餌」及「捕食者」多肽能夠活體內相互作用，形成VISTA依賴性複合物，則可使轉錄因子之DNA結合及活化域緊密鄰接。此接近允許可操作地連接至對轉錄因子有反應之轉錄調節位點之報導基因(例如LacZ)轉錄。可偵測報導基因之表現，且可分離含有功能性轉錄因子之細胞群落，且使用其以獲得編碼與VISTA多肽相互作用之多肽的經選殖之基因。

兩種或兩種以上分析之組合描述於本文中。舉例而言，調節劑可使用基於細胞或無細胞分析鑑別，且藥劑調節VISTA多肽活性之能力可在活體內證實，例如在諸如用於細胞轉型及/或腫瘤形成之動物模型的動物中證實。

本發明進一步關於由上述篩選分析鑑別之新穎藥劑。如在本文所述之方法中於適當動物模型中所鑑別之藥劑。舉例而言，如本文所述鑑別之藥劑(例如VISTA調節劑、反義VISTA核酸分子、VISTA特異性抗體或VISTA結合搭配物)可用於動物模型以測定使用該藥劑治療之功效、毒性或副作用。或者，如本文所述鑑別之藥劑可用於在動物模型中確定該藥劑之作用機制。此外，本發明關於由上述篩選分析所鑑別之新穎藥劑的用途，其用於如本文所述之治療。

偵測分析

本文所鑑別之cDNA序列之部分或片段(及相應完全基因序列)可以多種方式用作聚核苷酸試劑。舉例而言，此等序列可用於：(i)定位染色體上之其各別基因；且因此定位與遺傳性疾病有關之基因區域；(ii)自微小生物樣品鑑別個體(組織分型)；及(iii)有助於法醫鑑別生物樣品。此等應用描述於以下子部分中。

染色體定位

在分離基因之序列(或部分序列)後，此序列可用於定位染色體上基因之位置。此方法稱為染色體定位。因此，本文所述之VISTA核苷酸序列之部分或片段可用於定位染色體上VISTA基因之位置。將VISTA序列定位至染色體上為使此等序列與和疾病相關之基因關聯之重要的第一步驟。簡言之，VISTA基因可藉由自VISTA核苷酸序列製備PCR引子(較佳長為15 bp至25 bp)而定位至染色體上。VISTA序列之電腦分析可用於預測不跨越基因組DNA中一個以上外顯子由此使擴增過程複雜化之引子。此等引子接著可用於對含有一個別人類染色體之體

細胞雜合體進行PCR篩選。僅含有對應於VISTA序列之人類基因之該等雜合體將產生擴增片段。藉由融合來自不同哺乳動物之體細胞(例如人類及小鼠細胞)來製備體細胞雜合體。隨著人類及小鼠細胞之雜合體生長及分裂，其逐漸以隨機順序喪失人類染色體，但保留小鼠染色體。藉由使用小鼠細胞無法生長(因為其缺乏特定酶)但人類細胞可生長之培養基，保留含有編碼所需酶之基因之一個人類染色體。藉由使用各種培養基，可確立雜交細胞株組。一組中之各細胞株含有單個人類染色體或少數人類染色體及全組小鼠染色體，使得可容易地將個別基因定位至特定人類染色體。D'Eustachio等人 (1983) **Science** 220: 919-924。僅含有人類染色體片段之體細胞雜合體亦可藉由使用具有易位及缺失之人類染色體產生。

體細胞雜合體之PCR定位為將特定序列指定至特定染色體之快速程序。每天可使用單個熱循環器指定三個或三個以上序列。使用VISTA核苷酸序列設計寡聚核苷酸引體，可用來自特定染色體之片段組達成次定位。可類似地用於將VISTA序列定位至其染色體之其他定位策略包括原位雜交(描述於Fan等人 (1990) **Proc Natl. Acad. Sci. USA** 87:6223-27中)、使用經標記之流動式分選之染色體預篩選及藉由與染色體特異性cDNA文庫雜交的預選。

DNA序列與中期染色體塗片(spread)之螢光原位雜交(FISH)可進一步用於以單步提供準確染色體位置。可使用分裂由化學物質(諸如破壞有絲分裂紡錘體之乙醯甲基秋水仙素(colcemid))在中期阻斷之細胞製成染色體塗片。可用胰蛋白酶短暫處理染色體，且接著用吉姆沙(Giemsa)染色。在各染色體上產生淺色及深色條帶之圖案，因此可個別地鑑別染色體。FISH技術可用於短達500或600個鹼基之DNA序列。然而，大於1,000個鹼基之純系以足以簡單偵測之信號強度結合至獨特染色體位置的可能性較大。較佳，1,000個鹼基，且更佳2,000

個鹼基將足以在合理時間內獲得良好結果。對於此技術之綜述，參見 Verma 等人 Human Chromosomes: A Manual of basic Techniques (Pergamon Press, New York 1988)。可個別地使用用於染色體定位之試劑來標記該染色體上之單個染色體或單個位點，或可使用試劑組以標記多個位點及/或多個染色體。對應於基因之非編碼區之試劑實際上較佳用於定位目的。編碼序列在基因家族內很可能為保守的，因此增加在染色體定位期間交叉雜交之可能性。

一旦序列已定位至精確染色體位置上，染色體上序列之物理位置即可與遺傳圖譜資料相關。最終，可進行來自數個個體之基因之完整定序以證實突變之存在及區分突變與多形現象。

組織分型

本發明之 VISTA 序列亦可用於自微小生物樣品中鑑別個體。此外，本發明之序列可用於提供一種替代技術，該技術確定個體基因組之所選部分之實際逐個鹼基 DNA 序列。因此，本文所述之 VISTA 核苷酸序列可用於自序列之 5' 及 3' 端製備兩個 PCR 引子。此等引子接著可用於擴增個體之 DNA 且隨後對其進行定序。

以此方式製備之個體之相應 DNA 序列組可提供獨特之個體鑑別，因為各個體因對偶基因差異而具有一組獨特之該等 DNA 序列。本發明之序列可用於自個體及組織獲得該等鑑別序列。本發明之 VISTA 核苷酸序列獨特地代表人類基因組部分。對偶基因變異以某種程度出現於此等序列之編碼區中，且以更大程度出現於非編碼區中。據估計個別人類之間對偶基因變異以每各 500 個鹼基約一次之頻率出現。本文所述之各序列在某種程度上可用作可出於達成鑑別目的與來自個體之 DNA 相比較之標準。由於在非編碼區中存在較大量之多形現象，所以需要較少序列來區分個體。SEQ ID NO: 1 或 4 之非編碼序列可方便地以大概 10 至 1,000 個引子組提供陽性個體鑑別，該等引子各自產生

具有100個鹼基之非編碼擴增序列。若使用預測之編碼序列，諸如SEQ ID NO: 3或6中之編碼序列，則用於陽性個體鑑別之引子之較適當數目將為500至2000個。

若本文所述之來自VISTA核苷酸序列之試劑組用於產生個體之獨特的鑑別資料庫，則該等相同的試劑可稍後用於鑑別來自該個體之組織。使用獨特鑑別資料庫，可由極小組織樣品對存活或死亡之個體進行陽性鑑別。

法醫生物學中VISTA序列之用途

基於DNA之鑑別技術亦可用於法醫生物學中。本發明之序列可用於提供靶向人類基因組中之特定基因座之聚核苷酸試劑，例如PCR引子，其可藉由例如提供另一「鑑別標記」(亦即特定個體獨有之另一DNA序列)來增強基於DNA之法醫鑑別的可靠度。如上所述，實際鹼基序列資訊可用於鑑別而作為由限制酶產生之片段形成之圖案的準確替代形式。靶向SEQ ID NO: 1或3之非編碼區之序列尤其適於此用途，因為非編碼區中出現較多數目之多形現象，使其較易於使用此技術區分個體。聚核苷酸試劑之實例包括VISTA核苷酸序列或其部分，例如來源於SEQ ID NO: 1或3之非編碼區之長度為至少20個鹼基、較佳至少30個鹼基的片段。本文所述之VISTA核苷酸序列可進一步用於提供聚核苷酸試劑，例如，經標記或可標記探針，其可用於例如原位雜交技術，以鑑別特定組織，例如淋巴細胞。此在向法醫病理學家提供未知起源之組織的狀況下極適用。該等VISTA探針組可用於利用物種及/或器官類型鑑別組織。以類似方式，此等試劑(例如VISTA引子或探針)可用於針對污染篩選組織培養物(亦即針對培養物中存在不同類型細胞之混合物篩選)。

診斷性分析

偵測生物樣品中VISTA多肽或核酸存在或不存在之例示性方法涉

及：自測試個體中獲得生物樣品，及使生物樣品與能夠偵測VISTA多肽或編碼VISTA多肽之核酸(例如mRNA或基因組DNA)的化合物或藥劑接觸，從而在生物樣品中偵測VISTA多肽或核酸之存在。偵測VISTA mRNA或基因組DNA之較佳藥劑為能夠與VISTA mRNA或基因組DNA雜交之經標記之核酸探針。核酸探針可為例如SEQ ID NO: 1或3中闡述之VISTA核酸或其一部分，諸如長度至少為15、30、50、100、250或500個核苷酸且在嚴格條件下足以與VISTA mRNA或基因組DNA特異性雜交之寡核苷酸。其他適用於本發明之診斷分析中之探針描述於本文中。偵測VISTA多肽之較佳藥劑為能夠結合至VISTA多肽之抗體，較佳為具有可偵測標記之抗體。抗體可為多株抗體，或更佳為單株抗體。可使用完整抗體或其片段(例如Fab或F(ab')₂)。術語「標記」對於探針或抗體而言意欲涵蓋藉由使可偵測物質偶合(亦即物理連接)至探針或抗體來直接標記探針或抗體，以及藉由與直接標記之另一試劑的反應性間接標記探針或抗體。間接標記之實例包括使用螢光標記之二級抗體及末端標記生物素之DNA探針偵測初級抗體，以使得其可以螢光標記抗生蛋白鏈菌素偵測。術語「生物樣品」意欲包括自個體分離之組織、細胞及生物體液以及個體體內存在之組織、細胞及體液。亦即，本發明之偵測方法可用於活體外以及活體內偵測生物樣品中之VISTA mRNA、多肽或基因組DNA。舉例而言，偵測PD-L2 mRNA之活體外技術包括北方雜交(Northern hybridization)及原位雜交。偵測VISTA多肽之活體外技術包括酶聯免疫吸附(ELISA)、西方墨點、免疫沈澱及免疫螢光。偵測VISTA基因組DNA之活體外技術包括南方雜交(Southern hybridization)。此外，偵測VISTA多肽之活體內技術包括將經標記之抗VISTA抗體引入個體。舉例而言，該抗體可用放射性標誌物來標記，該放射性標誌物在個體體內之存在及位置可藉由標準成像技術來偵測。在一個實施例中，生物樣品含有來自測試

個體之多肽分子。或者，生物樣品可含有來自測試個體之mRNA分子或來自測試個體之基因組DNA分子。較佳之生物樣品為藉由習知方式自個體分離之血清樣品。在另一實施例中，方法進一步涉及獲得來自對照個體之對照生物樣品，使對照樣品與能夠偵測VISTA多肽、mRNA或基因組DNA之化合物或藥劑接觸，從而在生物樣品中偵測VISTA多肽、mRNA或基因組DNA之存在，且將對照樣品中VISTA多肽、mRNA或基因組DNA之存在與測試樣品中VISTA多肽、mRNA或基因組DNA之存在比較。

本發明亦涵蓋偵測生物樣品中VISTA之存在的套組。舉例而言，該套組可包含能夠在生物樣品中偵測VISTA多肽或mRNA之標記化合物或藥劑；測定樣品中VISTA之量的手段；及將樣品中VISTA之量與標準比較之手段。化合物或試劑可封裝於適合容器中。套組可進一步包含使用該套組偵測VISTA多肽或核酸之說明書。

預後分析

本文所述之診斷方法可此外用於鑑別患有與異常或不當VISTA表現或活性相關之疾病或病症或處於發生該疾病或病症風險中之個體。如本文所用，術語「異常」包括與野生型VISTA表現或活性不同之VISTA表現或活性。異常表現或活性包括表現或活性增加或降低，以及表現或活性不遵循野生型發育表現模式或次細胞表現模式。舉例而言，異常VISTA表現或活性意欲包括VISTA基因中突變引起VISTA基因表現不足或過度表現之情形及該等突變引起無功能的VISTA多肽或並不以野生型方式起作用之多肽(例如並不與VISTA結合搭配物相互作用之多肽或與非VISTA結合搭配物相互作用之多肽)的情形。如本文所用之術語「不當」包括與生物反應(諸如免疫細胞活化)有關之不當現象。舉例而言，術語不當包括在個體中不當之VISTA表現或活性。

本文所述之分析，諸如前述診斷分析或以下分析可用於鑑別患有病症或處於產生病症風險中之個體，該病症與VISTA多肽活性或核酸表現誤調節相關，諸如自體免疫病症、免疫缺乏病症、免疫系統病症，諸如自體免疫、過敏或發炎病症或癌症。因此，本發明提供鑑別與異常或不當VISTA表現或活性相關之疾病或病症之方法，其中測試樣品自個體獲得，且偵測VISTA多肽或核酸(例如mRNA或基因組DNA)，其中對患有與異常或不當VISTA表現或活性相關之疾病或病症或處於發生該疾病或病症風險中之個體診斷VISTA多肽或核酸的存在。如本文所用之「測試樣品」係指自相關個體獲得之生物樣品。舉例而言，測試樣品可為生物體液(例如腦脊髓液或血清)、細胞樣品或組織。

此外，本文所述之預後分析可用於測定是否可投與個體藥劑(例如促效劑、拮抗劑、肽模擬物、多肽、肽、核酸、小分子或其他藥物候選物)以治療與異常或不當VISTA表現或活性相關之疾病或病症。舉例而言，該等方法可用於確定個體是否可有效地用用於自體免疫病症、免疫缺乏症、免疫系統癌症或過敏性或發炎病症之藥劑治療。因此，本發明提供測定個體是否可用藥劑有效地治療與異常或不當VISTA表現或活性相關之病症的方法，其中獲得測試樣品，且偵測VISTA多肽或核酸表現或活性(例如其中對可投與藥劑以治療與異常或不當VISTA表現或活性相關之病症的個體診斷VISTA多肽或核酸表現或活性之豐度)。本發明之方法亦可用於偵測VISTA基因中之基因變化，藉此測定具有改變之基因之個體是否處於特徵在於VISTA多肽活性或核酸表現誤調節之病症(諸如自體免疫病症、免疫缺乏病症、免疫系統癌症、過敏病症或發炎病症)風險中。可進行本文中所述之方法，例如藉由使用預包裝之診斷套組進行，該等診斷套組包含本文所述之至少一種探針核酸或抗體試劑，其可方便地用於例如臨床環境

以診斷展現涉及VISTA基因之疾病(disease或illness)之症狀或家族病史的患者。此外，表現VISTA之任何細胞類型或組織均可在本文所述之預後分析中使用。

免疫分析

VISTA及VISTA結合物、結合VISTA及VISTA結合物之抗體及抗原結合片段可用於免疫分析以定性或定量地偵測及分析樣品中之標誌物。此方法包含提供特異性結合至VISTA或VISTA結合物之抗體；使樣品與抗體接觸且偵測樣品中結合至標誌物之抗體之複合物的存在。

VISTA及VISTA結合物可使用許多充分公認之免疫結合分析中之任一者偵測及/或定量。適用之分析包括例如酶免疫測定法(EIA)，諸如酶聯結免疫吸附劑分析法(ELISA、放射免疫分析法(RIA)、西方墨點分析或槽墨點分析。參見例如美國專利第4,366,241號、第4,376,110號、第4,517,288號及第4,837,168號。大體上，自個體獲得之樣品可與特異性結合VISTA或VISTA結合物之抗體接觸。

視情況而定，在使抗體與樣品接觸之前可將抗體固定至固體支撐物以有助於洗滌及後繼分離複合物。固體支撐物之實例包括(但不限於)呈例如微量滴定盤、條狀物、珠粒或微珠粒形式之玻璃或塑膠。抗體可連接至固體支撐物。

在將樣品與抗體一起培育後，洗滌混合物且可偵測形成之抗體-標誌物複合物。此可藉由將洗滌之混合物與偵測試劑一起培育來達成。或者，樣品中之標誌物可使用間接分析(其中例如使用二次標記抗體偵測結合之標誌物-特異性抗體)及/或競爭或抑制分析(其中例如將結合至標誌物之不同抗原決定基之單株抗體與混合物一起同時培育)來偵測。

在整個分析中，在試劑之各次組合後需要培育及/或洗滌步驟。培養步驟可由約5秒至若干小時、較佳約5分鐘至約24小時變動。然

而，培育時間將視分析形式、標記、溶液體積、濃度而定。通常，分析在環境溫度下進行，不過其可在一定的溫度變化範圍(例如10℃至40℃)內進行。

免疫分析可用於測定來自個體之樣品中標誌物之測試量。首先，可使用上文所述之免疫分析方法偵測樣品中標誌物之測試量。若樣品中存在標誌物，則其將與特異性結合標誌物之抗體在上文所述之適合培育條件下形成抗體-標誌物複合物。抗體-標誌物複合物之量可視情況藉由與標準比較來確定。如上文所述，標誌物之測試量無須以絕對單位量度，只要量度單位可與對照量及/或信號相比較即可。數種免疫分析為此項技術中已知，且本文所述之VISTA多肽或VISTA結合物可用於該等免疫分析，包括(但不限於)放射性免疫分析(RIA)、酶聯免疫吸附(ELISA)、磁性免疫分析、免疫墨點法、西方墨點法、免疫沈澱分析、免疫組織化學分析及螢光活化細胞分選(FACS)。參見 Wild, (2008) [編] **The Immunoassay Handbook** [第3版] Elsevier。

放射成像方法

VISTA及VISTA結合物可用於放射成像方法以診斷包括胰臟癌及結腸直腸癌之癌症或監測腫瘤之發展。此等方法包括(但不限於)正電子發射斷層攝影法(PET)單光子放射電腦斷層攝影法(SPECT)。此等技術兩者皆為非侵襲性的，且可用於偵測及/或量測多種組織事件及/或功能，諸如偵測例如癌細胞。SPECT可視情況同時與兩種標記一起使用。參見美國專利第6,696,686號。

