(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103119054 B
(45)授权公告日 2017.01.18

(21)申请号 201180025788.6

(22)申请日 2011.03.25

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103119054 A

(43)申请公布日 2013.05.22

(30)优先权数据
12/732,371 2010.03.26 US
61/390,434 2010.10.06 US
61/436,379 2011.01.26 US
61/449,882 2011.03.07 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2012.11.26

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2011/030087 2011.03.25

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2011/120013 EN 2011.09.29

(73)专利权人 达特茅斯大学理事会
地址 美国新罕布什尔州

(72)发明人 R·J·诺雷 L·王

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 李程达

(51)Int.Cl.
C07K 14/47(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)
C07K 16/18(2006.01)
A61K 38/17(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 37/00(2006.01)
A61P 19/02(2006.01)

(56)对比文件
WO 2010/027827 A2,2010.03.11,
WO 2010/027827 A2,2010.03.11,
WO 2006/012232 A1,2006.02.02,
US 2006/0084082 A1,2006.04.20,
CA 2383456 A1,2001.03.01,
CN 1753912 A,2006.03.29,
WO 02/079449 A1,2002.10.10,
Li Wang et.al.VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses.《The Journal of Experimental Medicine》.2011,第208卷(第3期),第586页右栏DISCUSSION部分.

审查员 王佳妹

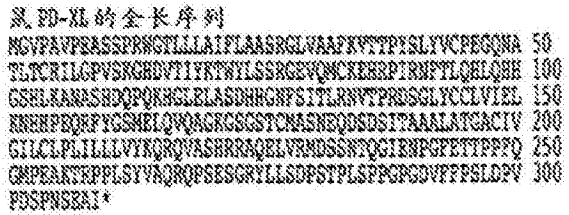
权利要求书2页 说明书79页
序列表10页 附图38页

(54)发明名称

VISTA调节性T细胞介体蛋白、VISTA结合剂及其用途

(57)摘要

本发明涉及一种新型调节性T细胞蛋白。这种名为PD-L3ORVISTA的蛋白类似于PD-L1家族的成员,表示了一种新型的且结构不同的Ig超家族抑制性配体,其胞外域具有与B7家族配体PD-L1的同源性。此分子被称为PD-L3OR VISTA或T细胞活化的V结构域免疫球蛋白抑制剂(VISTA)。VISTA的表达主要位于造血室内,且在骨髓APC和T细胞上受高度调节。VISTA抑制性途径的治疗性干预提出了一种调节T细胞介导的免疫以治疗多种癌症例如卵巢癌、膀胱癌和黑素瘤的新方法。另外,VISTA蛋白,特别是多聚体VISTA蛋白和抗体可用于抑制自身免疫疾病、过敏、感染和炎性病症例如多发性硬化和关节病症诸如RA中的T细胞免疫。



CN 103119054 B

1.包含分离的或重组的VISTA多肽或VISTA融合蛋白的VISTA激动剂在制备用于抑制具有自身免疫、过敏或炎性病症的受试者中的T细胞免疫的药物中的用途，所述分离的或重组的VISTA多肽包含至少一个分离的或重组的VISTA多肽，并且其中所述VISTA融合蛋白包含与异源多肽融合的至少一个分离的或重组的VISTA多肽，并且其中所述分离的或重组的VISTA多肽和所述VISTA融合蛋白各包含至少一个由SEQ ID NO:1或3的核苷酸序列编码的VISTA多肽的胞外域，其中所述VISTA是指:T细胞活化的V结构域免疫球蛋白抑制剂。

2.根据权利要求1所述的用途，其中所述分离的或重组的VISTA多肽或VISTA融合蛋白还包含由SEQ ID NO:1或3编码的VISTA多肽的下列至少一个结构域:信号肽结构域、IgV结构域、跨膜域或胞质域。

3.根据权利要求1所述的用途，其中所述分离的或重组的VISTA多肽或VISTA融合蛋白结合到抗原呈递细胞上的Fc受体。

4.根据权利要求1所述的用途，其中所述VISTA融合蛋白中的异源多肽是免疫球蛋白多肽。

5.根据权利要求4所述的用途，其中所述异源多肽是人免疫球蛋白多肽。

6.根据权利要求5所述的用途，其中所述免疫球蛋白多肽包含恒定区。

7.根据权利要求5所述的用途，其中所述免疫球蛋白多肽包含Fc区。

8.根据权利要求5所述的用途，其中所述免疫球蛋白多肽是包含降低或消除效应子活性的遗传修饰的恒定区。

9.根据前述权利要求的任一项所述的用途，其中所述VISTA激动剂抑制CD4+或CD8+T细胞活性、CD4+或CD8+T细胞增殖或T细胞的细胞因子产生。

10.根据权利要求1-8任一项所述的用途，其用于治疗过敏病症。

11.根据权利要求1-8任一项所述的用途，其用于治疗自身免疫病症。

12.根据权利要求1-8任一项所述的用途，其用于治疗炎性病症。

13.根据权利要求1-8任一项所述的用途，其用于治疗的病症选自1型糖尿病、多发性硬化、类风湿性关节炎、银屑病性关节炎、系统性红斑狼疮、风湿性疾病、过敏症、哮喘、过敏性鼻炎、皮肤病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、移植排斥、链球菌感染后和自身免疫性肾衰竭、移植物抗宿主病、败血性休克、全身炎症反应综合征(SIRS)、成人呼吸窘迫综合征(ARDS)和毒液螯入;自身炎症性疾病、炎性肠病、哮喘、骨关节炎、结晶性关节炎、囊炎、关节病、肌腱炎、韧带炎和创伤性关节损伤。

14.根据权利要求1-8任一项所述的用途，其用于治疗多发性硬化。

15.根据权利要求1-8任一项所述的用途，其用于治疗SLE。

16.根据权利要求1-8任一项所述的用途，其用于诱导免疫耐受。

17.根据权利要求1-8任一项所述的用途，其用于治疗移植。

18.根据权利要求1-8任一项所述的用途，其中将所述VISTA多肽或融合蛋白与阻断免疫细胞上协同刺激受体活性和下调免疫应答的试剂组合使用。

19.根据权利要求18所述的用途，其中所述阻断免疫细胞上协同刺激受体活性和下调免疫应答的试剂包含PD配体的激动剂、可溶形式的CTLA-4、抗B7-1抗体、抗B7-2抗体或它们的组合。

20.根据权利要求1-8任一项所述的用途，其中将所述分离的或重组的VISTA多肽或

VISTA融合蛋白与下列至少一项组合使用:阻断协同刺激信号的抗体、通过CTLA4活化抑制性信号的抗体和/或针对除CTLA4和VISTA以外的免疫细胞标志物的抗体、融合蛋白以及免疫抑制药物。

21.根据权利要求1-8任一项所述的用途,其中将所述分离的或重组的VISTA多肽或VISTA融合蛋白与下列一项或多项组合使用:阻断CD28或ICOS引发的协同刺激信号的抗体,针对CD40、CD40配体、细胞因子的抗体,CTLA4-Fc,PD-1-Fc,雷帕霉素,环孢霉素A或FK506。

22.权利要求1-8任一项所述的用途,其中所述分离的或重组的VISTA多肽或VISTA融合蛋白具有一个以上拷贝的由SEQ ID NO:1或3的核苷酸序列编码的VISTA多肽的胞外域。

VISTA调节性T细胞介体蛋白、VISTA结合剂及其用途

[0001] 简介

[0002] 本专利申请要求2010年3月26日提交的美国专利序列No.12/732,371、2010年10月6日提交的美国临时申请No.61/390,434、2011年1月26日提交的美国临时申请No.61/436,379以及2011年3月7日提交的美国临时申请No.61/449,882的优先权。所有这些专利申请均以应用方式全文并入本文。

[0003] 本专利申请涉及我们发现、表征及确定了功能的新型、造血限制性、结构不同的Ig超家族抑制性配体，被称为T细胞活化的V区含免疫球蛋白抑制剂(VISTA)或PD-L3。其胞外域具有与B7家族配体PD-L1的同源性，并且像PD-L1一样，VISTA对免疫具有深刻的影响。然而，不同于PD-L1的是，VISTA的表达仅位于造血室内。表达最常见于骨髓抗原呈递细胞(APC)，但是在CD4+T细胞上和Foxp3+调节性T细胞(Treg)亚群上的表达也具有重要意义。可溶性VISTA-Ig融合蛋白或APC上的VISTA表达强效抑制体外T细胞增殖、细胞因子产生并诱导T细胞中的Foxp3表达。相反，新开发的抗VISTA单克隆抗体在体外通过VISTA+APC干扰T细胞应答的VISTA诱导型免疫抑制。此外，体内抗VISTA加强了T细胞介导的自身免疫疾病实验性过敏性脑脊髓炎(EAE)的发展，并促进保护性肿瘤特异性免疫应答的发展，继而缓解肿瘤。VISTA-/-小鼠的初步研究正在揭露自发性炎性疾病的早期征象，并将确定它们的最终病理学命运。不同于所有其他PD配体相关分子(如B7-H3、H4、H6)，VISTA的造血限制与其充分的抑制活性和独特的结构特征一起表明VISTA是一种新型、功能非冗余的核心的免疫负调节因子，其表达主要限制在骨髓。

[0004] 发明背景

[0005] 诱导免疫应答需要T细胞扩增、分化、收缩和建立T细胞记忆。T细胞必需遇到抗原呈递细胞(APC)，并通过APC上的T细胞受体(TCR)/主要组织相容性复合体(MHC)相互作用而通信。建立起TCR/MHC相互作用后，需要T细胞与APC之间其他组的受体-配体接触，即，通过CD154/CD40和CD28/B7.1-B7.2协同刺激。已表明，这些接触之间的协同作用会在体内导致能够清除病原体和肿瘤并在一些情况下能够诱导自身免疫的富有成效的免疫应答。

[0006] 已经鉴定了另一控制水平，即调节性T细胞(Treg)。T细胞的该特定亚群在胸腺中生成、传递到外周，并且能够在体外和体内恒定地和可诱导地控制T细胞应答(Sakaguchi(2000)Cell 101(5):455-8;Shevach(2000)Annu.Rev.Immunol.18:423-49;Bluestone和Abbas(2003)Nat.Rev.Immunol.3(3):253-7)。Treg由CD4+CD25+表型表现，还表达高水平的细胞毒性T淋巴细胞相关抗原-4(CTLA-4)、OX-40、4-1BB和糖皮质激素诱导型TNF受体相关蛋白(GITR)(McHugh,等(2002)Immunity 16(2):311-23;Shimizu,等(2002)Nat.Immun.3(2):135-42)。通过5天新生儿胸腺切除术或使用抗CD25去除抗体而消除Treg细胞，导致诱导自身免疫病变以及加剧T细胞对外源和自体抗原的应答，包括提高的抗肿瘤应答(Sakaguchi,等(1985)J.Exp.Med.161(1):72-87;Sakaguchi,等(1995)J.Immunol.155(3):1151-64;Jones,等(2002)Cancer Immun.2:1)。此外，Treg还牵涉在了移植耐受的诱导和维持中(Hara,等(2001)J.Immunol.166(6):3789-3796;Wood和Sakaguchi(2003)Nat.Rev.Immunol.3:199-210)，因为用抗CD25单克隆抗体去除Treg导致移植耐受的消除以

及快速移植排斥(Jarvinen,等(2003)Transplantation 76:1375-9)。在通过Treg表达的受体中,GITR似乎是一种重要的成分,因为在体外或体内用激动性单克隆抗体连接Treg表面上的GITR导致Treg活性的快速终止(McHugh,等(2002)同上;Shimizu,等(2002)同上),还导致自身免疫病变(Shimizu,等(2002)同上)和移植耐受的消除。

[0007] 协同刺激和协同抑制性配体与受体不仅提供T细胞活化的"第二信号",还提供正负信号的平衡网络,从而最大化针对感染的免疫应答,同时限制自身免疫。得到最清楚表征的协同刺激配体为B7.1和B7.2,它们由专职性APC表达,并且其受体为CD28和CTLA-4(Greenwald,R.J.,Freeman,G.J.,和Sharpe,A.H.(2005).AnnuRev Immunol 23,515-548;Sharpe,A.H.,和Freeman,G.J.(2002)NatRev Immunol 2,116-126)。CD28由首次接触试验的和活化的T细胞表达,且对最佳的T细胞活化起着关键作用。相比之下,CTLA-4在T细胞活化时诱导,并通过结合到B7.1/B7.2而抑制T细胞活化,从而损害CD28-介导的协同刺激。CTLA-4还通过其胞质ITIM基序而转导负信号(Teft,W.A.,Kirchhof,M.G.,和Madrenas,J.(2006).Annu RevImmunol 24,65-97;Teft,W.A.,Kirchhof,M.G.,和Madrenas,J.(2006).Annu Rev Immunol 24,65-97)。B7.1/B7.2敲除小鼠在适应性免疫应答中受损(Borriello,F.,Sethna,P.,Boyd,S.D.,Schweitzer,A.N.,Tivol,E.A.,Jacoby,D.,Strom,T.B.,Simpson,E.M.,Freeman,G.J.,和Sharpe,A.H.(1997))Immunity 6,303-313;Freeman,G.J.,Borriello,F.,Hodes,R.J.,Reiser,H.,Hathcock,K.S.,Laszlo,G.,McKnight,A.J.,Kim,J.,Du,L.,Lombard,D.B.,等(1993).Science 262,907-909),而CTLA-4敲除小鼠无法充分控制炎症并发展出系统性自身免疫疾病(Chambers,C.A.,Sullivan,T.J.,和Allison,J.P.(1997)Immunity 7,885-895;Tivol,E.A.,Borriello,F.,Schweitzer,A.N.,Lynch,W.P.,Bluestone,J.A.,和Sharpe,A.H.(1995)Immunity 3,541-547;Waterhouse,P.,Penninger,J.M.,Timms,E.,Wakeham,A.,Shahinian,A.,Lee,K.P.,Thompson,C B.,Griesser,H.,和Mak,T.W.(1995).Science 270,985-988)。

[0008] B7家族配体已扩展到包括协同刺激性B7-H2(ICOS配体)和B7-H3以及协同抑制性B7-H1(PD-L1)、B7-DC(PD-L2)、B7-H4(B7S1或B7x)和B7-H6(Brandt,C.S.,Baratin,M.,Yi,E.C.,Kennedy,J.,Gao,Z.,Fox,B.,Haldeman,B.,Ostrander,C.D.,Kaifu,T.,Chabannon,C.,等(2009)J Exp Med 206,1495-1503;Greenwald,R.J.,Freeman,G.J.,和Sharpe,A.H.(2005)Annu Rev Immunol 23,515-548)。

[0009] 可诱导协同刺激(ICOS)分子在活化的T细胞上表达并结合到B7-H2(Yoshinaga,S.K.,Whoriskey,J.S.,Khare,S.D.,Sarmiento,U.,Guo,J.,Horan,T.,Shih,G.,Zhang,M.,Coccia,M.A.,Kohno,T.,等(1999).Nature 402,827-832)。ICOS对T细胞活化、分化及功能起着重要意义,对T-辅助细胞诱导的B细胞活化、Ig类别转换以及生发中心(GC)形成必不可少(Dong,C.,Juedes,A.E.,Temann,U.A.,Shresta,S.,Allison,J.P.,Ruddle,N.H.,和Flavell,R.A.(2001)Nature 409,97-101;Tafuri,A.,Shahinian,A.,Bladt,F.,Yoshinaga,S.K.,Jordana,M.,Wakeham,A.,Boucher,L.M.,Bouchard,D.,Chan,V.S.,Duncan,G.,等(2001)Nature 409,105-109;Yoshinaga,S.K.,Whoriskey,J.S.,Khare,S.D.,Sarmiento,U.,Guo,J.,Horan,T.,Shih,G.,Zhang,M.,Coccia,M.A.,Kohno,T.,等(1999)Nature 402,827-832)。在另一方面,程序性死亡1(PD-1)负调节T细胞应答。PD-1敲除小鼠根据遗传背景发展出狼疮样自身免疫疾病或自身免疫扩张型心肌病(Nishimura,