商業應用及方法

本發明進一步提供製造VISTA及VISTA結合物以達至商業數量。VISTA及VISTA結合物可大規模地製造，必要時儲存，且供應給醫院、臨床醫師或其他健康照護機構。

VISTA及VISTA結合物之製造、儲存及分配之方法可利用本文所

揭示之方法產生。在製造之後，VISTA及VISTA結合物可經收集、純化及在患者治療之前視情況儲存。舉例而言，一旦患者呈現適應症，諸如癌症、自體免疫疾病或發炎病狀，VISTA及VISTA結合物即可被定購且以及時的方式提供。因此，本發明係關於製造VISTA及VISTA結合物以獲得商業規模抗體、包含選擇性結合至VISTA及VISTA結合物之抗體及其抗原結合片段之醫藥組合物的方法，以及向醫院及臨床醫師提供(亦即，製造，視情況儲存及銷售)VISTA及VISTA結合物之方法。VISTA及VISTA結合物之製造可經規模放大以用於商業用途。

本發明亦提供管理醫藥商業之方法，其包含建立分配出售之製劑的分配系統，或可包括建立出售醫藥製劑之銷售團隊。

核酸文庫

VISTA(PD-L3)變異體之多樣化文庫可藉由在核酸層面上組合性誘變產生且由多樣化基因文庫編碼。VISTA(PD-L3)變異體之多樣化文庫可藉由例如以酶促方式使合成寡核苷酸之混合物接合至基因序列中而產生，從而潛在VISTA(PD-L3)序列之簡併組可表現為個別多肽者其中含有VISTA(PD-L3)序列組之較大融合蛋白質組(例如用於噬菌體呈現)。存在可用於自簡併寡核苷酸序列產生潛在VISTA(PD-L3)變異體文庫之各種方法。簡併基因序列之化學合成可在自動DNA合成儀中進行，且接著將合成基因接合至適當表現載體中。基因簡併組之使用允許在一個混合物中提供編碼所需潛在VISTA(PD-L3)序列組的所有序列。合成簡併寡核苷酸之方法為此項技術中已知。參見例如 Narang (1983) **Tetrahedron** 39:3；Itakura等人 (1984) **Annu. Rev. Biochem.** 53:323；Itakura等人 (1984) **Science** 198:1056；Ike等人 (1983) **Nucleic Acids Res.** 11:477。

另外，VISTA(PD-L3)多肽編碼序列之片段之文庫可用於產生VISTA(PD-L3)片段之多樣化群體，以用於VISTA(PD-L3)多肽之變異

體之篩選及後續選擇。編碼序列片段之文庫可藉由以下方式產生：用核酸酶在每分子僅發生約一次切口之條件下處理VISTA(PD-L3)編碼序列之雙股PCR片段，使該雙股DNA變性，使DNA複性以形成可包括來自不同切口產物之有義/反義對之雙股DNA，藉由用S1核酸酶處理而自重組雙螺旋中移除單股部分，及將所得片段文庫接合至表現載體中。藉由此方法，可獲得表現文庫，其編碼各種大小之VISTA(PD-L3)多肽之N端、C端及內部片段。

若干技術在此項技術中已知用於篩選由點突變或截短所產生之組合文庫之基因產物，及用於篩選具有所選性質之基因產物的cDNA文庫。該等技術可適應藉由VISTA(PD-L3)多肽之組合性誘變而產生之基因文庫之快速篩選。用於篩選大型基因文庫之可實現高通量分析之最廣泛使用的技術通常包括將基因文庫選殖至可複製表現載體中，用所得載體文庫使適當細胞轉型，及在偵測所需活性可有助於分離編碼基因(其產物得到偵測)之載體的條件下表現組合基因。遞歸集合誘變(REM)(一種增加文庫中功能性突變體頻率之新技術)可與篩選分析組合使用以鑑別VISTA(PD-L3)變異體。Arkin及Youvan (1992) **Proc Natl. Acad. Sci. USA** 89:7811-7815；Delagrave等人 (1993) **Protein Eng.** 6(3):327-331。

預測醫學

本發明亦關於預測醫學領域，其中診斷分析、預後分析及監測臨床試驗將用於預後(預測性)目的，藉此防治性地治療個體。因此，本發明之一個態樣係關於在生物樣品(例如血液、血清、細胞或組織)之情形下測定VISTA多肽及/或核酸表現以及VISTA活性之診斷分析，藉此測定個體是否罹患疾病或病症或處於發生病症之風險中，該疾病或病症與異常或不當VISTA表現或活性相關。本發明亦提供預後(或預測性)分析以用於測定個體是否處於發生與VISTA多肽、核酸表現

或活性相關之病症的風險中。舉例而言，可在生物樣品中分析VISTA基因中之突變。該等分析可用於預後或預測性目的，藉此在特徵在於VISTA多肽、核酸表現或活性或與VISTA多肽、核酸表現或活性相關之病症發作之前防治性地治療個體。

本發明之另一實施例係關於監測藥劑(例如藥物、化合物)對臨床試驗中VISTA之表現或活性的影響。在以下章節中進一步詳細描述此等及其他藥劑。

監測臨床試驗期間之作用

監測藥劑(例如藥物)對VISTA多肽之表現或活性之影響(例如調節細胞增殖及/或遷移)可不僅應用於基礎藥物篩選，而且可應用於臨床試驗。舉例而言，如本文所述利用篩選分析測定之藥劑增加VISTA基因表現、多肽含量或上調VISTA活性之有效性可在展現VISTA基因表現、多肽含量減少或VISTA活性下調之個體的臨床試驗中監測。或者，利用篩選分析測定之藥劑增加VISTA基因表現、多肽含量或上調VISTA活性之有效性可在展現VISTA基因表現、多肽含量或VISTA活性增加之個體的臨床試驗中監測。如所示，VISTA表現在許多造血細胞類型(包括APC(巨噬細胞及骨髓樹突狀細胞)、及CD4⁺ T細胞)上，且更特定言之表現在CD11c⁺ DC、CD4⁺ T細胞(包括Foxp3⁻效應T細胞及Foxp3⁺ nTreg兩者)、CD8⁺ T細胞及Gr1⁺顆粒球上，且以較低含量表現在B細胞及NK細胞上。在該等臨床試驗中，已與例如VISTA相關病症有關之VISTA基因、且較佳其他基因之表現或活性可用作特定細胞表型之「讀出」或標誌物。

舉例而言(且無限制)，可鑑別藉由用調節VISTA活性(例如在如本文所述篩選分析中所鑑別)之藥劑(例如化合物、藥物或小分子)治療而在細胞中得以調節之基因，包括VISTA。因此，為了例如在臨床試驗中研究藥劑對VISTA相關病症之作用，可分離細胞，分別針對VISTA

及與VISTA相關病症有關之其他基因之表現含量製備及分析RNA。基因表現含量(例如基因表現模式)可藉由如本文所述之北方墨點分析或RT-PCR定量，或藉由利用如本文所述之一種方法量測所產生之多肽的量、或藉由量測VISTA或其他基因之活性程度而定量。以此方式，基因表現模式可充當標誌物，指示細胞對藥劑之生理反應。因此，此反應狀態可在用藥劑治療個體之前及在用藥劑治療個體期間之多個點下測定。在一實施例中，本發明提供監測用藥劑(例如由本文所述之篩選分析鑑別之促效劑、拮抗劑、肽模擬物、多肽、肽、核酸、小分子或其他藥物候選物)治療個體之有效性的方法，該方法包括以下步驟：(i)獲得來自個體之投與前樣品，隨後投與藥劑；(ii)偵測投與前樣品中之VISTA多肽、mRNA或基因組DNA之表現程度；(iii)自個體獲得一或多個投與後樣品；(iv)偵測投與後樣品中VISTA多肽、mRNA或基因組DNA之表現或活性程度；(v)比較投與前樣品中VISTA多肽、mRNA或基因組DNA與投與後樣品中VISTA多肽、mRNA或基因組DNA之表現或活性程度；及(vi)相應地改變對個體之藥劑投與。舉例而言，可能需要增加藥劑投與以使VISTA之表現或活性增加至與所偵測相比的較高程度，亦即增加藥劑之有效性。或者，可能需要減少藥劑投與以使VISTA之表現或活性減少至與所偵測相比的較低程度，亦即減少藥劑之有效性。根據該實施例，即使不存在可觀察之表型反應，VISTA表現或活性亦可用作藥劑有效性之指示物。

本說明書中所提及之所有公開案(例如非專利文獻)、專利、專利申請公開案及專利申請案均指示熟習本發明所屬技術者之技能水準。所有該等公開案(例如非專利文獻)、專利、專利申請公開案及專利申請案以引用方式併入本文中，其引用程度就如同特定且個別地指示各個別公開案、專利、專利申請公開案或專利申請案以引用方式併入本文中一般。

實例

現大致描述本發明，參考以下實例將更容易理解本發明，該等實例僅出於說明本發明之某些態樣及實施例之目的而包括在內，且不意欲限制本發明。

實例1

VISTA(PD-L3)之選殖及序列分析

VISTA(PD-L3)及Treg-sTNF利用靜息Treg、用αCD3活化之Treg及用αCD3/αGITR活化之Treg之全局轉錄譜鑑別。針對此分析選擇αGITR，因為Treg上GITR之觸發已展示消除其接觸依賴性抑制活性(Shimizu 等人 (2002) 上文)。VISTA(PD-L3)及Treg-sTNF在AFFIMETRIX® DNA陣列上基於其獨特的表現模式鑑別(表2)。VISTA(PD-L3)展現在αCD3活化之Treg中之表現增加及在αGITR存在下表現減少；且Treg-sTNF展現表現之αCD3/αGITR依賴性增加。

經純化之CD4+CD25+ T細胞不經刺激、用αCD3或αCD3/αGITR刺激在培養物中隔夜，且分離RNA以用於實時PCR分析。所列表現係相對於肌動蛋白。

表2

mRNA	相對表現		
	無	αCD3	αCD3/αGITR
VISTA (PD-L3)	6	10	7
T ^{reg} -sTNF	0.2	0.3	1.5

活化相對於靜息CD25+ CD4+ nTreg之AFFIMETRIX®分析揭露具有未知功能但具有與Ig超家族之序列同源性的基因產物(RIKEN cDNA 4632428N05或4632428N05Rik)之表現。

更特定言之，自CD4+ T細胞cDNA文庫選殖出930 bp基因產物，其匹配預測之大小及序列。計算機序列及結構分析預測在成熟時309個胺基酸之跨膜蛋白，其具有159個胺基酸之胞外域、22個胺基酸之

跨膜域及95個胺基酸之細胞質尾域(圖1A)。胺基酸序列比對揭露與B7家族配位體(諸如PD-L1、PD-L2、B7-H3及B7-H4)以及B7家族受體(亦即PD-1、CTLA-4、CD28、BTLA、ICOS)同源之胞外免疫球蛋白(Ig)-V樣域(圖1B至圖1C)。儘管B7家族配位體與受體之間的Ig-V域之序列一致性通常並非極高(<40%)，但4632428N05Rik之Ig-V域帶有與B7家族配位體PD-L1及PD-L2之最高同源性。序列比對亦揭露對鏈內二硫鍵形成很重要之數個高度保守半胱氨酸(圖1B)，其為B7家族配位體所特有的。亦參見圖23A至圖23C；Sica等人 (2003) **Immunity** 18: 849-861。

4632428N05Rik之胞外域僅含有Ig-V域，但缺乏Ig-C域(圖1B至圖1C)。此獨特特徵為B7家族受體所特有的，且將4632428N05Rik與含有Ig-V及Ig-C域兩者之所有其他B7家族配位體區分開來。Freeman (2008) **Proc Natl Acad Sci USA** 105: 10275-10276；Lazar-Molnar等人 (2008) **Proc Natl Acad Sci USA** 105: 10483-10488；Lin等人 (2008) **Proc Natl Acad Sci USA** 105: 3011-3016；Schwartz等人 (2001) **Nature** 410: 604-608；Stamper等人 (2001) **Nature** 410: 608-61。一致地，使用PhyML演算法(系統發生最大似然法)之系統發生分析將4632428N05Rik置放在與B7家族配位體相比與B7家族受體(特定言之PD-1)較近的進化距離處(圖2)。Guindon及Gascuel (2003) **Syst Biol** 52: 696-704。然而，VISTA(PD-L3)之細胞質尾域並不含有任何信號傳導域(例如ITIM、ITAM或ITSM)，該等信號傳導域為B7家族受體之特徵域。Sharpe及Freeman (2002) **Nat Rev Immunol.** 2: 116-126。雖然其與抑制性受體PD-1有緊密的進化關係，但4632428N05Rik代表一個B7配位體家族之新穎成員。基於此等結構及系統發生特徵，將此分子命名為以配位體形式表現之PD-1(VISTA(PD-L3))。VISTA(PD-L3)在小鼠與人類直系同源物之間亦高度保守，共有77%序列一致性(圖1D)。

編碼小鼠VISTA(PD-L3)之核酸序列在本文中闡述為SEQ ID NO: 1，且小鼠VISTA(PD-L3)蛋白質序列闡述為SEQ ID NO: 2。

VISTA(PD-L3)之人類同系物位於染色體10(72.9 Mb)上且由6個外顯子組成，藉此生成編碼311個殘基蛋白質之長為4689個鹼基之轉錄物。人類同系物mRNA編碼序列以GENBANK寄存編號NM_022153提供，且蛋白質序列作為NP_071436給出。編碼人類VISTA(PD-L3)之核酸序列在本文中闡述為SEQ ID NO: 3，且人類VISTA(PD-L3)蛋白質序列闡述為SEQ ID NO: 4。小鼠及人類基因共有74%同源性，且在蛋白質層面上68%一致。同系物亦在褐家鼠(*Rattus norvegicus*)之染色體20上(27.7 Mb；GENBANK寄存編號BC098723)以及在紅鰭東方魮(*Fugu rubripes*)及斑馬魚(*Danio rerio*)中鑑別出。在一個實施例中，本發明之VISTA(PD-L3)蛋白質共有SEQ ID NO: 5中所述之共同的胺基酸序列。VISTA之其他直系同源物已經鑑別且展示於圖23C中，例如小鼠(SEQ ID NO: 17)、人類(SEQ ID NO: 16)、袋鼠(SEQ ID NO: 18)、海豚(SEQ ID NO: 19)、雞(SEQ ID NO: 20)、爪蟾(SEQ ID NO: 21)、斑胸草雀(zebra finch)(SEQ ID NO: 22)、斑馬魚(SEQ ID NO: 23)及紅鰭東方魮(SEQ ID NO: 24)。

實例2

利用RT-PCR分析及流動式細胞測量術之VISTA(PD-L3)之表現研究

RT-PCR分析用於測定VISTA(PD-L3)在小鼠組織中之mRNA表現模式(圖3A)。VISTA(PD-L3)大多表現在造血組織(脾臟、胸腺、骨髓)或白血球充分浸潤之組織(亦即肺)上。亦在非造血組織(亦即心臟、腎臟、腦及卵巢)中偵測出微弱表現。數個造血細胞類型之分析揭露VISTA(PD-L3)在腹膜巨噬細胞、脾臟CD11b⁺單核細胞、CD11c⁺DC、CD4⁺ T細胞及CD8⁺ T細胞上之表現，但在B細胞上表現含量較低(圖3B)。此表現模式亦與GNF(諾華研究基金會基因組研究所

(Genomics Institute of Novartis Research Foundation))基因陣列資料庫以及NCBI GEO(基因表現彙編(gene expression omnibus))資料庫基本上一致(圖3A至圖3D)。參見Su等人 (2002) **Proc Natl Acad Sci USA** 99: 4465-4470。

為了研究蛋白質表現，製造VISTA(PD-L3)特異性倉鼠8D8及6E7單株抗體。特異性藉由在過度表現VISTA(PD-L3)之鼠類EL4 T細胞上陽性染色，但在過度表現PD-L1之EL4細胞上陰性染色來展示(圖5)。

多株及單株抗體均針對VISTA(PD-L3)產生。使用兔抗VISTA(PD-L3)抗體，VISTA(PD-L3)蛋白質定位於淋巴器官且顯著地見於腦組織中。在所鑑別之單株抗體中，進一步評估 α VISTA(PD-L3)純系8D8之特異性。在此分析中，對於針對包括CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、B7-1、B7-2、VISTA(PD-L3)及hlg之PD-L樣Ig融合蛋白質分子組之結合，測試純系8D8。此分析之結果指示8D8 α PDL-3對VISTA(PD-L3)具有高度特異性。

特定言之，使用抗VISTA(PD-L3)單株抗體純系8D8，利用流動式細胞測量術在造血細胞上分析VISTA(PD-L3)表現。Foxp3GFP基因嵌入報導小鼠用於區分CD4⁺ nTreg。在周邊淋巴器官(脾臟及淋巴結)中，在所有CD4⁺ T細胞子集(參見總CD4⁺ T細胞、或Foxp3-原態T細胞及Foxp3⁺ nTreg細胞及記憶CD4⁺ T細胞)上看到明顯表現，而CD8⁺ T細胞表現顯著較低量之表面VISTA(PD-L3)(圖3C)。在胸腺中，VISTA(PD-L3)表現在CD4⁺CD8⁺雙陽性胸腺細胞上為陰性的，在CD4單陽性細胞上較低且在CD8單陽性細胞上為可偵測的。接著，對於脾臟及腹膜細胞兩者(包括F4/80巨噬細胞及骨髓CD11c⁺ DC兩者)，可看出較高VISTA(PD-L3)表現與CD11b標誌物有較強相關性(圖3D至圖3E)。另一方面，B細胞及NK細胞對VISTA(PD-L3)表現大多為陰性的。較小百分比之Gr-1⁺顆粒球亦表現VISTA(PD-L3)(圖3F)。

在來自不同淋巴器官之相同細胞譜系上展示差異表現模式(圖3G)。對於CD4⁺ T細胞及CD11b⁺中單核細胞，表現含量遵循腸系膜淋巴結>周邊LN及脾臟>腹膜腔及血液之模式。此模式對於CD11b⁺高細胞較不顯著。此資料提示某些細胞類型上之VISTA(PD-L3)表現可能利用細胞成熟及/或組織微環境調節。

除新鮮分離之細胞以外，在伴有及不伴有活化之活體外培養時，在脾臟CD4⁺ T細胞、CD11b⁺高單核細胞及CD11c⁺ DC上分析VISTA(PD-L3)表現(圖6)。脾臟細胞用培養基、或抗CD3(用於活化T細胞)、或IFN γ 及LPS(用於活化單核細胞及DC)培養24小時，隨後針對VISTA(PD-L3)及其他B7家族配位體(例如PD-L1、PD-L2、B7-H3及B7-H4)之表現分析。此比較揭露此等分子之間的獨特表現模式。VISTA(PD-L3)表現在活體外培養時在所有細胞類型上快速損失，與活化狀態無關。相比之下，PD-L1表現在CD4⁺ T細胞上在刺激時上調，或在CD11b⁺高單核細胞及CD11c⁺ DC上在於單獨培養基中培養時上調，且面臨刺激時進一步增強。在所用培養條件下，PD-L2、B7-H3及B7-H4之表現並不顯著。在與其他B7家族配位體相比時，活體外VISTA(PD-L3)表現之損失為獨特的，但可能反映未能模擬組織微環境之非最佳培養條件。

為了解決VISTA(PD-L3)表現在活體內可能被如何調節，用在完全弗氏佐劑(CFA)中乳化之同源抗原雞卵白蛋白(OVA)免疫接種CD4 TCR轉殖基因小鼠DO11.10。在免疫接種後24小時，針對VISTA(PD-L3)表現分析來自引流淋巴結之細胞(圖7A)。用抗原(CFA/OVA)而非單獨佐劑免疫接種使CD11b⁺ VISTA(PD-L3)⁺骨髓細胞群體急劇增加，該群體含有F4/80⁺巨噬細胞及CD11c⁺ DC之混合群體。與PD-L1及PD-L2之進一步比較揭露儘管PD-L1具有最高組成型表現含量，但VISTA(PD-L3)在此類發炎免疫反應期間最高度上調(圖7B)。總而言

之，此等資料強烈地提示骨髓APC上VISTA(PD-L3)之表現利用免疫系統嚴密調節，此可能有助於其在控制免疫反應及調節T細胞免疫方面之作用。

與其在APC上表現增加對比，VISTA(PD-L3)表現在免疫接種後之稍後時間點下(亦即在48小時下而非在24小時下)在活化之DO11.10 CD4⁺ T細胞上減少(圖8)。此結果提示活體內CD4⁺ T細胞上之VISTA(PD-L3)表現可能在主動免疫反應期間利用其活化狀態及細胞激素微環境調節。

實例3

VISTA(PD-L3)信號傳導對CD4⁺及CD8⁺ T細胞反應之功能影響

製造VISTA(PD-L3)-Ig融合蛋白質以檢查VISTA(PD-L3)對CD4⁺ T細胞反應之調節性作用。VISTA(PD-L3)-Ig融合蛋白質含有融合至人類IgG1 Fc區之VISTA(PD-L3)之胞外域。當在微盤上固定化時，VISTA(PD-L3)-Ig而非對照Ig回應於結合盤之抗CD3刺激而抑制大量經純化之CD4⁺及CD8⁺ T細胞之增殖，如利用停滯之細胞分裂所測定(圖9A至圖9B)。如由ELISA所測定，VISTA(PD-L3)Ig融合蛋白質並不影響抗CD3抗體對塑膠孔之吸附，由此排除非特異性抑制作用之可能性。PD-1 KO CD4⁺ T細胞亦經抑制(圖9C、圖9D)，指示PD-1不為VISTA(PD-L3)之受體。亦直接比較PD-L1-Ig及VISTA(PD-L3)-Ig之抑制作用(圖10)。當滴定之量之Ig融合蛋白質與 α CD3一起吸附至微盤上以刺激CD4⁺ T細胞時，VISTA(PD-L3)-Ig展示與PD-L1-Ig融合蛋白質類似的抑制性功效。

由於大量經純化之CD4⁺ T細胞含有多種子集，故評估VISTA(PD-L3)-Ig對分選之原態(CD25-CD44低CD62L高)及記憶(CD25-CD44高CD62L低)CD4⁺ T細胞子集之影響(圖11A及圖11B)。VISTA(PD-L3)可抑制兩種子集之增殖，不過對記憶細胞之功效低得

多。

為了進一步理解VISTA(PD-L3)介導之抑制之機制，在存在或不存在VISTA(PD-L3)-Ig情況下在T細胞活化之後量測早期TCR活化標誌物之表現及細胞凋亡。與對細胞增殖之負向作用一致，存在對早期活化標誌物CD69、CD44及CD62L之表現的全局抑制(補充圖12A)。另一方面，VISTA(PD-L3)-Ig融合蛋白質並不誘導細胞凋亡。相反地，在TCR活化之早期(24小時)及晚期(48小時)兩者下，與對照-Ig相比，在VISTA(PD-L3)或VISTA-Ig存在下看出細胞凋亡較少(如利用磷脂結合蛋白V+ 7AAD-細胞之百分比測定)(圖12B)。舉例而言，在24小時時間點下，在全部「非閘選」群體上，約27%細胞在VISTA(PD-L3)或VISTA-Ig存在下細胞凋亡，但約39%對照細胞細胞凋亡。當檢查活細胞R1閘內之細胞時，很明顯VISTA(PD-L3)或VISTA-Ig強烈抑制活化誘導之細胞死亡(ACID)，因為在用VISTA(PD-L3)或VISTA-Ig處理時，約72.6%對照細胞發生細胞凋亡，而僅43.5%細胞發生細胞凋亡。對於48小時時間點，看到類似結果。因此，VISTA(PD-L3)或VISTA似乎藉由抑制早期TCR活化及阻滯細胞分裂而負向調節CD4+ T細胞反應，但對細胞凋亡之直接影響最小。此抑制機制與B7-H4之機制類似。Sica等人 (2003) *Immunity* 18: 849-861。

發展2步分析以測定VISTA(PD-L3)或VISTA-Ig是否可抑制預活化之CD4+ T細胞及其抑制作用會持續多久。據顯示，VISTA(PD-L3)或VISTA-Ig融合蛋白質之抑制作用在活化後24小時下在其移除之後持續(圖9D)。另外，原態及預活化之CD4+ T細胞均可由VISTA(PD-L3)或VISTA-Ig抑制。參見圖9D(i)、圖9D(iii)及圖9D(iv)。

接著，分析VISTA(PD-L3)或VISTA-Ig對CD4+ T細胞之細胞激素產生之影響。VISTA(PD-L3)或VISTA-Ig抑制Th1細胞激素IL-2及IFN α 自大量經純化之CD4+ T細胞培養物產生(圖13A至圖13B)。進一步測

試VISTA(PD-L3)或VISTA對各別原態(CD25-CD44低CD62L高)及記憶(CD25-CD44高CD62L低)CD4⁺ T細胞群體之影響。據顯示記憶CD4⁺ T細胞為CD4⁺ T細胞區室內細胞激素產生之主要來源，且VISTA(PD-L3)或VISTA可抑制此產生(圖13C至圖13D)。亦展示VISTA(PD-L3)或VISTA對IFN α 自CD8⁺ T細胞產生之類似抑制作用(圖13E)。VISTA(PD-L3)或VISTA對CD4⁺及CD8⁺ T細胞產生細胞激素之此抑制作用與VISTA(PD-L3)或VISTA為下調免疫反應之抑制性配位體的假設一致。

接著，設計研究以測定能夠克服VISTA(PD-L3)或VISTA之抑制作用之因子。鑒於VISTA(PD-L3)或VISTA抑制IL-2產生，且IL-2為T細胞存活及增殖之關鍵，故IL-2可規避VISTA(PD-L3)或VISTA之抑制性活性。如圖14A中所示，外源性IL-2而非IL-15、IL-7或IL-23部分地逆轉VISTA(PD-L3)或VISTA-Ig對細胞增殖之抑制作用。由較高含量IL-2引起之不完全挽救指示VISTA(PD-L3)或VISTA信號傳導與簡單地IL-2產生相比靶向較廣的T細胞活化路徑。另一方面，由抗CD28促效抗體提供之強力協同刺激信號完全逆轉VISTA(PD-L3)或VISTA-Ig介導之抑制(圖14B)，而中等程度之協同刺激仍然受VISTA(PD-L3)或VISTA信號傳導抑制(圖14C)。此結果提示VISTA(PD-L3)或VISTA介導之免疫抑制在較少發炎病狀下將較有效，但不可避免地由較強正向協同刺激性信號壓制。就此而言，VISTA(PD-L3)或VISTA與其他抑制性B7家族配位體(諸如PD-L1及B7-H4)共有此特徵。Sica等人 (2003) **Immunity** 18: 849-861；Carter等人 (2002) **Eur J Immunol.** 32: 634-643。

除VISTA(PD-L3)或VISTA-Ig融合蛋白質以外，有必要證實APC上表現之VISTA(PD-L3)或VISTA可在APC與T細胞之間的同源相互作用期間抑制抗原特異性T細胞活化。為此目的，VISTA(PD-L3)或

VISTA-RFP或RFP對照蛋白質經由反轉錄病毒轉導而在穩定表現MHCII及B7-2分子之人造抗原呈現細胞株(CHO-APC)中過度表現。Latchman 等人 (2001) **Nat Immunol** 2: 261-268。在CHO中表現VISTA(PD-L3)或VISTA之一個問題在於大部分VISTA(PD-L3)或VISTA未能定位至細胞表面上，或許歸因於缺乏對VISTA(PD-L3)或VISTA表面定位之支持之外來環境。儘管VISTA(PD-L3)或VISTA之細胞質尾域上不存在提示調節方式之明確基元，但尾域可針對其細胞內定位起作用。因此，設計無尾域之VISTA(PD-L3)或VISTA突變體，且發現其成功地定位至CHO細胞表面上。

為了刺激T細胞反應，將CHO-VISTA(PD-L3)或VISTA或CHO-RFP細胞與DO11.10 CD4⁺ T細胞一起在抗原OVA肽存在下培育。如圖15A至圖15D中所示，與CHO-RFP細胞相比，CHO-VISTA(PD-L3)或VISTA誘導DO11.10細胞之增殖較少。此抑制作用在較低肽濃度下較顯著，與較強刺激信號將克服VISTA(PD-L3)或VISTA之抑制性影響之觀念一致。

另外，證實天然APC上全長VISTA(PD-L3)或VISTA之抑制作用。活體外培養之源自骨髓之樹突狀細胞(BMDC)並不表現較高含量之VISTA(PD-L3)或VISTA(圖16)。VISTA(PD-L3)或VISTA-RFP或RFP在10天培養期之期間利用反轉錄病毒轉導表現於BMDC中。基於RFP表現將經轉導之細胞分選至均質。經轉導之DC上VISTA(PD-L3)或VISTA之表現含量藉由用抗VISTA(PD-L3)或VISTA單株抗體染色來估算，且發現與新鮮分離之腹膜巨噬細胞上之含量類似，由此在生理性表現範圍內(圖16)。經分選之BMDC接著用於在OVA肽存在下刺激OVA特異性轉殖基因CD4⁺ T細胞(OTII)(圖15D)。BMDC上VISTA(PD-L3)或VISTA之表現抑制同源CD4⁺ T細胞增殖反應。此結果與使用VISTA(PD-L3)或VISTA-Ig融合蛋白質及CHO-APC細胞之先前資料一

致，提示VISTA(PD-L3)或VISTA可抑制T細胞介導之免疫反應。

實例4

在多發性硬化症動物模型(EAE)中評估抗VISTA(PD-L3)或VISTA抗體

由於 α VISTA(PD-L3)或VISTA單株抗體活體內似乎抑制T細胞反應，故測試 α VISTA(PD-L3)或VISTA以評估其是否可抑制T細胞介導之自體免疫疾病。使用實驗性過敏性腦脊髓炎(EAE)模型，測定 α PDL-L3單株抗體對發炎性疾病之功能影響。EAE為一種廣泛使用之人類自體免疫疾病多發性硬化症之鼠類模型。EAE可藉由用含髓鞘抗原之佐劑免疫接種而誘導，或藉由髓鞘特異性T細胞之授受性轉移而誘導，其引起多種效應T細胞及B細胞及巨噬細胞之發炎浸潤以及中樞神經系統之脫髓鞘。

在被動EAE模型中測試 α PDL-L3單株抗體以避免誘導因注射大量單株抗體作為外來抗原所致之全身性過敏反應。在此授受性轉移EAE模型中，供體SJL小鼠用CFA及PLP肽免疫接種。在第10天，自引流LN分離全部淋巴細胞，且將其與PLP肽、IL-23(20 ng/ml)及抗IFN γ (10 μ g/ml)一起活體外培養4天。接著，將擴增之CD4 T細胞純化，且將其授受性地轉移至未處理受體小鼠中。此分析指示 α PDL-L3單株抗體延遲疾病發作以及降低疾病嚴重度，藉此使疾病發展曲線明顯偏移(A，圖17)。另外，其降低較大百分比小鼠之嚴重度且使存活率自約22%大大地增加至超過75%。此結果展示 α PDL-L3單株抗體在EAE中之活性與活體外資料一致，且展示此試劑作為新穎免疫調節試劑在多種發炎性疾病中之用途。

實例5

VISTA-IGG2A在主動EAE小鼠中之治療性作用

評估患有如先前實例中所述產生之主動EAE之小鼠，以便評估VISTA融合多肽對於治療多發性硬化症之推定功效。在此等實驗中，

用以下治療由6隻EAE小鼠組成之組：PBS(對照)、100微克對照IgG2a多肽、300微克對照IgG2a多肽、100微克mVISTA IgG2a多肽、300微克mVISTA IgG2a多肽。如由圖42中之分數展示，經mVISTA-Ig治療之小鼠在兩種測試劑量下具有明顯的且統計學上顯著之治療性作用(在較低及較高劑量下 $p = 0.0051$ 及 0.0043)。

吾人亦進行實驗，分析VISTA對EAE中T細胞之命運及功能之作用。吾人欲評估VISTA是否改變病原性致腦炎的T細胞之發展、純系T細胞擴增、T細胞極性、壽命及 $T_{eff} \rightarrow T_{reg}$ 之轉化。吾人研究VISTA阻斷對EAE中T細胞命運之影響。與較高疾病分數一致，在疾病過程結束時CNS之分析證實13F3(α VISTA)治療組中產生IL17A之CD4⁺ T細胞浸潤明顯較多(自0.66→11%)。

實例6

針對狼瘡之防治評估VISTA-IG

針對防治研究，NZBWF1雌性小鼠自8週齡起每隔一天用PBS、150微克對照-IgG2a或mVISTA-IgG2a治療。每週利用體重損失及蛋白尿監測疾病嚴重度。如圖43A及43B中所示，資料以平均值 $\pm$ SEM之形式展示。測定在對照IgG2a與mVISTA-IgG2a之間的統計顯著性。測定 p 值為0.0027(利用非成對曼-懷特尼檢驗(unpaired Mann Whitney test))，其指示VISTA融合體相對於對照預防SLE之發作。

實例7

VISTA-IG在狼瘡中促進存活率

如圖44A及圖44B中進一步所示，在8週時，每隔一天投與NZBWF1雌性小鼠PBS、150微克對照-IgG2a或mVISTA-IgG2a，如由蛋白尿減少所證明，經VISTA-Ig治療之小鼠之疾病嚴重度較低。資料再次以平均含量 $\pm$ SEM之形式展示且代表一個實驗。如利用非成對曼-懷特尼檢驗利用 p 值測定之統計顯著性展示為0.0009。44B中存活曲線

及44A中蛋白尿資料中之結果指示VISTA-Ig多肽可增強狼瘡患者之存活率，且緩和或預防其中的腎臟損傷。

實例8

在EAE模型中評估VISTA作用

由於 α VISTA(PD-L3)或VISTA單株抗體活體內似乎抑制T細胞反應，故測試 α VISTA(PD-L3)或VISTA以評估其是否可抑制T細胞介導之自體免疫疾病。使用實驗性過敏性腦脊髓炎(EAE)模型，測定 α PDL-L3單株抗體對發炎性疾病之功能影響。EAE為一種廣泛使用之人類自體免疫疾病多發性硬化症之鼠類模型。EAE可藉由用含髓鞘抗原之佐劑免疫接種而誘導，或藉由髓鞘特異性T細胞之授受性轉移而誘導，其引起多種效應T細胞及B細胞及巨噬細胞之發炎浸潤以及中樞神經系統之脫髓鞘。

實例9

VISTA在CNS中之表現

亦實現VISTA在CNS中之表現。此等分析揭露在患病小鼠中，CD11b⁺細胞上之VISTA表現顯著減少(自76%→33%)(圖22)，與對於增強之發炎可容許VISTA損失之假設一致。此結果令人感興趣，且在吾人將本文中發炎骨髓細胞與表現極高含量VISTA之腫瘤中之MDSC對比時很可能在功能上為重要的。已報導EAE小鼠之脾臟中源自骨髓之抑制性細胞(CD11b⁺Ly-6C⁺高MDSC)之數目升高，該等細胞對於T細胞活化具有強力抑制性且可使疾病緩和³²。吾人資料強有力地提示VISTA可在EAE中骨髓介導之抑制方面起作用。

實例10

VISTA對EAE中T細胞之命運及功能之影響

吾人亦進行實驗，分析VISTA對EAE中T細胞之命運及功能之作用。吾人欲評估VISTA是否改變病原性致腦炎的T細胞之發展、純系T

細胞擴增、T細胞極性、壽命及Teff→Treg之轉化。吾人研究VISTA阻斷對EAE中T細胞命運之影響。與較高疾病分數一致，在疾病過程結束時CNS之分析證實13F3(α VISTA)治療組中產生IL17A之CD4⁺ T細胞浸潤明顯較多(自0.66→11%)。

實例11

VISTA(PD-L3)或VISTA轉殖基因及基因剔除小鼠

利用胚胎之慢病毒感染，已產生普遍表現VISTA(PD-L3)或VISTA之四個轉殖基因小鼠。此等小鼠在人類延長因子1啟動子之控制下表現全長VISTA(PD-L3)或VISTA。此等小鼠利用慢病毒載體pWPT產生。與其他PD-L1家族成員類似(Appay等人 (2002) **J. Immunol.** 168: 5954-8)，預期VISTA(PD-L3)或VISTA將充當活體內負向調節因子，同時起到活體外協同刺激 α CD3 T細胞增殖之作用。在此方面，預期此等小鼠自發地發展自體免疫，且評估VISTA(PD-L3)或VISTA轉殖基因小鼠中之活體內免疫反應(亦即體液性免疫反應、T細胞激活)，從而評估全身性自體免疫疾病發展。