H.,Nose,M.,Hiai,H.,Minato,N.,和Honjo,T.(1999)Immunity 11,141-151;Nishimura,H.,Okazaki,T.,Tanaka,Y.,Nakatani,K.,Hara,M.,Matsumori,A.,Sasayama,S.,Mizoguchi,A.,Hiai,H.,Minato,N.,和Honjo,T.(2001)Science 291,319-322)。自身免疫最可能因PD-L1和PD-L2两种配体的信号传导丢失所致。最近,CD80已被确定为将抑制性信号转导进T细胞的PD-L1的第二受体(Butte,M.J.,Keir,M.E.,Phamduy,T.B.,Sharpe,A.H.,和Freeman,G.J.(2007)Immunity 27,111-122)。B7-H3和B7-H4的受体仍不得而知。

[0010] 得到最清楚表征的协同刺激性配体为B7.1和B7.2,并且它们属于由许多关键性的免疫调节因子(诸如B7家族配体和受体)组成的Ig超家族。Ig超家族成员在专职抗原呈递细胞(APC)上表达,并且它们的受体为CD28和CTLA-4。CD28由首次接触试验的和活化的T细胞表达,并对最佳的T细胞活化起着关键作用。相比之下,CTLA-4在T细胞活化后诱导,并通过结合到B7.1/B7.2而抑制T细胞活化,从而损害CD28-介导的协同刺激。B7.1和B7.2敲除(KO)小鼠在适应性免疫应答中受损,而CTLA-4敲除小鼠无法充分控制炎症并发展出系统性自身免疫疾病。随着时间推移,B7家族配体已扩展到包括协同刺激配体诸如B7-H2(ICOS配体)和B7-H3以及协同抑制性配体诸如B7-H1(PD-L 1)、B7-DC(PD-L2)、B7-H4(B7S1或B7x)和B7-H6。因此,已鉴定了另外的CD28家族受体。ICOS在活化的T细胞上表达,并结合到B7-H2。ICOS为正协同调节因子,对T-细胞活化、分化和功能起着重要作用。在另一方面,程序性死亡1(PD-1)负调节T细胞应答。PD-1敲除小鼠发展出了狼疮样自身免疫疾病或扩张型心肌病。与VISTA(为本发明焦点的免疫抑制性分子)相比,PD-L1和PD-L2这两种抑制性B7家族配体具有不同的表达模式。PD-L2在DC和巨噬细胞上诱导性表达,而PD-L1在造血细胞和非造血细胞类型上均泛表达。与PD-1受体的免疫抑制作用一致,使用PD-L1-/-和PD-L2-/-小鼠的研究已表明,两种配体在抑制T细胞增殖和细胞因子产生方面具有重叠作用。PD-L1缺乏在自身免疫性糖尿病的非肥胖型糖尿病(NOD)模型以及多发性硬化症(实验性自身免疫性脑脊髓炎,EAE)的鼠模型中均会加速疾病进展。PD-L1-/-T细胞在两种疾病模型中均产生升高水平的促炎性细胞因子。此外,在NOD小鼠中的研究已表明,PD-L1的组织表达(即,在胰腺内)对其区域性控制炎症的能力有独特的贡献。PD-L1还在胎盘合体滋养细胞上高表达,这些细胞关键性地控制对同种异体胎儿的母体免疫应答。

[0011] 鉴于这一分子家族对调节免疫的强大作用,在癌症鼠模型中作出的巨大努力已表明通过靶向这一分子家族可以诱导保护性抗肿瘤免疫。涉及抗CTLA-4的研究已记述了在鼠模型和黑素瘤临床试验中的治疗有益效果。用B16-GM-CSF(Gvax)接种疫苗的小鼠当与CTLA-4的抗体阻断相结合时促进B16黑素瘤的排斥。PD-1以及PD-L1的抗体也在多种鼠肿瘤模型中证实了增强的抗肿瘤免疫和宿主存活。最后,虽然CTLA-4和PD-1属于同一协同抑制性分子家族,但是有证据表明,它们使用不同的非冗余机制抑制T细胞活化,并且在抗CTLA-4和抗PD-1/L1结合使用时在鼠黑素瘤中增强宿主存活的能力方面存在协同作用。

[0012] 基于前述说明,鉴于这些家族成员在调节免疫特别是T细胞免疫方面的重要作用,阐明另一种新型B7型家族成员和配体及其调节因子将会是有用的。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明涉及治疗方法,其调节活性和/或特异性结合或阻断特定调节性T细胞蛋白与其反受体的结合。这种名为PD-L3 OR VISTA的蛋白是一种新型的且结构不同的Ig超家族抑制性配体,其胞外域具有与B7家族配体PD-L1的同源性。这种分子在本文可互换地称为

PD-L3 OR VISTA或称为T细胞活化的V结构域免疫球蛋白抑制剂(VISTA)。VISTA的表达主要位于造血室内，并在骨髓APC和T细胞上受高度调节。VISTA抑制性途径的治疗性干预提出了一种调节T细胞介导的免疫以治疗多种癌症的新方法。

[0015] 本发明特别涉及VISTA或PD-L3的特异性抗体用于治疗特定癌症(包括膀胱癌、卵巢癌和黑素瘤)的用途。

[0016] 此外，本发明特别涉及PD-L3 OR VISTA蛋白的用途，特别是多聚体VISTA蛋白以及表达其的病毒载体(如腺病毒)的用途，以治疗其中在治疗学上需要免疫抑制的病症，诸如过敏、自身免疫和炎性病症。

[0017] 如下文所公开，VISTA的表达似乎仅存在于造血室内，且这种蛋白在成熟骨髓细胞($CD11b^{bright}$)上高表达，在$CD4^+$T细胞、T^{reg}和$CD8^+$T细胞上的表达水平较低。可溶性VISTA蛋白，如可溶性VISTA-Ig融合蛋白，或APC上的VISTA表达在体外抑制$CD4^+$和$CD8^+$T细胞增殖以及细胞因子产生。还观察到，抗VISTA抗体，如抗VISTA mab(13F3)在体外通过$VISTA^+$APC阻断T细胞应答的VISTA诱导型抑制。另外，已发现，抗VISTA mab加重了EAE并在体内增加了致脑炎Th17的频率。再者，如下文详细公开，已发现，抗VISTAmab在多种(4)鼠肿瘤模型中诱导肿瘤缓解。在这些模型中的髓源性抑制细胞(MDSC)上的VISTA表达极其高，表明$VISTA^+$MDSC抑制肿瘤特异性免疫。如本文所示，VISTA在小鼠体内和体外以及人(仅体外)中对T细胞有免疫抑制活性，是控制自身免疫发展以及对癌症免疫应答的重要介体。具体地讲，数据表明：

[0018] (1)VISTA是Ig超家族的新成员，并包含具有与PD-L1遥远的序列相似性的Ig-V结构域。我们在本文公开，当作为Ig融合蛋白而产生时或在人工APC上过表达时，VISTA抑制小鼠和人两者的CD4+和CD8+T细胞增殖及细胞因子产生。

[0019] (2)VISTA在骨髓APC上的表达在体外对T细胞应答具有抑制性。

[0020] 在肿瘤微环境中VISTA在MDSC上的表达极高。许多细胞表面分子的表型和功能分析之前已表明它们牵涉在MDSC介导的T细胞抑制中：CD115、CD124、CD80、PD-L1和PD-L2由MDSC表达，但是在MDSC与缺乏免疫抑制活性的无肿瘤小鼠的细胞之间，未发现它们表达水平或阳性细胞比例的差异。因此，我们预测，VISTA将是MDSC上的主要B7负调节因子。

[0021] (4)抗体介导的VISTA阻断诱导对自体肿瘤的保护性免疫。

[0022] 基于上文所述，VISTA似乎是MDSC上的一种主要的、负免疫调节分子，其干扰保护性抗肿瘤免疫的发展。因此，通过抗VISTA抗体阻断此分子的活性将允许人和其他哺乳动物中保护性抗肿瘤免疫的发展。