對於基因剔除小鼠，利用同源重組使VISTA(PD-L3)或VISTA不活化。自INVITROGEN®(Carlsbad, CA)購買含有全長VISTA(PD-L3)或VISTA序列之BAC純系。VISTA(PD-L3)或VISTA打靶載體藉由以下方式產生：插入定位在新黴素基因上游之VISTA(PD-L3)或VISTA基因之第二外顯子之5'端處的1.6 kb片段，及插入定位在新黴素基因下游之VISTA(PD-L3)或VISTA基因之第三外顯子之3'端處的5 kb片段。源自B6之胚胎幹(ES)細胞用VISTA(PD-L3)或VISTA打靶載體電穿孔且選擇重組純系。接著，將所選純系注射至C57BL/6胚胎中，且使所得嵌合雄性後代與FLP-缺失者小鼠交配從而移除新黴素卡匣。後代中靶向之對偶基因之傳遞率利用PCR自基因組DNA測定。第二及第三外顯子含有VISTA(PD-L3)或VISTA域，因此，所得小鼠僅具有VISTA(PD-

L3)或VISTA分子之不活化形式。

如同其他PD-L^{-/-}小鼠一樣測定VISTA(PD-L3)或VISTA缺乏小鼠之整體免疫能力，包括評估T細胞對抗原之反應、體液性免疫反應、明顯自體免疫(例如全身性紅斑性狼瘡症、發炎性腸病)、及對誘導之自體免疫疾病(實驗性自體免疫性腦脊髓炎)之敏感性增加(Chen (2004) 上文)。

獲得實質上如上所述產生之VISTA^{-/-}小鼠，且評估其表型及免疫功能。在表型上，觀察到此等小鼠之肺、肝臟及胰臟中之淋巴細胞性浸潤增加。此等小鼠亦在其肺及脾臟中具有濾泡性增生。此外，其在其胃中具有嗜中性白血球浸潤。相形之下，其腎臟、腎上腺、食道、小腸及結腸不展現與正常動物之可察覺的差異。

在免疫學上，此等小鼠對EAE具有增高之敏感性，且在雌性中具有增高之IgG自體抗體產生(圖45及圖46)。此外，此等小鼠展示相對於對照動物骨髓形成增加(圖47)。此等小鼠亦展現發炎表型，且具有數目增加之CD4⁺及CD8⁺ T細胞，且表現增加或改變之含量之細胞激素及其他多肽，諸如嗜酸性粒細胞趨化因子、IP-10、MCP-1、M1G、 γ 干擾素、IL-17F及TNF α 。(圖48)。

實例12

在膠原蛋白誘導之關節炎動物模型中測試之VISTA(PD-L3)或VISTA特異性抗體

雄性DBA/1J小鼠在其尾巴基部處用含有100 μ g雞II型膠原蛋白(C-II)於CFA中之100 μ l乳液(結核分枝桿菌3.5 mg/ml)免疫接種，且在免疫接種後第21天，用100 μ g水性C-II腹膜內增強免疫。各治療組之小鼠(n = 6)或未經治療的(NT-黑色圓形)、或用300 μ g倉鼠IgG注射(Ham Ig-黑色正方形)或用300 μ g單株抗體「7c9」(紅色三角形)或「13F3」(綠色三角形)注射，如指示。每2天給予注射。在所指示之

日，在0至4之標度上對各小鼠之各爪之關節炎性腫脹進行評分。所示關節炎分數為各治療組中小鼠之所有爪之總分除以該組中小鼠數目。

實例13

利用特異性VISTA單株抗體阻斷VISTA活體外增強T細胞反應。

鑑別中和VISTA介導之抑制之VISTA特異性單株抗體(13F3)(圖18)。自未處理小鼠純化CD11b^高骨髓APC以在存在或不存在13F3情況下刺激OT-II轉殖基因CD4⁺ T細胞。與其中和作用一致，13F3增強由CD11b^高骨髓細胞刺激之T細胞增殖，其展示為表現較高含量之VISTA。

實例14

抗VISTA增強抗腫瘤免疫性

由於抗VISTA增強T細胞活化之能力，故評估抗VISTA是否將增強對免疫原性腫瘤之保護性免疫反應。吾人具有許多經驗之模型為膀胱癌MB49。MB49表現雄性抗原，且由此在雌性小鼠中具有適當免疫原性，不過，若無免疫介入術，則其將生長且殺死雌性小鼠。為了測試αVISTA療法之功效，皮下(sq)投與雌性小鼠MB49腫瘤細胞且其用αVISTA治療。此後的日子裏，量測腫瘤尺寸直至小鼠必需安樂死為止。圖19展示抗VISTA療法大大地損害腫瘤生長。此結果歸因於抗VISTA強化細胞介導之免疫(CMI)反應之能力。

實例15

抗VISTA在4種鼠類腫瘤模型中對腫瘤消退之作用

免疫原性膀胱癌腫瘤MB49中之實驗已展示使用單株抗體13F3之VISTA之中和及保護宿主免於腫瘤生長。資料指示VISTA因其MDSC之極高表現而在腫瘤微環境中具有相當大的負向免疫調節作用。檢查抗小鼠VISTA對免疫原性(MB49)及高度非免疫原性(B16)腫瘤模型之生長之作用的研究將進一步證實αVISTA療法的功效，闡明作用機

制，且提供選擇最佳劑量及時間安排之基礎。以下詳述各腫瘤模型之基本原理。

表3

腫瘤名稱	腫瘤類型	宿主	組別	分析
MB49	膀胱癌	B6雌性	α VISTA 對照Ig	腫瘤生長 存活率 免疫/自體免 疫分析
MB49	膀胱癌	B6雄性		
B16.F10	黑色素瘤	B6雄性或雌性		
ID8	卵巢癌	B6雌性		

雌性小鼠中之**MB49**：已展示此鼠類模型中之功效。此模型中之MDSC亦表現較高含量之VISTA。在此模型中，由於存在H-Y抗原，故**MB49**腫瘤具有適當免疫原性。由於吾人已知抗VISTA療法為有效的，故此模型將充當「陽性」對照以測定抗VISTA療法之劑量(每隻小鼠1 μ g至100 μ g)及時間安排(腫瘤接種當天，或在腫瘤之後4天、7天、10天；治療介入術)。

雄性小鼠中之**MB49**：使用雌性小鼠中有效之劑量及時間安排，測定雄性小鼠(其中腫瘤免疫原性較低)中抗VISTA療法之功效。

B16黑色素瘤：抗CTLA-4單株抗體展示在此模型中高度有效，且代表小鼠模型對預測人類中之成功有價值之非免疫原性腫瘤。劑量方案及時間安排與在**MB49**模型中展示有效之劑量方案及時間安排類似。

ID8卵巢癌：在此模型中，VISTA表現已展示在MDSC上極高。負載**ID8**腫瘤之小鼠在腫瘤接種時或在接種後第5天、第15天、第25天用 α VISTA治療。

方法：**B6 WT**小鼠用於測定抗VISTA治療之最佳劑量及時間安排以用於所提出之所有鼠類腫瘤模型之緩解。欲使用之模型列於**表3**中。

此劑量及時間安排分析之讀數為腫瘤生長動力學。對於**MB49**及**B16**研究，所有腫瘤研究均經由皮內(i.d.)接種進行，且因此可易於量

測腫瘤尺寸。每隔2至3天使用測徑規收集腫瘤量測值。在此等模型中之各者中，針對抗VISTA或對照抗體減緩腫瘤生長或有助於腫瘤消退之能力對該抗VISTA或對照抗體之影響進行測試。ID8之生長使用螢光素酶轉導之ID8以及利用IVIS工作站之全身成像來追蹤。另外，亦將測定宿主存活率。

腫瘤生長之資料以平均腫瘤體積 $\pm$ SEM之形式表示，且利用兩尾ANOVA分析組間差異。機率(p)值小於0.05視為在統計學上顯著。利用卡本-麥爾(Kaplan-Meier)法分析存活率資料，其中威爾卡遜秩檢驗(Wilcoxon rank test)及對數秩檢驗用於驗證組間存活率差異之顯著性。在B16模型中，測定發生白斑病之小鼠之頻率。

利用此等方法，在數種非免疫原性腫瘤模型中，與用對照抗體治療之小鼠相比較，獲得用抗VISTA單株抗體治療之小鼠之腫瘤生長減緩及/或腫瘤消退。已展示抗VISTA治療在免疫原性腫瘤模型中延遲腫瘤生長。由於此等腫瘤模型中之各者具有其自身特定生長動力學，且預期對VISTA之依賴性會賦予腫瘤生長且抑制免疫性，故在腫瘤接種時或在此後的時間投與小鼠單株抗體。另外，測試至少3個不同濃度之抗VISTA單株抗體，從而測定最佳劑量以達成治療益處。

如圖20A至圖20E中所示，VISTA單株抗體治療在此等腫瘤模型中之所有4者中減少腫瘤生長，在該等腫瘤模型中，小鼠用(A) MB49、(B) MCA105、(C) EG7腫瘤細胞皮下(sq)接種，或(D)用ID8-螢光素酶腫瘤細胞腹膜內(ip)接種，且在第+1天開始時每隔一天用VISTA單株抗體13F3(300 μ g)治療。監測皮下腫瘤生長。對於ID8-螢光素酶腫瘤，在第30天利用Xenogen IVIS對小鼠進行成像。(E)亦測定負載腫瘤小鼠中骨髓白血球上之VISTA表現。針對VISTA表現分析引流LN及腫瘤組織(腹水)。此等發現展示MDSC上表現之VISTA為干擾保護性抗腫瘤免疫性發展之主要抑制性分子，且 α VISTA緩解此抑

制性活性，允許免疫介入術及腫瘤之緩慢生長。此等發現亦支持以下結論：自體免疫疾病中骨髓細胞上之VISTA在調節發炎程度方面起關鍵性作用。

實例16

合成適用於治療自體免疫之寡聚VISTA及VISTA融合蛋白質

可溶性VISTA-Ig在活體外並無抑制性，其對細胞之結合亦不可易於偵測。相形之下，此分子對塑膠之結合極度具有抑制性。另外，使用VISTA-Ig之研究在活體內並不展示明顯的活性。就此等研究而言，所形成之VISTA-Ig在CH2-CH3域中具有突變，阻止FcR結合，且因此在活體內並非嗜細胞的。近期研究已展示與單體PD-L1對PD-1之結合相比，四聚PD-L1對PD-1之結合高 $100\times(K_d\ 6\times 10^{-8}\text{ M})$ ，且對細胞之結合可易於偵測。四聚PD-L1並未在活體內但在活體外加以測試，顯示其利用天然PD-L1阻斷功能性抑制。使用類似方法，製造寡聚物，其將靶向VISTA路徑且在活體外及活體內誘發強力免疫抑制活性。

該等寡聚物使用VISTA之單體胞外域或其例如至少50、75、100、125、150、175或200個胺基酸長之片段構築，將該胞外域或其一部分用作寡聚物之構築嵌段。在此等方法中，本發明者運用公認之MHC四聚體技術。在此等方法中，將VISTA胞外域構築體或片段連接至各種寡聚合域(在本文中經鑑別)之N端，以便產生價數跨越二價至七價的一系列VISTA複合物。

藉此，基於較高親和力捲曲螺旋域形成一系列非共價寡聚物，該等域引導二聚、三聚、四聚、五聚及七聚組件之穩定形成。此等寡聚構築體表現於宿主細胞(例如大腸桿菌)中。當在大腸桿菌中實現表現時，接著使所表現之寡聚物再摺疊，且使用標準實驗室方案將其自包涵體純化。此方法已常規製造用於生物及結構分析之高品質物質，

包括MHC-肽複合物及三聚GITRL66。接著，利用SDS-PAGE、分析型凝膠過濾、分析型超速離心及質譜分析來評估經分離之寡聚蛋白。此等品質控制措施確保用於活體外及活體內研究之均質的經充分表徵之物質之可獲得性。此等構築體之平行組織產生價數等於寡聚狀態之分子，因為各個VISTA複合物經定位從而與細胞表面結合之VISTA受體高效地相互作用。上文構築體具有極度穩定性及寡聚狀態之均質性。(除展現95°C之熔融溫度之七聚體序列以外，非共價捲曲螺旋寡聚合域通常展現超過100°C之熔融溫度。

另外，二聚VISTA-Ig經四聚化，其為嗜細胞的或非嗜細胞的。與IgG1 Fc(野生型IgG1及現有非FcR結合IgG1兩者)同框之VISTA之Fc融合構築體用N端BirA位點修飾以達成酶促生物素化且選殖至pIRES2-EGFP載體中。酶促生物素化將允許抗生物素蛋白多聚化後之特異性單一殘基修飾及定向。此方法已用於產生許多Ig-融合蛋白質，包括B7-1、PD-L1、PD-L2及TIM-3。所表現之蛋白質接著在活體外以酶促方式經生物素標記，藉由尺寸排阻HPLC純化，且使用PE-抗生物素蛋白四聚化。在活體內評估所得四聚體之活性，該等四聚體可為嗜細胞的或非嗜細胞的。

此等工程化之多聚VISTA蛋白質適用於治療自體免疫及治療上批准VISTA路徑及免疫抑制中之介入術的其他病狀。

實例17

用於誘導免疫抑制之VISTA腺病毒載體

使用重組腺相關病毒(AAV)之基因轉移已在基因療法中看到巨大技術發展。特定言之，PD-L1基因或CTLA4-Ig及CD40-Ig之AAV介導之基因傳遞已在狼瘡ENREF_69及心臟移植之自體免疫疾病模型中達成治療功效。此等方法用於傳遞全長VISTA或寡聚VISTA胞外域，且在EAE模型中評估其治療性作用。表現全長鼠類VISTA、或寡聚

VISTA胞外域之重組腺病毒載體使用Adeno-XTM表現系統(Clontech)根據製造商之說明書形成。簡言之，將VISTA選殖至缺失E1及E3之基於pAdDEST之表現載體中，處於人類細胞巨大病毒(CMV)啟動子之控制下。接著，自細胞溶解物純化表現VISTA及對照lacZ之腺病毒。針對VISTA之全身性過度表現，在經由免疫接種誘導疾病之前或之後不久，或在疾病發作之後，將腺病毒利用靜脈內尾靜脈注射投與小鼠(1×10^9 個噬菌斑形成單位[Pfu])。對照小鼠將接受100 μ l PBS。在SJL小鼠及C57BL/6小鼠兩者中監測疾病發展及變化，該等小鼠展現不同疾病發展模式，且代表人類MS患者之臨床表現之兩種不同形式。

實例18

使用工程化蛋白及腺病毒載體之功能研究

亦用工程化之VISTA及/或腺病毒載體投與小鼠(5 μ g至100 μ g蛋白質/小鼠×每週3次)。在投與之後，測定T細胞擴增、分化以及EAE發展。

實例19

對VISTA之結構研究及測定VISTA功能之分子決定因素

經組織之信號傳導複合物之親和力、特異性、寡聚狀態、及形成及定位為免疫功能之關鍵促成因素。所有此等特徵均影響信號傳導及免疫調節，因為受體-配位體胞外域之組織直接控制以非共價方式締合之細胞質信號傳導及骨架分子之募集、組織及功能。VISTA之高解析度晶體結構使用包括細菌、昆蟲及哺乳動物表現系統以及高通量結晶及結構測定方法之技術測定。為了驗證以結晶學方式觀察之二硫鍵模式，使用高解析度質譜分析，其使用成功支持TIM-3及人類DcR359之研究之方法進行。基於此等結構結果，設計具有改變之寡聚性質之一系列突變體，以及在VISTA IgV域之任何擾動區附近之突變體。此等突變蛋白質將提供對VISTA功能之額外直接的機械瞭解，

且應適用於需要免疫抑制之治療學，諸如本文中鑑別之自體免疫、過敏及發炎性疾病。將此等突變體、尤其寡聚物在活體外系統中測試，且在動物自體免疫及發炎疾病模型中評估，以便評估對疾病發展、疾病緩解或在保護動物免於發生自體免疫或發炎病狀方面的免疫抑制作用。

此等寡聚VISTA蛋白質將活化VISTA路徑且充當自體免疫中免疫介入術之目標。此介入術將抑制免疫性且對自體免疫疾病及需要自體免疫抑制之其他病狀發揮治療學益處。此舉藉由在不同自體免疫及發炎模型(諸如EAE及膠原蛋白誘導之關節炎動物模型)中投與寡聚VISTA蛋白質來實現。另外，如上所論述，構築過度表現全長VISTA或VISTA寡聚物之腺病毒載體且對其進行活體內測試。此等研究將證實VISTA寡聚物之免疫抑制作用。

實例20

使用條件性過度表現VISTA轉殖基因小鼠品系(VISTA轉殖基因小鼠品系：R26STOPFLVISTA(VISTA)之實驗

含有在側接loxP之STOP卡匣後面之VISTA之全長cDNA之打靶構築體已靶向普遍表現之ROSA26基因座。多個經正確靶向之R26StopFL/-VISTA幼仔出生，且將其繁殖至CMV-Cre缺失者品系上60。VISTA×CMV-cre中之初步資料證實GFP及增高之VISTA表現。對此等小鼠免疫狀態(T細胞對抗原之反應、抗體效價)之研究將證實受抑制之表型。將VISTA品系與CD4-cre、CD11c-cre及Lys-Cre混種繁殖，從而測定VISTA表現之譜系位置是否影響抑制。亦測定T細胞之表型及功能，且測定VISTA之過度表現是否引起aTreg之產生。在此等研究中，來自OVA-免疫cre×VISTA品系之Treg授受性轉移至WT宿主中，從而查看在過度表現之VISTA之存在下抗原免疫接種是否誘導抗原特異性Treg。此舉應當證實VISTA影響Treg分化。

另外，在EAE模型中實現研究，由此就疾病發展而言評估VISTA蛋白質對不同譜系(利用與CD4-、CD11c-、Lys-cre混種繁殖產生)之影響。假定疾病可受VISTA突變體之譜系限制性過度表現抑制，或在CMV×VISTA突變體中，疾病發展之時間控制亦使用Cre-ERT2×VISTA η 進行。經由投與他莫昔芬(tamoxifen)，吾人可在疾病開始之前、或在疾病開始時或在疾病高峰期誘導VISTA之過度表現，從而測定VISTA是否可影響免疫之誘導及/或效應階段。使用BM嵌合小鼠，VISTA之時間限制性過度表現可限於造血區室。針對控制VISTA過度表現時間窗口之評價，遺傳地開啟VISTA，接著在投與抗VISTA單株抗體情況下在血清學上關閉VISTA。此等研究將測定VISTA何處及何時必需起作用以控制自體免疫疾病之發展及進展。

實例21

抗VISTA抗體CD40/TLR促效劑疫苗之作用

如圖21中所示，進行分析抗VISTA抗體對疫苗功效之作用的實驗。此等結果展示抗VISTA增強CD40/TLR疫苗之治療功效。C57BL/6小鼠用 1×10^5 個轉移性B16.F10黑色素瘤細胞皮下攻擊。四天後，小鼠用100 μ g腫瘤相關抗原 Δ V、100 μ g α CD40 FGK45(CD40促效抗體)及100 μ g S-27609(TLR7促效劑)在伴有或不伴有抗VISTA(200 μ g $\times$ 3/週)情況下疫苗接種。藉由測徑規量測法監測腫瘤生長。

實例22

表現譜

為了有助於與Treg細胞之經確立之表現譜比較，使用標準生長及活化條件(McHugh等人 (2002) 上文)。簡言之，在預塗有抗CD3(伴有或不伴有抗GITR(DTA-1))之24孔盤中，將新鮮分離之Treg細胞(約96%陽性)以 10^6 個/毫升接種至補充有10%胎牛血清及100單位IL-2之完全RPMI培養基中(Shimizu等人 (2002) 上文)。將細胞在37°C下培養0

小時及12小時，純化RNA，且隨後使用AFFYMETRIX®小鼠基因組A430寡核苷酸陣列分析。

藉由比較來自靜息或活化CD4⁺CD25⁺ T細胞組之資料，發現基因表現模式與此項技術中確立之基因表現模式類似(Gavin等人 (2002) 上文；McHugh等人 (2002) 上文)。為了鑑別由GITR信號傳導調節之基因，比較使用或不使用抗GITR處理之不同細胞群體之間的基因表現譜。彙集一系列已知以及未知基因，包括先前未表徵之VISTA及Treg-sTNF。

實例23

VISTA之分子選殖，反轉錄病毒製造及細胞之反轉錄病毒轉導

自經純化之鼠類CD4⁺ T細胞選殖全長VISTA。使用Qiagen RNAm mini套組自CD4⁺ T細胞中分離總RNA。使用Bio-Rad iScript™ cDNA合成套組產生cDNA。將全長VISTA擴增且選殖至IRES-GFP片段經RFP置換之反轉錄病毒載體pMSCV-IRES-GFP之EcoRI-XhoI位點中(Zhang及Ren (1998) Blood 92: 3829-3840)，由此產生融合至RFP之N端上之VISTA之融合蛋白質。無輔助反轉錄病毒藉由VISTA-RFP反轉錄病毒載體與嗜親性包裝載體pCL-Eco(IMGENEX Corp.)一起短暫轉染而產生於HEK293T細胞中。鼠類T細胞株EL4細胞或源自骨髓之DC之反轉錄病毒轉導藉由在室溫下在8 µg/ml凝聚胺(Sigma)存在下以2000 rpm旋轉感染45分鐘來進行。

實例24

製造VISTA-IG融合蛋白質

將VISTA之胞外域(胺基酸32至190)擴增且選殖至親本載體CDM7B之SpeI-BamHI位點中。Hollenbaugh等人 (1995) J Immunol Methods 188: 1-7。此載體含有人類IgG1之恆定區及鉸鏈區之突變體形式，其對Fc受體之結合減少很多。將所得載體CDM7B-VISTA與

DHFR表現載體pSV-dhfr(McIvor及Simonsen (1990) **Nucleic Acids Res** 18: 7025-7032)共轉染至CHO(dhfr-)細胞株(ATCC #CRL-9096)中。在不具有核苷酸之培養基MEM- α (INVITROGEN®)中選擇表現VISTA-Ig之穩定CHO細胞純系。使用0.5 μ M至1 μ M甲胺喋呤(SIGMA® M9929)之進一步擴增產生表現較高含量可溶性VISTA-Ig融合蛋白質之純系。使用標準蛋白質-G管柱親和層析法自培養物上清液中進一步純化融合蛋白質。

實例25

產生VISTA單株抗體

亞美尼亞倉鼠(Armenian hamster)每週用過度表現VISTA-RFP之EL4細胞免疫接種4×次，接著使用在CFA中乳化之VISTA-Ig融合蛋白質增強免疫。在增強免疫四週後，倉鼠用可溶性VISTA-Ig融合蛋白質再次增強免疫。最後一次增強免疫四天後，收集倉鼠脾臟細胞且使用標準雜交瘤融合技術將其融合至骨髓瘤細胞株SP2/0-Ag14(ATCC #CRL-1581)上。Shulman等人 (1978) **Nature** 276: 269-270。在限制稀釋之後選擇分泌VISTA特異性抗體之雜交瘤純系，且利用ELISA及流動式細胞測量術兩種方法篩選。

實例26

VISTA之抑制性活性

PD-L1之抑制性活性藉由活體外使用過度表現PD-L1之抗原呈現細胞與CD4+及CD8+ T細胞抗原受體轉殖基因T細胞及抗原刺激來揭露(Carter等人 (2002) **Eur. J. Immunol.** 32:634-43)。類似地，將本文所揭示之表現全長VISTA之慢病毒載體(lentivector)轉導至表現II類主要組織相容性複合體(MHC)及I類MHC之細胞株中。TEa Tg或2C轉殖基因T細胞對由空載體轉導或VISTA轉導之抗原呈現細胞呈現之抗原的反應根據已確立之方法測定。

實例27

單株抗體製造

VISTA在鼠類B細胞株A20中過度表現，且重組細胞株用於免疫接種亞美尼亞倉鼠。在5×細胞免疫接種之後，倉鼠用在CFA中乳化之經純化之VISTA-Ig融合蛋白質增強免疫。四週以後，用可溶性VISTA-Ig提供最後的增強免疫。隨後，在第4天進行倉鼠脾細胞與SP2/0細胞之融合。利用ELISA以及鼠類T細胞株EL4上過度表現之經染色之VISTA而非PD-L1鑑別出識別VISTA-Ig融合蛋白質之十六個不同純系。該等純系中之十一者成功地經次選殖及製備以用於評估其染色細胞及組織上內源性VISTA及阻斷VISTA功能之能力。

實例28

VISTA-IG結合物負向調節T細胞反應

材料及方法

小鼠 C57BL/6小鼠、OT-II CD4轉殖基因小鼠及SJL/J小鼠係購自Jackson Laboratory。FoxP3-GFP報導小鼠係如先前所述(Fontenot等人 2005)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等人 1999，Nishimura等人 2001)提供。所有動物均維持在Dartmouth Medical School之無病原體設施中。所有動物方案均由Dartmouth College之機構動物照護及使用委員會(Institutional Animal Care and Use Committee)核准。

抗體、細胞株及試劑 抗體 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)及 α -B7-H4(188)係購自eBioscience。LPS(Sigma-Aldrich)、重組小鼠IFN- γ (PeproTech)、人

類IL-2(PeproTech)及可溶性PD-L1-Ig融合蛋白質(R&D Systems)以指示濃度使用。CFA及雞OVA係購自Sigma-Aldrich。B細胞淋巴瘤細胞株A20(BALB/c來源)係自美國菌種保存中心(American Type Culture Collection)獲得。

VISTA之分子選殖，反轉錄病毒製造及細胞之反轉錄病毒轉導
自經純化之小鼠CD4⁺ T細胞選殖全長VISTA。使用RNAmini套組(QIAGEN)自CD4⁺ T細胞中分離總RNA。使用iScript cDNA合成套組(Bio-Rad Laboratories)產生cDNA。將全長VISTA擴增且選殖至IRES-GFP片段經RFP置換之反轉錄病毒載體pMSCV-IRES-GFP之ECORI-XhoI位點中(Zhang及Ren, 1998)，由此產生融合至RFP之N端上之VISTA之融合蛋白質。無輔助反轉錄病毒藉由VISTA-RFP反轉錄病毒載體與嗜親性包裝載體pCL-Eco(Imgenex Corp.)一起短暫轉染而產生於HEK293T細胞中。小鼠T細胞株EL4細胞或BMDC之反轉錄病毒轉導藉由在室溫下在8 µg/ml凝聚胺(Sigma-Aldrich)存在下以2000 rpm旋轉感染45分鐘來進行。

VISTA之生物資訊學分析 進化上與VISTA Ig-V序列有關之蛋白質利用BLAST演算法鑑別(Altschul等人 1990)。來自Protein Data Bank之最適合之結構模板(Berman等人 2000)用mGenTHREADER演算法鑑別(Lobley等人 2009)。選擇PD-L1(Protein Data Bank寄存編號3BIS)(最高得分命中物之一)作為比較性蛋白質結構模型化之模板。VISTA之結構模型使用MMM伺服器使用兩種比對方法MUSCLE及HAlign(Rai及Fiser, 2006； Rai等人 2006)之最佳組合構建。自ENSEMBL資料庫中收集36個VISTA同源蛋白質(Flicek等人 2008)。分別使用DALI(Holm及Park, 2000)及Clustalw(Larkin等人 2007)計算結構及序列比對，且使用ESPrpt 2.2伺服器呈現(Gouet等人 1999)。如先前所述構建BLAST成對比較網路(Atkinson等人 2009)，且使用

Cytoscape分析(Shannon等人 2003)。

製造 VISTA-Ig 融合蛋白質 將 VISTA 之胞外域(胺基酸 32 至 190) 擴增且選殖至親本載體 CDM7B 之 SpeI-BamHI 位點中(Hollenbaugh 等人 1995)。此載體含有人類 IgG1 之恆定區及鉸鏈區之突變體形式，其對 Fc 受體之結合減少很多。所得載體 CDM7B-VISTA 與二氫葉酸還原酶表現載體 pSV-dhfr(McIvor 及 Simonsen, 1990) 共轉染至中國倉鼠卵巢(dhfr⁻)細胞株(#CRL-9096；美國菌種保存中心)中。在不具有核苷酸之培養基 MEM- α (INVITROGEN)中選擇表現 VISTA-Ig 之穩定中國倉鼠卵巢細胞純系。使用 0.5 μ M 至 1 μ M 甲胺喋呤(M9929；Sigma-Aldrich)之進一步擴增產生表現較高含量可溶性 VISTA-Ig 融合蛋白質之純系。使用標準蛋白質 G 管柱親和層析法自培養物上清液中進一步純化融合蛋白質。

產生 VISTA 單株抗體(單抗) 亞美尼亞倉鼠用過度表現 VISTA-RFP 之 EL4 細胞免疫接種，接著使用在 CFA 中乳化之 VISTA-Ig 融合蛋白質增強免疫。在增強免疫 4 週後，倉鼠用可溶性 VISTA-Ig 融合蛋白質再次增強免疫。最後一次增強免疫 4 天後，收集倉鼠脾臟細胞且使用標準雜交瘤融合技術將其融合至骨髓瘤細胞株 SP2/0-Ag14(#CRL-1581；美國菌種保存中心)上(Shulman 等人 1978)。在限制稀釋之後選擇分泌 VISTA 特異性抗體之雜交瘤純系，且利用 ELISA 及流動式細胞測量術兩種方法篩選。

RNA 及 RT-PCR 藉由使用 TRIZOL®(Invitrogen)根據公司之說明書自多種小鼠組織樣品或經純化之造血細胞類型中收集總 RNA。藉由使用 iScript cDNA 合成套組(Bio-Rad Laboratories)來製備 cDNA。將等量之組織 cDNA(10 ng)用於 RT-PCR 反應以擴增全長 VISTA。在經由 1% 瓊脂糖凝膠跑膠之後察看 PCR 產物。

流動式細胞測量術及分析 在 FACScan 上使用 CellQuest 軟體(BD)

進行流動式細胞測量術分析。使用FlowJo軟體(Tree Star, Inc.)進行資料分析。為了定量細胞增殖，分析CFSE分裂之直方圖概況，且使用Prism 4(GraphPad Software, Inc.)將增生性CFSE^低細胞之百分比繪圖。

細胞製備 使用總CD4⁺ T細胞分離套組(Miltenyi Biotec)自未處理小鼠中分離總CD4⁺ T細胞。當指示時，將增濃之CD4⁺ T細胞流動式分選成原態(CD44^低CD25⁻CD62L^高)及記憶(CD44^高CD25⁻CD62L^低)群體。對於活體外增殖分析，CD4⁺ T細胞在37°C下用5 μM CFSE(Invitrogen)標記10分鐘且洗滌兩次，隨後進行刺激。

對於A20分析，A20-RFP或A20-PD-XL細胞(20,000個)用100 μg/ml絲裂黴素C預處理(1小時)，隨後在OVA肽存在下與標記CFSE之DO11.10 CD4⁺ T細胞(100,000個)一起培育。如指示添加對照-Ig或13F3單株抗體。藉由CFSE稀釋在72小時下分析細胞增殖。為了分選CD11b^高骨髓APC，使用CD11b磁性珠粒(Miltenyi Biotec)將CD11b⁺單核細胞自原態脾細胞增濃。總CD11b^高骨髓APC、或CD11b^高CD11c⁻單核細胞及CD11b^高CD11c⁺骨髓DC經分選，輻射(2,500拉德)，且用於在OVA肽存在下刺激OT-II轉殖基因CD4⁺ T細胞。如指示添加對照-Ig或13F3單株抗體。在72小時分析之最後8小時期間藉由氬摻入量測細胞增殖。

活體外結合盤之T細胞活化分析 將經純化之CD4⁺ T細胞(100,000個細胞/孔)在指示濃度比之抗CD3(純系2C11)及VISTA-Ig或對照-Ig存在下培養在96孔平底盤中。舉例而言，為了全範圍滴定，96孔板用含與1.25 μg/ml(比率2:1)、2.5 μg/ml(比率1:1)、5 μg/ml(比率1:2)或10 μg/ml(比率1:4)VISTA-Ig或對照-Ig蛋白質混合在一起之2.5 μg/ml α-CD3的PBS在4°C下塗佈隔夜。用PBS洗滌孔三次，隨後添加CD4⁺ T細胞。複製培養物在補充有10% FBS、10 mM Hepes、50 μM β-ME及青黴素/鏈黴素/L-麩醯胺酸之完全RPMI 1640培養基中。當指

示時，將100 U/ml人類IL-2(PeproTech)或滴定量之 α -CD28(純系PV-1; Bio X Cell)與 α -CD3一起塗佈以挽救VISTA-Ig之抑制作用。在第3天或根據如指示之時程分析培養物之CFSE概況。

培養BMDC、反轉錄病毒轉導及刺激轉殖基因CD4⁺ T細胞 如先前所述(Lutz等人 1999; Son等人 2002)在作出一些修改之情況下產生BMDC。簡言之，在第0天，藉由用27號針沖洗自脛骨及股骨中分離BM細胞。在紅血球溶解之後，將 1×10^6 至 2×10^6 個BM細胞再懸浮於含有20 ng/ml GM-CSF之1 ml完全RPMI-1640培養基(PeproTech)中。細胞在8 μ g/ml凝聚胺(Sigma-Aldrich)存在下用RFP或VISTA-RFP反轉錄病毒感染。感染藉由將盤在室溫下以2,000 rpm旋轉45分鐘來進行。接著，將細胞再培養2小時，隨後添加新鮮培養基。在第1天、第3天及第5天重複類似感染程序。在第10天收集鬆散附著細胞(90%為CD11c⁺)，且分選CD11c⁺RFP⁺雙陽性細胞，且將其用於刺激OT-II轉殖基因CD4⁺ T細胞。對於OT-II T細胞增殖分析，將100,000個標記CFSE之OT-II CD4⁺ T細胞與30,000個經分選之RFP⁺或VISTA-RFP⁺ BMDC一起在滴定量之合成OVA₃₂₃₋₃₃₉肽(AnaSpec)下培養於96孔圓底盤中。在72小時下藉由檢查CFSE概況來分析OT-II T細胞之增殖。

腫瘤實驗 親本MCA105腫瘤細胞用VISTA-RFP或RFP對照以反轉錄病毒方式轉導，且基於RFP表現分選至均質。對於腫瘤疫苗接種，未處理C57BL/6小鼠用1,000,000個經輻射之MCA105(10,000拉德)細胞免疫接種，該等細胞皮下接種至左側腹中。在第14天，經疫苗接種之小鼠用皮下接種至右側腹中之活MCA105腫瘤細胞攻擊。每2天監測腫瘤生長。當腫瘤尺寸達至150 mm²時，將小鼠安樂死。對於T細胞剔除，經疫苗接種之小鼠用對CD4⁺ T細胞(純系GK1.5)及CD8⁺ T細胞(純系53.6.72)具有特異性之單株抗體腹膜內預治療(250 μ g)2天，隨後進行活腫瘤細胞攻擊，且每隔3至4天重複該治療直至實驗結束為

止。當腫瘤尺寸達至160 mm²時，將小鼠安樂死。

EAE之被動誘導及中樞神經系統浸潤CD4⁺ T細胞之表徵 對於被動轉移EAE，雌性SJL小鼠(6週齡)用含有400 µg結核分枝桿菌(*Mycobacterium tuberculosis*)H37Ra及100 µg PLP肽之200 µl乳液皮下免疫接種。在第10天收集引流LN細胞以用於活體外刺激。溶解紅血球。將單細胞懸浮液(10,000,000個/微升)培養於完全IMDM培養基中，該完全IMDM培養基具有10% FBS、50 µM 2-ME、1 mM麩醯胺酸、1%青黴素/抗生蛋白鏈菌素、1 mM非必需胺基酸、20 ng/ml IL-23、10 ng/ml IL-6、10 ng/ml IL-1β、20 µg/ml抗IFN-γ及20 µg/ml PLP肽。在第4天，收集細胞，且使用CD4磁性珠粒(Miltenyi Biotec)純化活CD4 T細胞。將1,500,000至2,000,000個經純化之活CD4 T細胞授受性轉移至未處理SJL小鼠中以誘導EAE。每隔3天，用非特異性倉鼠對照-Ig或400 µg VISTA特異性單株抗體治療小鼠。疾病如下評分：0，無疾病；1，後肢虛弱或尾調損失；2，尾無力及後肢輕癱；2.5，一條後肢麻痺；3，兩條後肢麻痺；4，前肢虛弱；5，垂死。在分數為4時，將小鼠安樂死。