[0023] 因此，本发明涉及使用可溶性VISTA蛋白，如融合蛋白和包含VISTA胞外域或其片段的多个拷贝的多聚体VISTA蛋白，以及VISTA结合剂，如小分子和抗体或其片段，其结合或调节(激动或拮抗)VISTA的活性，作为免疫调节剂以及用于治疗不同的癌症，如膀胱癌、卵巢癌和淋巴瘤、自身免疫疾病、过敏、感染和炎性病症，如多发性硬化和关节炎。

[0024] 如下文详细描述，此蛋白是一种新型的抑制性配体，其胞外Ig-V结构域具有与两种已知的B7家族配体即程序性死亡配体1和2(PD-L1和PD-L2)的同源性，并表现出独特的序列特征以及在APC和T细胞亚群上在体外体内与众不同的表达模式(从而将PD-L3ORVISTA与其他B7家族配体区别开来)。已表明，此蛋白对$CD4^+$和$CD8^+$T细胞增殖与分化具有功能影响(抑制$CD4^+$和$CD8^+$T细胞增殖以及细胞因子产生)。基于其表达模式以及对T细胞的抑制性影

响，PD-L3OR VISTA显然作为调节性配体发挥作用，其在T细胞与髓源性APC之间的同种相互作用期间负调节T细胞应答。

[0025] 虽然PD-L3 OR VISTA似乎为配体B7家族的成员，但不同于其他B7家族配体，此分子仅含有Ig-V结构域而无Ig-C结构域，并在系统发生上更接近B7家族受体程序性死亡-1(PD-1)。基于上文所述，PD-L3 OR VISTA及其特异性激动剂或拮抗剂可用于调节T细胞活化和分化，并更广泛地用于调节控制免疫应答的调控网络。具体地，PD-L3 OR VISTA蛋白以及PD-L3 OR VISTA激动剂或拮抗剂，优选地为PD-L3 OR VISTA的特异性抗体，可用于调节自身免疫、炎性反应和疾病、过敏、癌症、感染性疾病和移植中的免疫应答。

[0026] 因此，本发明的一部分涉及例如治疗性、诊断性或免疫调节性用途的组合物，其包含：分离的可溶性PD-L3 OR VISTA蛋白或融合蛋白，如可溶性VISTA-Ig融合蛋白或多聚体VISTA蛋白，这些蛋白包含与如SEQ ID NO:2、4或5所示的人或鼠PD-L3 OR VISTA多肽优选地至少70-90%相同的氨基酸序列，或其直系同源体或片段，它们由特异性杂交到在体内调节VISTA的SEQ ID NO:1或3的基因进行编码；以及包含药学上可接受的载体。在一些实施方案中，可溶性或多聚体VISTA蛋白可以直接或间接连接到异源(非VISTA)蛋白或可以由病毒载体或细胞表达，包括例如转染的免疫细胞，诸如T细胞。

[0027] 本发明还提供表达载体，其包含编码VISTA蛋白或其片段或直系同源体的分离核酸，所述VISTA蛋白与如SEQ ID NO:2、4或5所示的人或鼠VISTA的氨基酸序列至少70-90%相同，其任选地融合到编码另一种蛋白诸如Ig多肽(如Fc区或报告分子)的序列；以及提供包含所述载体的宿主细胞。

[0028] 本发明还具体涉及分离的结合剂，优选地为抗体或抗体片段，其特异性结合到包含如SEQ ID NO:2、4或5所示的氨基酸序列的PD-L3OR VISTA蛋白或其变体、片段或直系同源体。在一个优选的实施方案中，该结合剂在体外或体内调节(激动或拮抗)VISTA活性。在最优选的实施方案中，该结合剂为激动性或拮抗性抗体。

[0029] 本发明进一步提供调节免疫细胞应答的方法，方式是在体外或体内将免疫细胞与VISTA蛋白或其特异性结合剂在在存在初级信号的情况下接触，使得免疫细胞应答得到调节。(r VISTA或其调节剂的相互作用将信号传递给免疫细胞，从而调控免疫应答。PD-L3 OR VISTA蛋白在骨髓抗原呈递细胞(包括髓系树突状细胞(DC)和巨噬细胞)上以高水平表达，在CD4+和CD8+T细胞上以低密度表达。免疫活化后，PD-L3 OR VISTA表达在骨髓APC上上调，但在CD4+T细胞上下调)。因此，本发明的PD-L3 OR VISTA核酸和多肽及其激动剂或拮抗剂可用于例如调节免疫应答。

[0030] 在另一方面，本发明提供编码VISTA多肽，优选地编码可溶性融合蛋白和多聚体VISTA蛋白的分离的核酸分子以及核酸片段，其适合作为引物或杂交探针用于检测编码PD-L3 OR VISTA的核酸。在一个实施方案中，本发明的PD-L3 OR VISTA核酸分子与编码如本文所示的SEQ ID NO:1或3中的PD-L3 OR VISTA的核苷酸序列(例如，整个长度的核苷酸序列)或其互补序列至少约70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高程度相同。

[0031] 在另一个实施方案中，PD-L3 OR VISTA核酸分子包含编码下述多肽的核苷酸序列，所述多肽的氨基酸序列具有与SEQ ID NO:2、4或5的氨基酸序列特定的百分比同一性。在一个优选的实施方案中，PD-L3OR VISTA核酸分子包含编码下述多肽的核苷酸序列，所述

多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:2、4或5的氨基酸序列的整个长度或与其胞外域至少约71%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高程度相同。

[0032] 在另一个优选的实施方案中，分离的核酸分子编码人或鼠VISTA或其中的保守区或功能结构域的氨基酸序列。在又一个优选的实施方案中，该核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:2、4或5的氨基酸序列的多肽的核苷酸序列。在又一个优选的实施方案中，该核酸分子为至少约50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150或更多个核苷酸长。在一个进一步优选的实施方案中，该核酸分子为至少约50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150或更多个核苷酸长，并编码具有PD-L3 OR VISTA活性或调节PD-L3OR VISTA功能(如本文所述)的多肽。

[0033] 本发明的另一个实施方案的特征在于核酸分子，优选地为PD-L3OR VISTA核酸分子，其特异性检测相对于编码非PD-L3 OR VISTA多肽的核酸分子的PD-L3 OR VISTA核酸分子。例如，在一个实施方案中，这样的核酸分子为至少约880、900、950、1000、1050、1100、1150或更多个核苷酸长，并在严格条件下杂交到编码如SEQ ID NO:2、4或5所示的多肽的核酸分子或其互补序列。在另一个实施方案中，这样的核酸分子为至少20、30、40、50、100、150、200、250、300或更多个核苷酸长，并在严格条件下杂交到编码PD-L3 ORVISTA片段的核酸分子，如包含至少20、30、40、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950或更多个核苷酸长，包含编码SEQ ID NO:2、4或5所示的PD-L3 OR VISTA多肽的以SEQ ID NO:1和3公开的核酸序列或其互补序列的至少15个(即15个连续的)核苷酸，并在严格条件下杂交到包含如SEQ ID NO:1或3所示的核苷酸序列或其互补序列的核酸分子。

[0034] 在其他优选的实施方案中，该核酸分子编码包含SEQ ID NO:2或4或5的氨基酸序列的多肽的天然存在的等位变体，其中该核酸分子在严格杂交条件下杂交到包含SEQ ID NO:1或3或其互补序列的核酸分子的互补序列。

[0035] 本发明的另一个实施方案提供分离的核酸分子，其为PD-L3ORVISTA核酸分子的反义分子，如，与SEQ ID NO:1或3所示的PD-L3OR VISTA核酸分子的编码链反义。