VISTA之選殖以及序列及結構分析

活化相對於靜息小鼠CD25⁺ CD4⁺天然Treg細胞(nTreg細胞)之Affymetrix®分析揭露具有未知功能但具有與Ig超家族之序列同源性的基因產物(RIKEN cDNA 4632428N05或4632428N05Rik)之表現。自小鼠CD4⁺ T細胞cDNA文庫選殖930 bp基因產物，其匹配預測之大小及序列。計算機序列及結構分析預測在成熟時309 aa之I型跨膜蛋白。其胞外域含有136 aa之單一胞外Ig-V域，其連接至23-aa主幹區、21個殘基之跨膜區段及97-aa細胞質域(圖23A)。4632428N05Rik之細胞質尾域並不含有任何信號傳導域。基於本文中所示之Ig-V域之結構特徵及其免疫抑制性功能，將此分子命名為VISTA。

使用VISTA Ig-V域之BLAST(Altschul等人 1990)序列搜索將B7家族之PD-L1鑑別為具有 10^{-4} 邊界顯著e值分數且具有24%序列一致性之最接近的進化相關蛋白。

VISTA與B7家族成員PD-L1、PD-L2、B7-H3及B7-H4之基於結構之序列比對將已知在所有Ig-V域蛋白質中系統保守且被認為對於Ig-V摺疊之穩定性很重要的數個胺基酸突出顯示(圖23C)。實例包括在B及F β 股中之兩個半胱胺酸，該等半胱胺酸在兩個 β 摺疊之間形成二硫鍵，其為Ig超家族蛋白質之標誌性特徵(圖23C)。此多重序列比對亦揭露為VISTA所獨有之其他序列特徵。

利用RT-PCR分析及流動式細胞測量術之VISTA之表現實驗。RT-PCR分析用於測定小鼠組織中VISTA之信使RNA表現模式(圖3A)。VISTA大多表現在造血組織(脾臟、胸腺及BM)或白血球充分浸潤之組織(亦即肺)上。亦在非造血組織(亦即心臟、腎臟、腦及卵巢)中偵測出微弱表現。數個造血細胞類型之分析揭露腹膜巨噬細胞、脾臟CD11b⁺單核細胞、CD11c⁺ DC、CD4⁺ T細胞及CD8⁺ T細胞上VISTA之表現，但在B細胞上表現含量較低(圖3B)。此表現模式亦與GNF(諾華研究基金會基因組研究所)基因陣列資料庫(代號4632428N05Rik；Su等人 2002)以及國家生物技術資訊中心GEO(基因表現彙編)資料庫(寄存編號GDS868)基本上一致。

為了研究蛋白質表現，製造VISTA特異性倉鼠單株抗體。特異性藉由在過度表現VISTA之小鼠EL4 T細胞上陽性染色，但在過度表現PD-L1之EL4細胞上陰性染色來展示。

使用 α -VISTA單株抗體純系8D8，利用流動式細胞測量術在造血細胞上分析VISTA表現。Foxp3-GFP基因嵌入報導小鼠用於區分CD4⁺ nT_{reg}細胞(Fontenot等人 2005)。在周邊淋巴器官(脾臟及LN)中，在所有CD4⁺ T細胞子集(參見總CD4⁺ T細胞、或Foxp3⁻原態T細胞及Foxp3⁺

nT_{reg}細胞及記憶CD4⁺ T細胞)上看到明顯表現，而CD8⁺ T細胞表現顯著較低量之表面VISTA(圖3C)。在胸腺中，VISTA表現在CD4⁺CD8⁺雙陽性胸腺細胞上為陰性的，在CD4單陽性細胞上較低且在CD8單陽性細胞上為可偵測的。接著，對於脾臟及腹膜細胞兩者(包括F4/80巨噬細胞及骨髓CD11c⁺ DC兩者)，可看出較高VISTA表現與CD11b標誌物有較強相關性(圖3D至圖3E)。相比之下，B細胞及NK細胞對VISTA表現大多為陰性的。較小百分比之Gr-1⁺顆粒球亦表現VISTA(圖3F)。

在來自不同淋巴器官之相同細胞譜系上展示差異表現模式(圖3G)。對於CD4⁺ T細胞及CD11b⁺單核細胞，表現含量遵循腸系膜LN>周邊LN及脾臟>腹膜腔及血液之模式。此模式對於CD11b^高細胞較不顯著。此等資料提示某些細胞類型上之VISTA表現可利用細胞成熟及/或組織微環境調節。

除新鮮分離之細胞以外，在伴有及不伴有活化之活體外培養時，在脾臟CD4⁺ T細胞、CD11b^高單核細胞及CD11c⁺ DC上分析VISTA表現(圖6)。脾臟細胞用培養基、 α -CD3(用於活化T細胞)、或IFN- γ 及LPS(用於活化單核細胞及DC)培養24小時，隨後進行VISTA及其他B7家族配位體(例如PD-L1、PD-L2、B7-H3及B7-H4)之表現分析。此比較揭露此等分子之間的獨特表現模式。VISTA表現在活體外培養時在所有細胞類型上快速損失，與活化狀態無關。相比之下，PD-L1表現在活化CD4⁺ T細胞上或在CD11b^高單核細胞及CD11c⁺ DC上在於單獨培養基中培養之後上調，且在刺激時進一步增強。在所用培養條件下，PD-L2、B7-H3及B7-H4之表現並不顯著。在與其他B7家族配位體相比時，活體外VISTA表現之損失為獨特的，但可能反映未能模擬組織微環境之非最佳培養條件。

為了解決VISTA表現在活體內可能被如何調節，用在CFA中乳化之同源抗原雞OVA免疫接種CD4 TCR轉殖基因小鼠DO11.10。在免疫

接種後24小時，針對VISTA表現分析來自引流LN之細胞(圖7A)。用抗原(CFA/OVA)而非單獨佐劑免疫接種使CD11b⁺ VISTA⁺骨髓細胞群體急劇增加，該群體含有F4/80⁺巨噬細胞及CD11c⁺ DC之混合群體。與PD-L1及PD-L2之進一步比較揭露儘管PD-L1具有最高組成型表現含量，但VISTA在此類發炎免疫反應期間最高度上調(圖7B)。總而言之，此等資料強烈地提示骨髓APC上VISTA之表現利用免疫系統嚴密調節，此可能有助於其在控制免疫反應方面之作用。與其在APC上增加之表現對比，VISTA表現在免疫接種後之稍後時間點下(亦即在48小時下而非在24小時下)在活化DO11.10 CD4⁺ T細胞上減少。

活體外VISTA信號傳導對CD4⁺及CD8⁺ T細胞反應之功能影響。製造VISTA Ig融合蛋白質(VISTA-Ig)以檢查VISTA對CD4⁺ T細胞反應之調節性作用。VISTA-Ig含有融合至人類IgG₁ Fc區之VISTA之胞外域。當在微盤上固定化時，VISTA-Ig而非對照Ig回應於 α -CD3刺激而抑制大量經純化之CD4⁺及CD8⁺ T細胞之增殖(圖9A及圖9B)。VISTA-Ig並不影響抗CD3抗體對塑膠孔之吸附，如由ELISA所測定，由此排除非特異性抑制作用之可能性。亦直接比較PD-L1-Ig及VISTA-Ig之抑制作用。當滴定之量之Ig融合蛋白質與 α -CD3一起吸附至微盤上以刺激CD4⁺ T細胞時，VISTA-Ig展示與PD-L1-Ig融合蛋白質類似的抑制性功效。PD-1 KO CD4⁺ T細胞亦經抑制(圖9C)，指示PD-1不為VISTA之受體。

由於大量經純化之CD4⁺ T細胞含有多種子集，故評估VISTA-Ig對分選之原態(CD25⁻CD44^低CD62L^高)及記憶(CD25⁻CD44^高CD62L^低) CD4⁺ T細胞子集之影響。VISTA抑制兩種子集之增殖，不過對記憶細胞之功效較低。

為了進一步理解VISTA介導之抑制之機制，在T細胞活化之後量測早期TCR活化標誌物之表現及細胞凋亡。與對細胞增殖之負向作用

一致，存在對早期活化標誌物CD69、CD44及CD62L之表現的全局抑制(圖12A)。相比之下，VISTA-Ig並不誘導細胞凋亡。在TCR活化之早期(24小時)及晚期(48小時)兩者下，與對照-Ig相比，在VISTA-Ig存在下看出細胞凋亡較少(如利用磷脂結合蛋白V⁺ 7AAD⁻細胞之百分比測定)(圖12B)。舉例而言，在24小時下，在全部非閘選群體中，約27%細胞在VISTA-Ig存在下細胞凋亡，但約39%對照細胞在對照-Ig存在下細胞凋亡。類似地，在處於活細胞R1閘中之細胞中，約72.6%細胞在對照-Ig存在下發生細胞凋亡，而僅約43.5%細胞在VISTA-Ig存在下細胞凋亡。在48小時時間點下，看到類似結果。因此，VISTA似乎藉由抑制早期TCR活化及阻滯細胞分裂而負向調節CD4⁺ T細胞反應，但對細胞凋亡之直接影響最小。此抑制機制與B7-H4之機制類似(Sica 等人 2003)。

發展兩步分析以測定VISTA-Ig是否可抑制預活化之CD4⁺ T細胞及其抑制作用有多持久。VISTA-Ig融合蛋白質之抑制作用在活化後24小時下在其移除之後持續(圖9D，ii)。另外，原態及預活化之CD4⁺ T細胞均由VISTA-Ig抑制(圖9D，i，iii及iv)。

接著，分析VISTA-Ig對CD4⁺ T細胞之細胞激素產生之作用。VISTA-Ig抑制Th1細胞激素IL-2及IFN- γ 自大量經純化之CD4⁺ T細胞培養物產生(圖13A至圖13B)。進一步測試VISTA對各別原態(CD25⁻CD44^低CD62L^高)及記憶(CD25⁻CD44^高CD62L^低)CD4⁺ T細胞群體之影響。記憶CD4⁺ T細胞為CD4⁺ T細胞區室內細胞激素產生之主要來源，且VISTA抑制此產生(圖13C至圖13D)。來自CD8⁺ T細胞之IFN- γ 產生亦由VISTA-Ig抑制(圖13E)。VISTA對利用CD4⁺及CD8⁺ T細胞之細胞激素產生的此抑制作用與VISTA為下調T細胞介導之免疫反應之抑制性配位體的假設一致。

設計其他實驗以測定能夠克服VISTA之抑制作用之因子。鑒於

VISTA抑制IL-2產生，且IL-2為T細胞存活及增殖之關鍵，吾人假設IL-2可規避VISTA之抑制性活性。如圖14A中所示，外源性IL-2而非IL-15、IL-7或IL-23部分地逆轉VISTA-Ig對細胞增殖之抑制作用。由較高含量IL-2引起之不完全挽救指示VISTA信號傳導與簡單地IL-2產生相比靶向較廣的T細胞活化路徑。相比之下，由 α -CD28促效抗體提供之強力協同刺激信號完全逆轉VISTA-Ig介導之抑制(圖14B)，而中等程度之協同刺激繼續受VISTA信號傳導抑制(圖14C)。就此而言，VISTA與其他抑制性B7家族配位體(諸如PD-L1及B7-H4)共有此特徵(Carter等人 2002；Sica等人 2003)。

除VISTA-Ig融合蛋白質以外，有必要證實APC上表現之VISTA可在APC與T細胞之間的同源相互作用期間抑制抗原特異性T細胞活化。吾人已使用兩個獨立的細胞系統來解決此問題。首先，VISTA-RFP或RFP對照蛋白質經由反轉錄病毒轉導在B細胞株A20中過度表現。VISTA-RFP融合蛋白質之正確細胞表面定位由螢光顯微術證實。為了刺激T細胞反應，將A20-VISTA或A20-RFP細胞與DO11.10 CD4⁺ T細胞一起在抗原OVA肽存在下培育。如圖15A及圖15C)中所示，與A20-RFP細胞相比，A20-VISTA誘導DO11.10細胞之增殖較少。此抑制作用在較低肽濃度下較顯著，其與較強刺激信號將克服VISTA之抑制性影響之觀念一致。

其次，證實天然APC上全長VISTA之抑制作用。活體外培養之源自BM之DC(BMDC)並不表現較高含量之VISTA(圖16)。VISTA-RFP或RFP在10天培養期之期間利用反轉錄病毒轉導表現於BMDC中。基於RFP表現將經轉導之細胞分選至均質。經轉導之DC上VISTA之表現含量藉由用 α -VISTA單株抗體染色來估算，且發現與新鮮分離之腹膜巨噬細胞上之含量類似，由此在生理性表現範圍內(圖16)。經分選之BMDC接著用於在OVA肽存在下刺激OVA特異性轉殖基因CD4⁺ T細胞

(OT-II)。BMDC上VISTA之表現抑制同源CD4⁺ T細胞增殖(圖15D)。此結果與使用VISTA-Ig融合蛋白質及表現VISTA之A20細胞之資料(圖5)一致，提示APC上表現之VISTA可抑制T細胞介導之免疫反應。

為了驗證活體內VISTA表現之影響，檢查腫瘤細胞上之VISTA過度表現是否可損害抗腫瘤免疫反應。MCA105(甲基秋薊酮105)纖維肉瘤並不表現VISTA。藉由用VISTA-RFP或RFP對照病毒反轉錄病毒轉導來建立兩種MCA105腫瘤株。由於MCA105腫瘤具免疫原性且在用經輻射之MCA105細胞預免疫接種之宿主中可易於控制(Mackey等人1997)，故吾人檢查腫瘤VISTA表現對該保護性免疫之作用。如圖24A中所示，表現VISTA之MCA105在經疫苗接種之宿主中旺盛地生長，而對照腫瘤未能繁茂成長。為了證實在不存在T細胞介導之抗腫瘤免疫性之情況下在腫瘤生長速率方面不存在固有差異，將腫瘤接種於經疫苗接種之動物中，在該等動物中，CD4⁺及CD8⁺ T細胞均使用單株抗體剔除。如圖24B中所示，在T細胞剔除後，MCA105RFP及MCA105VISTA腫瘤以等同速率生長且與非T剔除之宿主相比快得多。總而言之，此等資料指示腫瘤細胞上之VISTA表現可干擾宿主中之保護性抗腫瘤免疫性。

利用特異性VISTA單株抗體之VISTA阻斷在活體外及活體內增強T細胞反應。

鑑別VISTA特異性單株抗體(13F3)以在A20-DO11.10分析系統中中和VISTA介導之抑制(圖25A)。為了進一步證實13F3對T細胞反應之影響，自未處理小鼠純化CD11b^高骨髓APC以在存在或不存在13F3情況下刺激OT-II轉殖基因CD4⁺ T細胞(圖25B)。與其中和作用一致，13F3增強由CD11b^高骨髓細胞刺激之T細胞增殖，其展示為表現較高含量之VISTA(圖3)。可看出13F3對CD11b^高 CD11c⁺骨髓DC及CD11b^高 CD11c⁻單核細胞兩者之類似作用(圖25C至圖25D)。

接著，在EAE之被動轉移模型中檢查利用單株抗體之VISTA阻斷之影響，該模型為用於人類多發性硬化症之小鼠自體免疫發炎疾病模型(Stromnes及Goverman, 2006)。致腦炎的CD4⁺ T細胞利用主動免疫接種用蛋白脂質蛋白質(PLP)肽在供體小鼠中激活且授受性轉移至未處理小鼠中。將滴定數目之經活化之致腦炎的T細胞被動轉移至用 α -VISTA或對照-Ig治療之未處理宿主中，且監測EAE之發展，以便仔細評估 α -VISTA加重疾病之能力。發現13F3在次最佳T細胞轉移劑量下明顯加速疾病發作以及加重疾病嚴重度。13F3治療組在第14天達至100%發病率，而用對照抗體治療之該等小鼠在實驗持續時間期間並未達至100%發病率。在整個疾病過程中，與對照組相比，13F3治療組中之平均疾病分數明顯較高。與較高疾病分數一致，在疾病過程結束時中樞神經系統之分析證實13F3治療組中產生IL-17A之CD4⁺ T細胞浸潤明顯較多。

討論

VISTA為Ig超家族網路之一名新穎成員，其在活體外及活體內對T細胞發揮免疫抑制活性，且在控制自體免疫發展及對癌症之免疫反應方面為重要介體。所呈現之資料表明：(a) VISTA為Ig超家族之一名新成員，其含有Ig-V域，與PD-L1具有距離序列相似性；(b)當作為Ig融合蛋白質製造或在人造APC上過度表現時，其抑制CD4及CD8⁺ T細胞增殖及細胞激素產生；(c)骨髓APC上之VISTA表現對於活體外T細胞反應為抑制性的；(d)腫瘤細胞上之過度表現損害經疫苗接種之小鼠中之保護性抗腫瘤免疫性；及(e)抗體介導之VISTA阻斷加重T細胞介導之自體免疫疾病EAE的發展。

VISTA Ig-V域之生物資訊學分析提示B7-嗜乳脂蛋白家族成員PD-L1、PD-L2及MOG以及非B7家族CAR及VCBP3為VISTA之最接近的進化親緣物(圖A、圖B及圖C)。然而，一級序列特徵之密切檢查提

示所有VISTA直系同源物共有獨特且保守之序列基元，且VISTA可能代表Ig超家族之結構及功能上新穎的成員。特定言之，為VISTA胞外域所獨有之四個不變半胱胺酸之存在(三個在Ig-V域中且一個在主幹中)可有助於影響其功能之新穎結構特徵。鑒於其嚴格的不變性，似乎可能所有四個VISTA特異性半胱胺酸均參與二硫鍵。此觀察結果提示數個可能性，包括四個半胱胺酸(a)形成兩個分子內二硫鍵；(b)在二聚體界面處形成四個分子間二硫鍵；及(c)形成一個分子內及兩個分子間二硫鍵。此等情境中之任一者將代表新穎二硫鍵結模式，且將相對於典型的Ig超家族成員引起獨特三級及/或四級結構。另外，全局序列比較提示VISTA並非Ig超家族內任何已知功能群之成員。