[0036] 本发明的另一方面提供包含PD-L3 OR VISTA核酸分子的载体。在某些实施方案中，该载体为重组表达载体。

[0037] 在另一个实施方案中，本发明提供包含本发明载体的宿主细胞。在又一个实施方案中，本发明提供包含本发明核酸分子的宿主细胞。本发明还提供产生多肽，优选地PD-L3 OR VISTA多肽的方法，方式是在合适的培养基中培养包含重组表达载体的本发明的宿主细胞，如哺乳动物宿主细胞，诸如非人哺乳动物细胞，以使得产生所述多肽。

[0038] 本发明的另一方面的特征在于分离的或重组的PD-L3 OR VISTA多肽(如蛋白、多肽、肽或其片段或部分)。在一个实施方案中，分离的PD-L3 OR VISTA多肽或PD-L3 OR VISTA融合蛋白包含以下结构域的至少一个或多个：信号肽结构域、IgV结构域、胞外域、跨膜域和胞质域。

[0039] 在一个优选的实施方案中，PD-L3 OR VISTA多肽包含以下结构域的至少一个或多个：信号肽结构域、IgV结构域、胞外域、跨膜域和胞质域，并具有与SEQ ID NO:2或4或5的氨基酸序列至少约71%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高程

度相同的氨基酸序列。在另一个优选的实施方案中，PD-L3 OR VISTA多肽包含以下结构域的至少一个或多个：信号肽结构域、IgV结构域、胞外域、跨膜域和胞质域，并具有VISTA或PD-L3活性(如本文所述)。

[0040] 在又一个优选的实施方案中，PD-L3多肽包含以下结构域的至少一个或多个：信号肽结构域、IgV结构域、胞外域、跨膜域和胞质域，并由具有下述核苷酸序列的核酸分子编码，所述核苷酸序列在严格杂交条件下杂交到包含SEQ ID NO:1或3的核苷酸序列的核酸分子的互补序列。

[0041] 在另一个实施方案中，本发明的特征在于具有SEQ ID NO:2或4或5的氨基酸序列的多肽的片段或部分，其中该片段包含SEQ IDNO:2或4的氨基酸序列的至少15个氨基酸(即连续氨基酸)。在另一个实施方案中，PD-L3 OR VISTA多肽包含SEQ ID NO:2、4或5的氨基酸序列或由其组成。在另一个实施方案中，本发明的特征在于由下述核酸分子编码的PD-L3 OR VISTA多肽，所述核酸分子由与SEQID NO:1或3的核苷酸序列或其互补序列至少约70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高程度相同的核苷酸序列组成。本发明的进一步特征在于由下述核酸分子编码的PD-L3 OR VISTA多肽，所述核酸分子由这样的核苷酸序列组成，所述核苷酸序列在严格杂交条件下杂交到包含SEQ IDNO:1或3的核苷酸序列的核酸分子的互补序列。

[0042] 本发明的多肽或其部分，如其生物活性部分，可有效连接到非PD-L3 OR VISTA多肽(如异源氨基酸序列)以形成融合多肽。本发明的进一步特征在于抗体，诸如单克隆或多克隆抗体，其特异性结合本发明的多肽，优选地为人PD-L3 OR VISTA多肽。

[0043] 本发明还涉及基于所需的功能特性从针对此蛋白或PD-L3 ORVISTA-Ig融合蛋白产生的单克隆抗体组中选择具有所需功能特性的抗PD-L3 OR VISTA抗体的方法，所需功能特性例如为调节PD-L3OR VISTA对免疫的特定作用，诸如蛋白对TCR活化的抑制作用、蛋白对CD4T细胞针对抗CD3的增殖应答的抑制作用、抑制对同种CD4T细胞的抗原特异性增殖应答、PD-L3 OR VISTA对特定细胞因子诸如IL-2和γ干扰素表达的抑制作用等等。在一个尤其优选的实施方案中，将选择用作治疗剂的抗PD-L3 OR VISTA抗体，其在体外存在可溶性PD-L3 OR VISTA蛋白(如PD-L3 OR VISTA-Ig融合蛋白)的情况下增强PD-L3 OR VISTA-Ig对PD-L3 OR VISTA相关免疫功能的抑制作用。这是优选的，因为特别出人意料地(下文所示)，这些抗体在体内的表现与预期它们在体外对免疫的作用相反，即这些抗-或VISTA单克隆抗体为免疫抑制性的。

[0044] 此外，PD-L3 OR VISTA多肽(或其生物活性部分)或者PD-L3 ORVISTA分子的调节剂，即抗体，诸如使用前述方法选择的抗体，可结合到药物组合物中，该药物组合物任选地包含药学上可接受的载体。

[0045] 在另一个实施方案中，将PD-L3 OR VISTA蛋白用作抑制或降低免疫细胞活化的抑制性信号。在此实施方案中，该抑制性信号结合到免疫细胞上的抑制性受体(如CTLA-4或PD-1)，从而拮抗结合到活化受体的初级信号(如通过TCR、CD3、BCR或Fc多肽)。抑制包括例如抑制第二信使生成；抑制增殖；抑制免疫细胞中的效应子功能，如减弱吞噬作用、减少抗体产生、降低细胞毒性、使免疫细胞无法产生介体(诸如细胞因子(如IL-2)和/或变应性反应介体)；或发展无能。

[0046] 在特定的实施方案中，初级信号为结合TCR并引发初级刺激信号的配体(如CD3或

抗CD3)。此类TCR配体易于从商业来源获得,并且具体的实例包括抗CD3抗体OKT3(由得自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)的杂交瘤细胞制得)和抗CD3单克隆抗体G19-4。在一个替代性的实施方案中,初级信号通过其他机制传递给T细胞,这些机制包括蛋白激酶C活化剂诸如佛波酯(如豆蔻酰佛波醇乙酯)和钙离子载体(如离子霉素,其升高胞质钙浓度)等。使用此类试剂绕过TCR/CD3复合体但向T细胞递送刺激信号。其他作为初级信号发挥作用的试剂包括天然和合成的配体。天然配体可包括具有或不具有呈递的肽的MHC。其他配体可包括但不限于肽、多肽、生长因子、细胞因子、趋化因子、糖肽、可溶性受体、甾体化合物、激素、促分裂原诸如PHA或其他超抗原、肽-MHC四聚体(Altman,等(1996)Science 274(5284):94-6)和可溶性MHC二聚体(DalPorto,等(1993)Proc Natl.Acad.Sci.USA 90:6671-5)。

[0047] 根据本发明方法活化的免疫细胞随后可体外扩增并用于治疗和预防多种疾病;如,已克隆并体外扩增的人T细胞可维持其调节活性(Groux,等(1997)Nature 389(6652):737-42)。在扩增前,从受试者(如,哺乳动物诸如人、狗、猫、小鼠、大鼠或其转基因物种)中获得T细胞源。T细胞可得自许多来源,包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、脾脏组织、肿瘤或T细胞系。T细胞可得自使用技术人员已知的多种技术诸如ficoll™分离从受试者采集的一单位血。

[0048] 在另一方面,本发明提供检测生物样品中PD-L3 OR VISTA核酸分子、蛋白或多肽存在性的方法,方式是将生物样品与能够检测PD-L3 OR VISTA核酸分子、蛋白或多肽的试剂接触,使得在生物样品中检测PD-L3 OR VISTA核酸分子、蛋白或多肽的存在性。此PD-L3OR VISTA表达可用于检测某些疾病部位,诸如炎症部位。

[0049] 在另一方面,本发明提供检测生物样品中PD-L3 OR VISTA活性的存在性的方法,方式是将生物样品与能够检测PD-L3 OR VISTA活性的指标的试剂接触,使得在生物样品中检测PD-L3 OR VISTA活性的存在性。

[0050] 在另一方面,本发明提供用于调节PD-L3 OR VISTA活性的方法,包括将能够表达PD-L3 OR VISTA的细胞与调节PD-L3 ORVISTA活性的试剂接触,优选地为抗PD-L3 OR VISTA抗体,使得细胞中的PD-L3 OR VISTA活性得到调节。在一个实施方案中,该试剂抑制PD-L3 OR VISTA活性。在另一个实施方案中,该试剂刺激PD-L3OR VISTA活性。在又一个实施方案中,该试剂干扰或增强PD-L3 ORVISTA多肽与其天然结合伴侣之间的相互作用。在一个实施方案中,该试剂为特异性结合到PD-L3 OR VISTA多肽的抗体。在另一个实施方案中,该试剂为结合到PD-L3 OR VISTA多肽的肽、拟肽物或其他小分子。