VISTA之表現模式將VISTA與其他B7家族配位體進一步區分開來。此資料主要與PD-L1及PD-L2形成對比，因為在此等兩個配位體與VISTA之間的序列同源性較高且其對T細胞活化之抑制性功能類似。VISTA之穩態表現選擇性表現於造血細胞上，且最高度表現於APC(巨噬細胞及骨髓DC)及CD4⁺ T淋巴細胞兩者上。在此情況下，PD-L1在造血及非造血細胞兩者上均具有廣泛表現，而PD-L2侷限於DC及巨噬細胞上(Keir等人 2006，Keir等人 2008)。儘管PD-L1及PD-L2均在活體外培養時及在活化時在APC上上調(Yamazaki等人 2002；Liang等人 2003；Keir等人 2008)，但骨髓細胞及T細胞上之VISTA表現在短期活體外培養之後損失，與是否存在任何刺激無關(圖6)。該損失可能反映淋巴組織微環境對維持或調節活體內VISTA表現之必需作用。與此假設一致，即使在穩態下，VISTA亦區別地表現在不同組織部位處(亦即，與周邊淋巴組織相比在腸系膜LN處較高，且在血液中最底)。吾人推測該等不同表現程度可能反映VISTA在特定組織部位處之差別的抑制性功能。

活體內VISTA表現在主動免疫反應期間經高度調節。TCR轉殖基

因小鼠中使用佐劑加上抗原(OVA/CFA)而非單獨佐劑(CFA)之免疫接種誘生引流LN內之VISTA^高骨髓APC群體(圖7)。對抗原之需求提示APC上之VISTA上調可能為T細胞活化之結果。與VISTA相比，PD-L1及PD-L2亦在骨髓APC上回應於免疫接種上調，但程度小得多。吾人推測VISTA⁺骨髓APC之誘生構成自身調節機制以減少進行性免疫反應。與此假設一致，當利用表現VISTA之骨髓APC刺激時，中和VISTA單株抗體增強活體外T細胞增殖反應(圖25A至圖25D)。

與骨髓細胞上之表現模式對比，VISTA表現在活體內活化之CD4⁺ T細胞上減少。此結果提示活體內CD4⁺ T細胞上之VISTA表現在主動免疫反應期間利用其活化狀態及細胞激素微環境調節。該下調為獨特的，且尚未在其他抑制性B7家族配位體(諸如PD-L1、PD-L2及B7-H4)中看到。儘管，當前未知CD4⁺ T細胞上VISTA表現之功能意義，但在將來研究中會研究自T細胞至APC之反向信號傳導在其同源相互作用期間的可能性。

VISTA之抑制性配位體功能藉由活體外及活體內使用VISTA-Ig融合蛋白質、表現VISTA之APC、及過度表現VISTA之腫瘤以及中和單株抗體來描述。過度表現VISTA之腫瘤可克服經疫苗接種之宿主中之強力保護性免疫。EAE模型中VISTA單株抗體之較強增強作用進一步驗證VISTA在活體內為抑制性配位體之假設。類似方法已用於表徵其他B7家族配位體之功能(Sica等人 2003；Keir等人 2008)。重要的是，應注意VISTA藉由嚙合與PD-1相比不同之受體而發揮其抑制性功能(圖9)。VISTA路徑之阻斷加重EAE之事實證實其功能與PD-L1或PD-L2並不重複。相反地，吾人推測VISTA以由其獨特的結構特徵、表現模式及動力學反映之方式控制免疫反應。其未知受體之鑑別將進一步闡明VISTA介導之抑制之機制。

總而言之，VISTA被鑑別為一種新穎的免疫抑制性配位體。APC

上VISTA之表現藉由嚙合其T細胞上有待鑑別之反受體而在T細胞與APC之間的同源相互作用期間抑制T細胞反應。VISTA阻斷增強自體免疫疾病模型中之T細胞介導之免疫性，提示其在與其他抑制性B7家族配位體(諸如PD-L1及PD-L2)相比時在控制自體免疫方面獨特且不重複的作用。其在免疫活化早期下之經高度調節之表現模式亦可指示反饋控制路徑下調T細胞免疫且減輕發炎反應。就此而言，VISTA抑制性路徑之治療學介入術代表一種新穎方法，其調節T細胞介導之免疫性以用於治療諸如病毒性感染及癌症之疾病。

實例29

VISTA路徑作為自體免疫中免疫介入術之目標

此等研究之目的在於測定可溶性VISTA-Ig蛋白質是否可抑制活體內免疫反應。活體內使用鼠類VISTA-mIgG2a之研究展示遲至第14天之治療性治療對EAE中之臨床疾病分數具有有益作用。此等進行性實驗看上去極其令人興奮，因為吾人可能已鑑別出自體免疫疾病介入術中之新的軸心(圖26)。在此成功情況下，吾人已使用鼠類IgG1或IgG2a主鏈上之鼠類VISTA來擴大吾人之研究以利用其嗜細胞能力。與IgG1 Fc(野生型IgG1及現有非FcR結合IgG1兩者)同框之VISTA-Fc融合構築體已經製造。測試此等可溶性VISTA分子中之各者以測定其是否可抑制EAE，且據顯示VISTA-IgG1及VISTA-IgG2a均抑制EAE之發展及進展(圖27)。此等結果提示二聚嗜細胞VISTA在活體內將具有活性。基於此等結果，進一步預期VISTA之其他多聚形式將具有類似活性。舉例而言，VISTA可使用位點特異性生物素化進行四聚化且與抗生物素蛋白複合以達成多聚化。此等多聚體可用於活體外調節T細胞功能，且特定言之，在EAE及其他自體免疫、發炎及過敏病症之情形下。最後，吾人相信此提議中所述之努力對於發展新的治療學策略持有實質上希望，且總體而言，對於對自體免疫及T細胞功能感興趣

之整個集體具有相當大的益處。

實例30

VISTA-IG結合物減少EAE進展

實驗性自體免疫性腦脊髓炎(EAE)為一種多發性硬化症模型。EAE藉由用175 μ g MOG/CFA及百日咳毒素(PT)300 ng免疫接種小鼠(第0天、第2天)而誘導。在第14天、第17天及第20天，投與150 μ g VISTA-IgG 2a(n = 8)或150 μ g對照IgG2a(n = 8)。資料以平均值 $\pm$ SEM之形式展示於圖26中。在另一實驗中，在第6天，小鼠用150 μ g對照IgG1(n = 3)、150 μ g對照IgG2a(n = 6)、150 μ g mVISTA-IgG1(n = 3)或150 μ g mVISTA IgG2a(n = 6)之每週3劑治療(總共兩週)。資料以平均值 $\pm$ SEM之形式展示於圖27中。在另一實驗中，在第14天，小鼠用PBS(n = 6)、100 μ g對照IgG2a(n = 6)、300 μ g對照IgG2a(n = 6)、100 μ g VISTA-IgG2(n = 6)或300 μ g mVISTA IgG2a(n = 6)之每週3劑治療(總共兩週)。資料以平均值 $\pm$ SEM之形式展示於圖28中。由此，VISTA-Ig融合蛋白質對發炎病狀(例如多發性硬化症)具有治療性作用。

實例31

人類細胞中VISTA表現及利用VISTA-Ig之抑制之分析

在人類細胞樣品中檢查VISTA之表現模式及其藉由投與VISTA-Ig融合蛋白質產生之抑制。

材料及方法

製造VISTA-IG融合蛋白質——形成融合蛋白質，其由來自人類VISTA之胞外IgV域之胺基酸16至194及經突變以較弱結合Fc受體之人類IgG1形式組成。將VISTA序列選殖至載體CDM7B之SpeI-BamHI位點中。藉由Freestyle CHO細胞之短暫轉染使用Freestyle轉染試劑及無蛋白質的Freestyle表現培養基根據製造商說明書(Invitrogen)製造蛋白

質。上清液在生長5天之後收集且藉由蛋白質G親和管柱純化。使用10K MWCO旋轉管柱(Amicon)濃縮蛋白質。

細胞製備——自未鑑別之健康人類供體獲得人類血漿清除樣品。針對培養試驗，使血液在Lymphoprep(PAA)上分層且利用密度梯度離心法分離。將界面細胞在PBS中洗滌兩次，接著在MACS緩衝液中洗滌一次，隨後用Miltenyi CD4陰性選擇套組II、CD8陰性選擇套組或CD4記憶T細胞選擇套組根據製造商說明書進行磁性珠粒選擇。對於效應細胞分離，隨後用Miltenyi CD27陽性選擇珠粒使CD4 T細胞剔除CD27⁺細胞類型。

培養——將T細胞以 2×10^5 個細胞/孔接種於用抗CD3(純系OKT3，BioXCell)及VISTA-Ig或對照-Ig(ZZ，R&D biosystems)塗佈之96孔平底盤中。除非另有指示，否則在4°C下將於PBS中之與10 µg/ml(比率1:4)VISTA-Ig或對照-Ig蛋白質混合在一起之2.5 µg/ml抗CD3塗佈隔夜。孔用完全培養基洗滌兩次，隨後添加細胞。當指示時，使滴定量之抗CD28(Miltenyi Biotech)包括於塗佈混合物中，或向培養基中添加50 ng/ml IL-2、IL-4、IL-7或IL-15(Peprotech)。培養物在第2天針對早期活化標誌物分析，且在第5天針對晚期活化標誌物或CFSE概況分析。

流動式細胞測量術——針對在培養之後的染色，收集細胞且將其轉移至V形底96孔盤中。洗滌細胞，且將其在HBSS/5% BCS染色緩衝液中染色，該緩衝液含有抗體(CD4、CD8、CD25、CD69、CD45RA；BD biosciences)及近紅外可固定之live-dead染料(Invitrogen)。洗滌細胞，且用BD固定緩衝液將其固定，隨後進行分析。

對於針對VISTA表現之染色，洗滌全血，且用含有針對胞外標誌物之抗體之PBA緩衝液(PBS/0.1% BSA/0.1%疊氮化鈉)將其染色。針

對CD4、CD8、CD3、CD45RA、CD56、CD11b、CD11c、CD123、HLA-DR、CD14及CD16之抗體係購自BD biosciences，且抗VISTA係如本文所述製造。為了以細胞內方式染色FoxP3，使用來自eBiosciences之Foxp3固定/透化濃縮及稀釋套組及來自BD biosciences之抗FoxP3抗體。參見圖33D。

用FACSDiva軟體v6.1.2(Becton & Dickinson)在LSRIIFortessa(Becton & Dickinson, San Jose, CA, USA)上獲得樣品，且用FlowJo軟體(Tree Star, Inc.)分析。使用利用Prism 5(GraphPad Software, Inc.)之繪製產生圖式。

結果

人類VISTA蛋白質——針對人類基因組之小鼠VISTA序列之BLAST鑑別染色體10開放閱讀框架54(C10orf54或血小板受體Gi24前體，GENE編號：64115)，其具有 $8e-165$ 之e值及77%一致性。與小鼠VISTA相同，預測此蛋白質編碼具有單一胞外IgV域之I型跨膜蛋白。人類VISTA為311個胺基酸(aa)長，其由32-aa信號肽、130-aa胞外IgV域、33-aa主幹區、20-aa跨膜域及較長96-aa細胞質尾域組成。參見SEQ ID NO: 16之胺基酸序列。

VISTA表現分析——VISTA健康人類組織之表現利用cDNA組織組(Origene)之實時PCR分析檢查圖29A)。與小鼠組織類似，VISTA主要表現於造血組織或含有顯著數目造血組織之組織中。此結果與VISTA在免疫相關功能中之重要性一致。令人感興趣的是，VISTA之表現在人類胎盤中尤其較高，其可指示VISTA在維持對妊娠之同種異體環境之耐受方面之功能性作用。發現此表現模式遵循與VISTA之最接近同源物PD-L1之趨勢類似的趨勢(圖29B)。

接著，利用流動式細胞測量術檢查造血區室內之VISTA蛋白質表現。自周邊血液中分離PBMC且用抗VISTA單株抗體GA1將其染色。

VISTA由大部分單核細胞、樹突狀細胞及約20%之CD4及CD8 T細胞高度表現(圖30)。在血液單核細胞之『巡視』($CD14^{\text{high}}CD16^+$)及『發炎』($CD14^+CD16^{\text{high}}$)子集內及在樹突狀細胞之淋巴及骨髓子集兩者內觀察到VISTA表現。

VISTA對T細胞功能之功能性作用——先前已展示VISTA對小鼠T細胞免疫反應具有負向影響(Wang等人 (2011) *J. Exp. Med.* 第1頁至第16頁)。檢查VISTA在人類細胞介導之免疫反應中是否具有相同的作用。形成Ig融合蛋白質，其由VISTA之胞外域及人類IgG之Fc區組成，該Fc區含有突變以達成減少之Fc受體結合。10 $\mu\text{g/ml}$ VISTA-Ig或對照Ig與2.5 $\mu\text{g/ml}$ 抗CD3(OKT3)一起在盤上固定化，隨後增殖利用CFSE稀釋來量測。發現VISTA抑制大量經純化之CD4(圖31A)及CD8(圖31B)T細胞之CFSE稀釋。利用VISTA之抑制與利用PD-L1-Ig(R&D biosystems)誘導之抑制類似。另外，VISTA-Ig有效抑制記憶($CD45RO^+$ ，圖31C)及效應($CD27^-$ ，圖31D)子集。小鼠VISTA與人類VISTA對人類CD4 T細胞之比較展示VISTA具跨物種之交叉反應性。在不同濃度OKT3上人類VISTA-Ig及小鼠VISTA-Ig之滴定展示較高濃度之OKT3可由較高濃度之VISTA克服(圖32A及圖32B)。

為了得到對抑制機制之一些瞭解，在活化之後在存在或不存在VISTA-Ig情況下檢查細胞狀態。在2天培養期間，早期活化標誌物CD25及CD69利用抗CD3之上調由VISTA-Ig阻斷(圖33A及圖33B)。類似地，在5天培養之後，防止指示抗原經歷之自CD45RA表現變換至CD45RO(圖33C)。VISTA對細胞生存力不具有影響。與增殖中之阻斷一致，用VISTA-Ig處理之細胞具有正向及側向散射概況，與未受刺激之細胞而非在單獨OKT3情況下所見之母細胞類似。為了測定由VISTA誘導之抑制是否穩定，將細胞在抗CD3及VISTA-Ig上培養兩天，隨後移至單獨抗CD3上培養3天。此進一步刺激不能挽救抑制，

如圖34A及圖34B中所示。

接著，檢查VISTA-Ig對細胞激素產生之作用。細胞在遞增量之VISTA-Ig存在下用結合盤之OKT3刺激5天，隨後利用細胞學珠粒陣列量測培養物上清液中之各種細胞激素之濃度。僅偵測到痕量級IL-2、IL-4或IL-6(<5 pg/ml)且未觀察到差異。然而，VISTA-Ig明顯減少CD4(圖35A)及CD8(圖35B)T細胞產生IL-10、TNF α 及IFN γ ，且存在IL-17產生適當減少之傾向。

亦檢查能夠克服T細胞之VISTA誘導之抑制之因子。抗CD28促效抗體提供對T細胞之強力協同刺激，且因此滴定至培養物中以攻擊VISTA抑制(圖36A至圖36C)。儘管較低量之抗CD28不能克服VISTA，但當抗CD28以1 μ g/ml之塗佈濃度包括在內時，VISTA不能阻斷增殖。類似地，雖然較低濃度之VISTA可藉由添加諸如IL-2、IL-7及IL-15之細胞激素來克服，但較高濃度之VISTA即使在50 ng/ml之生理學上較高濃度細胞激素情況下仍然具抑制性。

實例32

CFSE CD4⁺ T細胞增殖分析中VISTA-IG結合物對健康個體及狼瘡個體之CD4⁺ T細胞增殖之作用

實驗方案中所用材料

所需試劑：

1. Corning® 96孔EIA/RIA透明平底帶蓋聚苯乙烯高結合微盤，帶蓋，無菌(產品#3361)。
2. BioXCell，抗人類CD3，目錄號：BE0001-2，純系：OKT3，物種：小鼠IgG2a
3. R&D，重組人類IgG1 Fc(對照Ig)，CF，人類IgG1，目錄號：110-HG-100
4. 泛T細胞分離套組II，目錄號：130-091-156

5. Invitrogen, LIVE/DEAD®可固定之紫色死細胞染色套組, 供405 nm激發用, 目錄號: L34955

6. Sigma, Histopaque-1077, 無菌過濾, 密度: 1.077 g/mL, 目錄號: 10771-500ML

7. Cellgro, RPM11640, 目錄號: 10-040-CV, 10%熱滅活之FBS/青黴素/鏈黴素/50 μ M 2-ME,

1. 胎牛血清: HyClone, 目錄號: SH30910.03

1. BD Cytofix, 固定緩衝液, 目錄號: 554655

8. Cellgro, 磷酸鹽緩衝鹽水(PBS), 1 $\times$, 無菌不具有鈣及鎂, 目錄號: 21-040-CV

9. Polysciences, 甲醛, 目錄號: 04018。

10. Sigma, 人類Ig, 目錄號: G4386-1G, 以1.25 mg/ml之最終濃度使用。

11. Invitrogen, CellTrace CFSE細胞增殖套組-供流動式細胞測量術用, 目錄號: C34554

12. 人類VISTA-Ig(批號100912, 來自Freestyle CHO)

實驗方案

在第-1天, 96孔平坦盤每孔用含抗CD3(純系OKT3 2.5 mg/ml)+對照Ig或VISTA Ig(10 mg/ml)之100 ml PBS塗佈。盤在4°C下培育隔夜或在37°C下培育3小時。

在第0天: 根據Miltenyi Biotec之說明書分離人類CD4⁺ T細胞, 且用CFSE標記細胞。將細胞以200,000個細胞/孔接種於經塗佈之96孔盤中。

在第3天至第4天, 收集細胞且藉由CFSE標記利用流動式細胞測量術分析, 從而測定CD4⁺細胞之增殖程度。特定言之, 利用圖37中所含之流動式閘選策略進行流動式細胞測量術。