[0051] 在再一个实施方案中,该试剂调节PD-L3 OR VISTA的表达,方式是通过调节PD-L3 OR VISTA基因的转录、PD-L3 OR VISTAmRNA的翻译或PD-L3 OR VISTA多肽的转录后修饰。在另一个实施方案中,该试剂为下述核酸分子,其核苷酸序列为PD-L3 OR VISTAmRNA或PD-L3 OR VISTA基因的编码链的反义序列。

[0052] 在一个实施方案中,本发明的方法用于治疗患有疾病或病症的受试者,所述疾病或病症的特征在于异常、不足或不需要的PD-L3 ORVISTA多肽或核酸表达或活性,方式是向所述受试者施用为PD-L3OR VISTA调节剂的试剂。在一个优选的实施方案中,PD-L3 ORVISTA调节剂为PD-L3 OR VISTA多肽,优选地为可溶性融合蛋白或多聚体VISTA蛋白或抗VISTA抗体,如下文所述。在另一个实施方案中,PD-L3 OR VISTA调节剂为PD-L3 OR VISTA

核酸分子，如在腺病毒载体中。在另一个实施方案中，本发明进一步提供用另外的调节免疫应答的试剂治疗受试者。

[0053] 在再一个实施方案中，本发明提供包含抗原和调节(增强或抑制)PD-L3 OR VISTA活性的试剂的疫苗。在一个优选的实施方案中，该疫苗抑制PD-L3 OR VISTA与其天然结合伴侣之间的相互作用。

[0054] 本发明还提供用于鉴定遗传变异存在与否的诊断性检测分析法，所述遗传变异的特征在于以下至少一者：(i)编码PD-L3OR VISTA多肽的基因的异常修饰或突变；(ii)基因的错误调节；以及(iii)PD-L3OR VISTA多肽的异常转录后修饰，其中基因的野生型形式编码具有PD-L3 OR VISTA活性的多肽。

[0055] 在另一方面，本发明提供用于鉴定下述化合物的方法，所述化合物结合到PD-L3 OR VISTA多肽或调节其活性，方式是：提供包含具有PD-L3 OR VISTA活性的PD-L3 OR VISTA多肽的指标组合物，使指标组合物与测试化合物接触，以及确定测试化合物对指标组合物中PD-L3 OR VISTA活性的影响，从而鉴定调节PD-L3 OR VISTA多肽的活性的化合物。

[0056] 在一个方面，本发明的特征在于调节免疫细胞上PD-L3 ORVISTA与其天然结合伴侣之间的相互作用的方法，包括将表达PD-L3OR VISTA的抗原呈递细胞与选自由下列组成的组的试剂接触：一种形式的PD-L3 OR VISTA、或调节PD-L3 OR VISTA与其天然结合伴侣之间的相互作用的试剂，使得免疫细胞上PD-L3 OR VISTA与其天然结合伴侣之间的相互作用得到调节。在一个优选的实施方案中，调节PD-L3 OR VISTA与其天然结合伴侣之间的相互作用的试剂为特异性结合到PD-L3 OR VISTA的抗体。在一个实施方案中，PD-L3 ORVISTA与其天然结合伴侣之间的相互作用受到上调。在另一个实施方案中，PD-L3 OR VISTA与其天然结合伴侣之间的相互作用受到下调。在一个实施方案中，该方法进一步包括将免疫细胞或抗原呈递细胞与调节免疫应答的另外试剂接触。

[0057] 在一个实施方案中，接触步骤在体外进行。在另一个实施方案中，接触步骤在体内进行。在一个实施方案中，免疫细胞选自由下列组成的组：T细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、B细胞和骨髓细胞。

[0058] 在另一方面，本发明涉及抑制或增强免疫细胞中活化的方法，包括增强或抑制细胞中PD-L3 OR VISTA的活性或表达，使得免疫细胞活性得到抑制或增强。

[0059] 在又一个方面，本发明涉及包含抗原以及抑制PD-L3 OR VISTA与其天然结合伴侣之间相互作用的试剂的疫苗。

[0060] 在又一个方面，本发明涉及包含抗原以及促进PD-L3 OR VISTA与其天然结合伴侣之间相互作用的试剂的疫苗。

[0061] 在另一方面，本发明涉及治疗患有将会受益于免疫应答上调的病症的受试者的方法，包括施用抑制受试者免疫细胞上PD-L3 ORVISTA与其天然结合伴侣之间相互作用的试剂，使得将会受益于免疫应答上调的病症得到治疗。在一个优选的实施方案中，该试剂包含结合到PD-L3 OR VISTA并抑制PD-L3 OR VISTA与其天然结合伴侣之间相互作用的阻断性抗体或小分子。在另一个实施方案中，该方法进一步包含向受试者施用上调免疫应答的第二试剂。在另一方面，本发明涉及治疗患有将会受益于免疫应答下调的病症的受试者的方法，包括施用刺激受试者细胞上PD-L3 OR VISTA与其天然结合伴侣之间相互作用的试剂，使得将会受益于免疫应答下调的病症得到治疗。

[0062] 例如，用PD-L3 OR VISTA蛋白或结合剂治疗的病症选自由下列组成的组：肿瘤、病原体感染、炎性免疫应答或病症，优选地为不太明显的炎性病症，或免疫抑制性疾病。具体实例包括多发性硬化、甲状腺炎、类风湿性关节炎、II型和I型糖尿病和癌症(晚期和早期形式)，包括转移癌，诸如膀胱癌、卵巢癌、黑素瘤、肺癌以及其中VISTA抑制有效抗肿瘤应答的其他癌症。在一些情况下，可向个体施用表达下述核酸的细胞或病毒载体，所述核酸编码抗VISTA抗体或VISTA融合蛋白。

[0063] 在一个实施方案中，试剂包括刺激PD-L3 OR VISTA与其天然结合伴侣之间相互作用的抗体或小分子。在另一个实施方案中，该方法进一步包括向受试者施用下调免疫应答的第二试剂，诸如PD-L!、PD-L2或CTLA-4融合蛋白或其特异性抗体。

[0064] 可使用根据本发明的PD-L3 OR VISTA蛋白、结合剂或PD-L3OR VISTA拮抗剂或激动剂治疗的示例性病症以举例的方式包括移植、过敏、感染性疾病、癌症和炎性或自身免疫疾病，如炎性免疫疾病。前述的示例性实例包括1型糖尿病、多发性硬化、类风湿性关节炎、银屑病性关节炎、系统性红斑狼疮、风湿性疾病、过敏症、哮喘、过敏性鼻炎、皮肤病、肠胃疾病诸如克罗恩病和溃疡性结肠炎、移植排斥、链球菌感染后和自身免疫性肾衰竭、败血性休克、全身炎症反应综合征(SIRS)、成人呼吸窘迫综合征(ARDS)和毒液螯入；自身炎症性疾病以及退行性骨和关节疾病(包括骨关节炎、结晶性关节炎和囊炎以及其他关节病)。另外，该方法和组合物可用于治疗肌腱炎、韧带炎和创伤性关节损伤。

[0065] 在另一方面，本发明涉及筛选调节PD-L3 OR VISTA活性的化合物的基于细胞的检测分析法，包括将表达PD-L3 OR VISTA目标分子的细胞与测试化合物接触，并确定测试化合物调节PD-L3 OR VISTA目标分子的活性的能力。

[0066] 在又一个方面，本发明涉及筛选调节PD-L3 OR VISTA与目标分子结合的化合物的无细胞的检测分析法，包括将PD-L3 OR VISTA多肽或其生物活性部分与测试化合物接触，并确定测试化合物结合到PD-L3 OR VISTA多肽或其生物活性部分的能力。