似結果(資料未展示)。

如圖41A至圖41D中所示，對在小鼠害病時或在30週齡時自接受實驗VISTA-IgG2a或對照IgG2a之2隻NZBW F1(BW)及3隻NZM小鼠採集之腎臟切片進行蘇木精及曙紅(H&E)染色。BW在8週齡時開始治療，且NZM在24週齡(疾病發作很久以後)時開始治療。來自所有5隻經VISTA-IgG2a治療之小鼠之切片展示最低至輕度絲球體腎炎，無間質疾病，且無腎小球疤痕(圖40B)。相比之下，來自接受對照IgG2a之所有5隻小鼠之切片具有嚴重增生性絲球體腎炎之跡象，其中3/5展示顯著疤痕，包括患有末期腎病且所有腎小球均閉塞之1者。(圖41C、圖41D)。亦在2/5小鼠中看到間質發炎。(資料未展示)。總IgG dsDNA效價之大體評估並不指示VISTA-Ig治療之任何影響；然而，現清楚的是，此鼠類模型中之一些自身特異性係來源於長壽漿細胞且一些來自短壽漿細胞。因此，需要評估VISTA-Ig對抗SLE抗體之所有同型之影響之較澈底分析及該等抗體之精確特異性，隨後推斷出VISTA-Ig對抗elf抗體效價具有什麼影響。如先前所述，用抗CD40L(其對dsDNA抗體效價不具有影響)較晚治療BW及NZM小鼠亦可改善疾病。因此，抗CD40L及VISTA-Ig可代之以調節其他過程，諸如在腎臟層面上之過量T細胞介導之發炎及組織損傷。重要的是，與機制無關，此等初步結果指示VISTA-Ig治療亦以治療學方式起作用，其中與IgG2a對照治療之動物相比，自24週開始投與引起蛋白尿含量減少及腎小球損傷減少。因此，VISTA-Ig可消除所建立之疾病中之進行性免疫介導之損傷(一種對於治療人類SLE明顯較相關之作用)。

如圖60中之實驗中所示，自NZBWF1小鼠中收集全血，該等小鼠年齡為20週，用每隔一天投與之PBS、150 µg對照IgG2a、mVISTA-IgG2a治療。全血用螢光結合之抗體染色以鑑別(a)發炎單核細胞及(b)T細胞之存在及數目，且利用流動式細胞測量分析測定細胞群體。

圖式中之結果指示治療並不改變發炎單核細胞及T細胞之細胞頻率。

如圖61中之實驗中所示，在用VISTA-IgG2a治療之20週NZBWF1小鼠之血液中進一步偵測IL-17含量。結果展示該治療減少發炎細胞激素之表現。

如圖62及圖63中之實驗中所示，亦比較用對照IgG2a或VISTA-IgG2a治療之24週齡NZBWF1小鼠之細胞激素概況。結果指示用VISTA-IgG2a治療以與其中發炎反應減少一致之方式減少或影響與發炎相關之細胞激素(包括IL-2、IL-10、CXCL1、IL-5、IL-4、IL-12及IL-1- β)之表現。相形之下，ds DNA抗體含量在統計學上未受影響(結果未展示)。

結果指示VISTA-Ig治療性地干涉SLE，且不影響抗體含量或免疫複合物沈積，指示其經由非B細胞機制干涉。更確切而言，VISTA-Ig增強Treg特徵，且減少腎臟中之T細胞細胞激素，指示對T細胞活化之直接影響。此外，結果揭露VISTA-Ig投與深度減少腎臟中之骨髓浸潤(其應引起疾病解決)。

因此，基於前述，VISTA-Ig融合蛋白質可用作發炎或自體免疫或過敏之負向調節因子。如所示，該等多肽可明顯減少CD4⁺及CD8⁺T細胞產生IL-10、TNF α 及IFN γ 。此舉又應引起免疫反應之治療學下調且提供自體免疫、過敏或發炎病症之緩解。

實例35

VISTA-Ig在治療諸如哮喘之呼吸病症中之用途

調節性T細胞及耐受：表現CD4 Foxp3之Treg為經最佳表徵之Treg子集且對於維持對自身及外來抗原兩者之耐受必不可少。具有Foxp3突變之患者可表現過敏症狀⁷且來自哮喘氣管之Foxp3⁺ Treg之抑制性活性受損⁶。T細胞中誘導Foxp3之轉錄程式賦予抑制相鄰T細胞及抗原呈現細胞(APC)活化之能力。表現Foxp3之Treg亦可在TGF- β

及IL-2存在下自原態周邊CD4⁺ T細胞誘導，且此誘導由全反式視黃酸(ATRA)進一步增強⁸。自周邊CD4⁺ T細胞誘導消化道中之Foxp3⁺ Treg視TGF- β 及視黃酸之產生而定⁹。產生IL-10之Treg(具有Foxp3⁺或Foxp3-表型)之重要作用亦已在呼吸耐受中確立^{10,11,12}。因此，擴增Treg數目、增加其對過敏原之特異性或恢復其在肺組織中之抑制性活性之新穎策略持有作為哮喘中潛在的疾病修改之免疫療法的巨大希望。

本發明者已發展一系列過敏性肺發炎及耐受之鼠類模型，且展示在過敏性敏化之後，CD4反應由混合之Th2+Th17反應組成¹³。過敏性敏化及耐受誘導均伴隨有肺組織而非引流淋巴結中總Foxp3⁺ CD4群體之增加(圖49)。然而，GARP(一種功能上相關的Treg活化標誌物¹⁴)之表現在肺及淋巴結兩者中上調(圖49)。吸引人的是，黏膜組織中之Treg回應於耐受小鼠中之過敏原而增殖，但在存在發炎時未能增殖(圖50)。發炎肺中此Treg之「癱瘓」狀態與Helios表現較低相關(圖51)。Helios為轉錄因子，其結合至Foxp3啟動子上，且可能與Treg活性有關¹⁵。另外，耐受而非敏化動物中展示產生IL-10及IFN- γ 之T細胞之激活。

使用VISTA之單株抗體，吾人已展示肺泡巨噬細胞與肺中其他細胞類型(包括肺DC及間質巨噬細胞)相比具有細胞表面VISTA之異常較高基線表現(圖52)。此結果提示氣管內之獨特的環境維持肺泡巨噬細胞上之較高VISTA表現，其已知為抑制性的。在耐受及發炎兩者情形下，吸入過敏原進一步增加氣管巨噬細胞上VISTA之表現，提示免疫激發形成促進負向信號傳遞進入T細胞之環境，該環境可預防發炎。與肺泡巨噬細胞相比，氣管淋巴細胞表現低得多的VISTA含量。淋巴細胞VISTA表現在耐受期間增加，且在由過敏原觸發之發炎期間較少(圖52)。然而，在上皮功能調節異常時，在慢性過敏原激發之後

VISTA之表現模式及VISTA在呼吸耐受中之功能作用尚未知。本發明者已展示VISTA可促進原態CD4 T細胞轉化成Foxp3⁺ Treg，指示VISTA在周邊耐受機制中之重要作用(圖53)。

因此，基於前述，由於VISTA為對肺中吸入式抗原及微生物物質之免疫性之關鍵檢查點調節因子，故VISTA中和在過敏原吸入之後應當緩和過敏原敏化、T細胞子集發展及肺部發炎。

此外，VISTA-Ig應當在呼吸耐受誘導期間調節調節性T細胞之發展、分化及活性，且應當影響肺泡巨噬細胞、肺DC、T細胞及調節性T細胞且緩和呼吸耐受性。

在哮喘肺中，免疫性之Th2及Th17組分主要介導慢性發炎，而Th1及Treg反應抑制過敏且促進耐受。認為肺之發炎減少上皮細胞之障壁功能且促進對多個過敏原之過敏性敏化。

哮喘動物模型：在耐受誘導期間VISTA活性之中和。

吾人資料指示VISTA強烈表現於肺中(特定言之肺泡巨噬細胞上，該等肺泡巨噬細胞為首先遭遇吸入式物質之細胞)，且在呼吸耐受及發炎期間上調。為了證實VISTA-Ig在治療哮喘中之潛力，藉由用4劑50 µg OVA鼻內攻擊而使C57BL/6小鼠變得對吸入式OVA耐受¹³。持續耐受之發展藉由以下方式證實，2週後用OVA+TNF-α(1 µg)黏膜敏化動物，隨後用OVA再攻擊，且評估氣管中之發炎細胞，且藉由細胞內細胞激素分析表徵T細胞子集。

為了測定VISTA在耐受誘導中之作用，隨後，在用300 µg抗VISTA 13F3中和抗體(腹膜內每隔一天)或對照IgG治療的同時，小鼠組(n = 6)將用OVA同時耐受。在抗VISTA治療之後，評估活性耐受之發展及過敏原反應性Foxp3⁺ Treg、分泌IL-10之T細胞之存在以及Treg上的Helios及GARP表現。隨後將如上測定活性耐受之發展。為了測定VISTA中和是否可打破預建立之耐受，在耐受2週後開始用抗

VISTA或對照IgG治療經耐受之動物，且伴隨反覆OVA鼻內攻擊(每週3次)。在2週氣管發炎之後，測定肺Th1/2/17 CD4細胞及調節性T細胞反應。VISTA在控制氣管過度反應中之作用藉由以下方式測定：如先前所述，反覆OVA攻擊對照或抗VISTA治療之動物，隨後，在霧化乙醯甲膽鹼吸入之後量測肺抗性及順應性。

VISTA-/-小鼠中氣管內穩定之表徵。

如吾人實驗室中常規進行，利用BAL細胞之流動式細胞測量術，測定未經治療之C57BL/6-VISTA-/-小鼠及年齡匹配對照、VISTA+/-仔畜中測定氣管及肺巨噬細胞/DC、T細胞、嗜中性白血球、嗜伊紅血球及B細胞之數目¹⁶。藉由多色流動式細胞測量術評估各種氣管細胞群體上之MHC II類、CD80/86、CD40、抑制性受體CD200R及PD-1以及VISTA之表面表現。BAL上清液中細胞激素之靜息程度利用Luminex細胞激素珠粒陣列測定。接著，將在用LPS(1 µg/ml)+IFN-(50 ng/ml)刺激24小時後，測定來自由VISTA-/-及對照BAL純化之肺泡巨噬細胞之細胞激素之誘導性分泌。呼吸上皮細胞之障壁功能藉由鼻內滴注標記OVA-Alexa488之過敏原來測定，6小時後利用灌洗、提取肺組織細胞及流動式細胞測量術追蹤組織常駐細胞對過敏原之吸收。發炎事件對肺內穩定之擾動引起跨越上皮細胞之過敏原吸收增加。

使用2種過敏性氣管疾病模型(i)如上所述用OVA±TNF- α 鼻內黏膜敏化，隨後用50 µg OVA反覆攻擊，及(ii)用房屋塵蟎(HDM，Allergon，25 µg鼻內，每週3次反覆處理，如所述¹⁷。HDM具有固有佐劑活性且為在英國中之哮喘中觀察到之最顯著的敏化，因此可代表臨床上較相關的模型。然而，難以探查所誘導之反應之過敏原特異性。使用兩種模型在VISTA-/-及對照仔畜中誘導急性過敏性氣管發炎，且如所述測定氣管中發炎細胞之浸潤及肺T細胞細胞激素概況。氣管過度反應藉由如先前之肺功能測試評估。循環IgE、IgG1、IgG2a

及IgA血清反應之發展藉由如吾人實驗室中常規所用之過敏原特異性Ig ELISA或總IgE ELISA量測。亦將測定BAL流體IgA含量。最後，吾人將測定VISTA是否下調氣管重塑，該氣管重塑在小鼠之慢性過敏原攻擊之後在AHR及發炎與疾病之急性期相比減少時出現。如上敏化VISTA^{-/-}或對照小鼠，但鼻內攻擊將持續5週。如先前般測定氣管發炎，且利用組織學針對氣管壁增厚、膠原蛋白沈積及平滑肌細胞增生分析肺切片。

VISTA在肺中界定之白血球子集中之調節性作用。

吾人當前開發新的小鼠品系，其中VISTA在造血細胞之界定譜系中有條件地缺失。作為另一研究之一部分，VISTA對T細胞增殖反應中不同細胞類型之作用、Treg之抑制性活性及Th1、Th2、Th17及CD8 T細胞之分化的詳細表徵正在進行。初步資料指示Foxp3⁺ Treg表現之VISTA有助於其抑制性活性。VISTA^{flox/flox}小鼠與表現Cre重組酶之動物在以下譜系特異性啟動子下雜交：Lck、CD11c、LyzM及Foxp3，以便使突變分別靶向CD4及CD8 T細胞、DC、骨髓細胞及Foxp3⁺ Treg。如以上在VISTA^{-/-}動物中所測定針對靜息氣管群體中之任何異常及如前所述針對有缺陷的呼吸耐受，測試來自所得群落之經PCR篩選之子代。接著，將使用VISTA-Ig融合體針對呼吸耐受誘導測試此等組。

過敏性氣管疾病中VISTA路徑之治療性靶向。

呈可溶形式之VISTA-Ig融合蛋白質活體外並無抑制性，但在結合至塑膠時抑制T細胞反應⁶。由於可溶性VISTA-Ig缺乏FcR之結合域，故其並不結合至APC上或在活體內發揮抑制作用。因此，在分別資助之項目中，吾人使用表現於大腸桿菌中、再摺疊且自包涵體純化之構築體來開發VISTA胞外域之非共價寡聚物。在T細胞增殖及Treg分化分析中針對免疫抑制活性測試VISTA之四聚體、五聚體或七聚

體。在此等試劑變得可獲得時，吾人將測試靶向VISTA路徑以用於治療性介入術為哮喘是否可行。如上所述在C57BL/6小鼠中誘導急性過敏性氣管發炎，且與過敏原攻擊一起，動物組用5 µg至100 µg所選VISTA寡聚物(或VISTA-Ig作為陰性對照)鼻內治療。測定氣管發炎及Treg介導之致耐受反應。若VISTA寡聚物抑制發炎或誘導耐受，則進行氣管過度反應及HDM誘導之發炎之進一步研究。最後，吾人將延遲VISTA-寡聚物治療直至在疾病之急性期之後，從而測定該療法是否可化解所建立之發炎。VISTA寡聚物與過敏原攻擊一起給予直至慢性期為止，且在對照及VISTA靶向之小鼠中評估氣管發炎及重塑。

實例36

VISTA對信號傳導路徑之作用。

進行實驗以評估VISTA對TCR誘導之ERK及其他信號傳導路徑分子之作用。進行此等實驗，因為某些信號傳導路徑之調節已應用於治療癌症及自體免疫疾病。舉例而言，用於治療CML之伊馬替尼(Imatinib)由於其對影響癌症之信號傳導路徑之影響而為臨床上有效之抗體之說明性實例。

在此等實驗中，24孔盤用2.5微克/孔抗CD3抗體(2C11)加上10 µg對照IgG或VISTA-Ig(1:4比率)塗佈，且將孔在40℃下培育隔夜。接著在37℃下用經血清饑餓之經純化之鼠類CD4⁺ T細胞刺激孔多次。

收集細胞，且在給定時間點下經由西方墨點針對TCR信號傳導路徑中之經磷酸化之蛋白質評估對TCR信號級聯之影響，該等蛋白質包括 Fyn、Lck、ZAP70、LAT、GRB2、Vav、Ras、P38、JNK、ERK1/2。此等實驗示意性描繪於圖54中。

圖55中之墨點展示在CD3刺激之後在不同時間點下pErk含量(無VISTA-Ig或對照IgG：活化時程)。負載對照含於圖56中。

如由圖57中資料所示，VISTA抑制ERK1/2活化。相形之下，如

結果

如圖59(A)及圖59(B)中所示，所測試之重組人類VISTA-Ig及小鼠VISTA-Ig融合蛋白質均實質上抑制人類及小鼠混合淋巴細胞反應(MLR)兩者。圖式中之結果指示所測試之重組人類VISTA-Ig融合蛋白質與重組小鼠VISTA-Ig融合蛋白質相比在抑制小鼠MLR方面較強力(B中實驗)。相形之下，小鼠VISTA-Ig融合蛋白質與小鼠MLR相比在抑制人類MLR方面較強力。此等結果進一步提示VISTA-Ig應較適合治療或預防有需要之個體之過敏性反應。

本發明及例示性實施例已經充分描述，本發明由隨附申請專利範圍進一步界定。

【符號說明】

無

申請專利範圍

1. 一種經分離或重組之VISTA-Ig融合蛋白質，其包含以下：
 - (i)一個以上VISTA多肽，其各自包含人類或鼠類VISTA之整個胞外區，該人類或鼠類VISTA之整個胞外區分別由SEQ ID NO: 4及2之多肽所組成；
 - (ii)至少一個連接肽，其長度係至少15個胺基酸，且其中該連接肽之殘基之至少80%包含甘胺酸及絲胺酸殘基；及
 - (iii)至少一個Ig Fc區，其中該連接肽介於該VISTA多肽(i)與Ig Fc區之間，且與缺乏該連接肽但在其他方面均相同之VISTA-Ig融合蛋白質相比，該VISTA-Ig融合蛋白質活體內誘發的免疫抑制活性更強。
2. 如請求項1之經分離或重組之VISTA-Ig融合蛋白質，其中該連接肽包含至少16、17、18、19、20、21、22、23、24或25個胺基酸殘基。
3. 如請求項1之經分離或重組之VISTA-Ig融合蛋白質，其中該連接肽包含至少19個胺基酸殘基。
4. 如請求項1之經分離或重組之VISTA-Ig融合蛋白質，其中該連接肽包含GTSGSSGSGSGGSGSGGGG (SEQ ID NO:71)。
5. 如請求項1之經分離或重組之VISTA-Ig融合蛋白質，其中該Ig Fc區包含IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc區。
6. 如請求項1之經分離或重組之VISTA-Ig融合蛋白質，其中該人類或鼠類VISTA之胞外區係連接至寡聚合域之N端上，該寡聚合域選自GCN4、COMP、SNARE、CMP、MAT、含有LLR之1 NLRC、NOD2核苷酸結合NLRC2、含有LRR之1 NLRC、NOD2核苷酸結合NLRC2及PSORAS1。

7. 如請求項1之經分離或重組之VISTA-Ig融合蛋白質，其中該Ig Fc區包含增加或減少補體結合及/或FcR結合或減少或消除FcR結合之一或多個修飾，或增加FcR結合之一或多個修飾；或增加、減少或改變糖基化或效應功能或者減少或消除FcR結合之一或多個修飾。
8. 如請求項1之經分離或重組之VISTA-Ig融合蛋白質，其中該Ig Fc區包含消除或減少FcR結合或補體結合之一或多個修飾。
9. 一種醫藥學上可接受之組合物，其含有治療有效量之如請求項1至8中任一項之VISTA-Ig融合蛋白質，其適用於人類療法。
10. 如請求項9之醫藥學上可接受之組合物，其進一步包含另一種免疫調節劑，其係選自PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA4或ICOS蛋白質，或對上述具有特異性之抗體。
11. 如請求項9之醫藥學上可接受之組合物，其可藉由選自以下之途徑投與：非經腸、靜脈內、皮下、經皮、經口、肌肉內、陰道內、頰內、肛門及經鼻。
12. 一種如請求項1至8中任一項之VISTA-Ig融合蛋白質之用途，其係用於製備治療自體免疫、發炎或過敏疾病之組合物。