[0067] 在另一个实施方案中，本发明涉及鉴定在第一和第二抗原浓度下调节PD-L3 OR VISTA对T细胞活化或细胞因子产生的影响的化合物的方法，所述化合物如抗PD-L3 OR VISTA抗体，所述方法包括将表达PD-L3 OR VISTA目标分子的T细胞与测试化合物在第一抗原浓度下接触，确定测试化合物在第一抗原浓度下调节T细胞增殖或细胞因子产生的能力，将表达PD-L3 OR VISTA目标分子的T细胞与测试化合物在第二抗原浓度下接触，以及确定测试化合物在第二抗原浓度下调节T细胞增殖或细胞因子产生的能力，从而鉴定在第一和第二抗原浓度下调节T细胞活化或细胞因子产生的化合物。

[0068] 在其他具体实施方案中，筛选抗PD-L3 OR VISTA抗体以及PD-L3 OR VISTA蛋白组，从中选出在体外或体内抑制或促进PD-L3OR VISTA对CD4+和CD8+T细胞分化、增殖和/或细胞因子产生的作用的那些。

[0069] 在优选的实施方案中，将受试者PD-L3 OR VISTA蛋白、核酸以及PD-L3 OR VISTA特异性配体，优选地为对PD-L3 OR VISTA的功能具有所需作用的抗体，用于治疗诸如下述病症：癌症、自身免疫疾病、过敏、炎性疾病或感染，更具体地讲为免疫系统疾病，诸如重症联合免疫缺陷、多发性硬化、系统性红斑狼疮、I型糖尿病、淋巴增生综合征、炎性肠病、过敏、哮喘、移植物抗宿主病和移植排斥；对感染性病原体诸如细菌和病毒的免疫应答；以及免疫系统癌症，诸如淋巴瘤和白血病。

[0070] 附图详述

[0071] 图1.序列分析。A.鼠PD-L3 OR VISTA的全长氨基酸序列。B.鼠PD-L3 OR VISTA与所选B7家族配体之间的胞外Ig结构域的氨基酸序列比对，所述配体包括B7-H1(PD-L1)、B7-DC(PD-L2)、B7-H3和B7-H4。C.PD-L3 OR VISTA Ig结构域与B7家族受体的比对，所述受体包括PD-1、CTLA-4、CD28、BTLA和ICOS。Ig-v结构域，“....”；Ig-c结构域，“_”。比对使用MUSCLE算法(通过Log-Expectation的多序列比较)进行。D.PD-L3 OR VISTA与其他B7家族配体和受体之间的Ig-V结构域的序列同一性(%)使用ClustalW2程序计算。E.人和鼠PD-L3 OR VISTA之间的序列同源性。相同的残基以黑色阴影表示。高度保守和半保守残基分别以深浅灰色阴影表示。

[0072] 图2.小鼠PD-L3 OR VISTA与其他免疫球蛋白(Ig)超家族成员的系统发生分析。小鼠PD-L3 OR VISTA和其他Ig超家族成员(包括CD28、CTLA-4、ICOS、BTLA、PD-1、B7-H1(PD-L1)、B7-DC(PD-L2)、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-1、B7-2、BTNL2、BTN3A3、BTN2A2和BTN1A1)的全长序列使用PhyML算法(系统发育最大可能性)进行了分析。分支距离在三个分支节点示处。

[0073] 图3.PD-L3 OR VISTA的组织表达和造血细胞表达模式A.小鼠组织中全长PD-L3 OR VISTA的RT-PCR。泳道：(1)肌肉(2)心脏(3)眼睛(4)胸腺(5)脾脏(6)小肠(7)肾脏(8)肝脏(9)脑(10)乳腺(11)肺(12)卵巢(13)骨髓。B.经纯化的造血细胞类型中全长PD-L3 OR VISTA的RT-PCR。泳道(1)腹腔巨噬细胞(2)脾CD11b+单核细胞(3)脾CD11c+DC(4)脾CD4+T细胞(5)脾CD8+T细胞(6)脾B细胞。C-E.对来自胸腺和脾脏的脾CD4+和CD8+T细胞上(C)、CD11b+单核细胞上(D)以及脾脏和腹腔的CD11c+DC亚群上(E)的PD-L3OR VISTA表达的流式细胞分析。F.还分析了脾B细胞、NK细胞和粒细胞。G.来自不同组织部位的造血细胞上PD-L3 OR VISTA的差异表达，所述部位包括肠系膜淋巴结、外周淋巴结、脾脏、血液和腹腔。示出了得自至少3个独立实验的代表性数据。

[0074] 图4.得自GNF(Genomics Institute of Novartis ResearchFoundation)基因阵列数据库以及NCBI GEO(gene expression omnibus)数据库的PD-L3 OR VISTA的基因阵列数据。

[0075] 图5.PD-L3 OR VISTA仓鼠单克隆抗体的特异性。过表达融合到RFP的PD-L1或者PD-L3 OR VISTA的小鼠EL4细胞系使用杂交瘤培养物的上清液进行了染色，并通过流式细胞术进行了分析。示出了两个代表性阳性克隆。

[0076] 图6.在体外培养的脾细胞上PD-L3 OR VISTA表达与其他B7家族配体的比较。比较了在多种造血细胞类型上PD-L3 OR VISTA和其他B7家族配体(即PD-L1、PD-L2、B7-H3和B7-H4)的表达，所述造血细胞类型包括CD4+T细胞、CD11bhi单核细胞和CD11c+DC。细胞为新分离的或在体外培养了24小时，被活化以及未活化。CD4+T细胞用结合平板的□CD3(5μg/ml)活化，CD11bhi单核细胞和CD11c+DC用IFNα(20ng/ml)和LPS(200ng/ml)活化。示出了得自三个独立实验的代表性结果。

[0077] 图7.在免疫过程中PD-L3 OR VISTA和其他B7家族配体的体内表达模式的比较。在DO11.10 TCR转基因小鼠侧腹用在完全弗氏佐剂(CFA)中乳化的鸡卵清白蛋白(OVA)免疫。在免疫后24小时采集了引流区和非引流区淋巴结细胞，通过流式细胞术分析了PD-L3 ORVISTA、PD-L1和PD-L2的表达。示出了得自至少四个独立实验的代表性结果。A.在免疫后24小时用CFA/OVA诱导了表达高水平PD-L3OR VISTA的CD11b+细胞群，但在引流区淋巴结内

不只是使用了CFA。这些细胞具有F4/80+巨噬细胞和CD11C+树突状细胞的混合表型。B.在免疫后24小时分析了PD-L3 OR VISTA、PD-L1和PD-L2在CD11bhi单核细胞、CD11c+DC和CD4+T细胞上的表达。

[0078] 图8.PD-L3 OR VISTA在活化CD4+T细胞上的表达响应免疫而丧失。DO11.10小鼠侧腹用在完全弗氏佐剂(CFA)中乳化的鸡卵清蛋白(OVA)免疫。在免疫后48小时采集了引流区和非引流区淋巴结细胞，通过流式细胞术分析了PD-L3 OR VISTA表达。示出了得自2个独立实验的代表性结果。

[0079] 图9.固定的PD-L3 OR VISTA-Ig融合蛋白抑制了CD4+和CD8+T细胞增殖。A.CFSE标记的CD4+和CD8+T细胞通过结合平板的□CD3(具有或不具有共吸收的PD-L3 OR VISTA-Ig)刺激。对低CFSE细胞的百分比进行了定量，并在B图中显示。C.PD-1敲除小鼠中CD4+T细胞也被PD-L3 OR VISTA-Ig抑制。D.PD-L3 OR VISTA-Ig介导的抑制具有持久性，并可晚发。CD4+T细胞在存在PD-L3ORVISTA-Ig或对照Ig的情况下活化72小时(i)或24小时(ii、iii和iv)。收获24小时预活化的细胞，在规定的条件下再刺激另外48小时。在72小时培养结束时分析了细胞增殖。(ii)用PD-L3 OR VISTA-Ig预活化并用抗CD3再刺激;(iii)用抗CD3预活化并用PD-L3ORVISTA-Ig再刺激。(iv)用PD-L3 OR VISTA-Ig预活化并用PD-L3 ORVISTA-Ig再刺激。对于所有条件分析了平行孔。示出了得自至少四个实验的代表性结果。

[0080] 图10.PD-L1-Ig和PD-L3 OR VISTA-Ig融合蛋白对CD4+T细胞增殖具有类似的抑制作用。将粗纯化的CD4+T细胞用CFSE标记，用结合平板的□CD3与滴定量的PD-L1-Ig或PD-L3 OR VISTA-Ig融合蛋白一起进行刺激。在72小时时分析了CFSE稀释度，并对低CFSE的细胞的百分比进行了定量。对于所有条件分析了平行孔。示出了得自2个独立实验的代表性结果。

[0081] 图11.PD-L3 OR VISTA-Ig对首次接触试验的和记忆CD4+T细胞增殖的抑制性作用。A.对首次接触试验的(CD25-CD44lowCD62Lhi)和记忆(CD25-CD44hiCD62Llow)CD4+T细胞亚群进行分选、CFSE标记以及用结合平板的抗CD3(2.5μg/ml)与PD-L3 OR VISTA-Ig或对照Ig一起以指定的比率进行刺激。通过研究CFSE分割特征在72小时时分析了细胞增殖。计算了通过低CFSE细胞的百分比确定的增殖细胞百分比，并在B图中示出。对于所有条件分析了平行孔。示出了得自两个独立实验的代表性结果。

[0082] 图12.PD-L3 OR VISTA-Ig融合蛋白抑制了早期TCR活化和细胞增殖，但不直接诱导细胞凋亡。将粗纯化的CD4+T细胞用结合平板的抗CD3与PD-L3 OR VISTA-Ig或者对照Ig一起以1:2的比率(分别为2.5μg/ml和5μg/ml)进行刺激。在24小时和48小时时通过流式细胞术分析了细胞的CD69、CD62L和CD44表达。还针对早期细胞凋亡标志物膜联蛋白V和细胞死亡标志物7-氨基放线菌素D (7-AAD)对细胞进行了染色。示出了得自两个独立实验的代表性结果。

[0083] 图13.PD-L3 OR VISTA-Ig抑制了CD4+和CD8+T细胞产生细胞因子。A-B.将粗纯化的CD4+T细胞用结合平板的抗CD3和PD-L3OR VISTA-Ig或者对照Ig一起以规定的比率进行刺激。24小时和48小时后采集了培养物上清液。通过ELISA分析了IL-2和IFN□的水平。C-D.将CD4+T细胞分选成首次接触试验的(CD25-CD44lowCD62Lhi)和记忆(CD25-CD44hiCD62Llow)细胞群。将细胞用结合平板的□CD3和PD-L3OR VISTA-Ig或者对照Ig以1:2的比率进行刺激。在48小时时收集了培养物上清液，并通过ELISA分析了IL-2和IFN□水平。E.将粗纯化的CD8+T细胞用结合平板的□CD3和PD-L3 OR VISTA-Ig或者对照Ig以指定

的比率进行刺激。通过ELISA分析了培养物上清液中的IFN□。对于所有条件，合并了6个平行孔的上清液进行ELISA分析。示出了得自至少三个实验的代表性结果。

[0084] 图14.PD-L3OR VISTA-Ig介导的抑制可对抗CD28提供的中等水平的协同刺激，但被高水平的协同刺激完全逆转，以及通过外源性IL-2部分补救。A-B.CD4+T细胞通过结合平板的□CD3与PD-L3ORVISTA-Ig或者对照Ig一起以1:1和1:2的比率活化。对于细胞因子补救，将可溶性mIL-2、mIL7、mIL15和mDL-23(均为40ng/ml)加到细胞培养物中(A)。为了研究协同刺激作用，将□CD28(1μg/ml)用□CD3和Ig蛋白以指定的比率一起固定(B)。通过研究CFSE分割特征，在72小时时分析了细胞增殖。C-D.为了研究在存在较低水平的协同刺激下PD-L3OR VISTA的抑制活性，将滴定量的□CD28用抗CD3(2.5μg/ml)和PD-L3OR VISTA-Ig融合蛋白或者对照Ig融合蛋白(10μg/ml)一起包被，以刺激CD4+T细胞增殖。在72小时时分析了细胞增殖。对增殖的低CFSE细胞的百分比进行了定量，并在D图中示出。对于所有条件分析了平行孔。示出了得自三个独立实验的代表性CFSE曲线。

[0085] 图15.在抗原呈递细胞上表达的PD-L3OR VISTA抑制了CD4T细胞增殖。A-C.将稳定表达MHCⅡ分子I-Ad和协同刺激分子B7-2的CHO细胞系用作亲本细胞系。将细胞用表达PD-L3OR VISTA-RFP或者RFP对照分子的逆转录病毒转导。分选转导的细胞以实现均一的表达水平。为了测试它们作为抗原呈递细胞的能力，将CHO-PD-L3OR VISTA或CHO-RFP细胞用丝裂霉素C处理，并与OVA特异性转基因CD4+T细胞DO11.10在存在滴定量OVA肽的情况下混合。在72小时时通过CFSE分割特征(A-B)或通过氚掺入(C)分析了DO11细胞的增殖。D.将骨髓源性树突状细胞在10天的培养期中用RFP或B7B-H5-RFP逆转录病毒转导。对转导的CD11c+RFP+DC和非转导的CD11c+RFP-DC进行分选，并用于在滴定量的OVA肽存在下刺激OVA特异性转基因CD4+T细胞OTⅡ。通过研究CFSE分割在第3天时分析了细胞增殖。对于所有实验，针对所有条件分析了平行孔，并示出了得自三个独立实验的代表性结果。

[0086] 图16.在逆转录病毒转导的骨髓源性DC中PD-L3OR VISTA的表面表达水平。将骨髓源性DC(BMDC)在存在GM-CSF(20ng/mml)的情况下培养，并用RFP或者PD-L3OR VISTA-RFP逆转录病毒转导，如在“方法”中所述。在第10天，对培养的BMDC分析了PD-L3OR VISTA的表面表达水平，并与新分离的腹腔巨噬细胞进行了比较。

[0087] 图17显示了抗PDL3mAb在被动转移EAE模型中表现出疗效。在此过继转移EAE模型中，将供体SJL小鼠用CFA和PLP肽免疫。在第10天，分离了引流区淋巴结的总淋巴细胞，在体外用PLP肽、IL-23(20ng/ml)和抗IFNg(10ng/ml)培养了4天。然后纯化扩增后的CD4T细胞，过继转移至首次接触试验的受体小鼠。监测疾病进展，并按以下评分：0：无疾病；0.5：丧失尾调；1：尾无力；2：尾无力+后肢麻痹；2.5：单后肢瘫痪；3：双后肢瘫痪；3.5：前肢虚弱；4：后肢瘫痪+单侧前肢瘫痪。当疾病评分达到4时将小鼠处死。*，表示小鼠被处死。

[0088] 图18显示了抗PD-L3OR VISTA抗体在胶原诱导型关节炎动物模型中表现出疗效(减轻关节炎症状)。

[0089] 图19显示了在抗原呈递细胞上表达的VISTA抑制了CD4+T细胞增殖。

[0090] 图20显示了抗VISTA抗体在移植有MB49肿瘤细胞的小鼠中抑制了肿瘤生长。

[0091] 图21显示了在四个不同的小鼠抗肿瘤模型中VISTA mab的抗肿瘤作用。

[0092] 图22显示了VISTA mab对CD40/TLR激动剂疫苗的疗效具有潜在作用。

[0093] 图23显示了在CNS细胞上的VISTA表达。

[0094] 图24显示了VISTA在EAE模型中对T细胞命运和功能的影响。

[0095] 发明详述

[0096] *定义

[0097] 在更详细描述本发明前，提供以下定义。

[0098] 如本文所用，术语“免疫细胞”包括具有造血起源并在免疫应答中发挥作用的细胞。免疫细胞包括淋巴细胞，诸如B细胞和T细胞；自然杀伤细胞；以及骨髓细胞，诸如单核细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞和粒细胞。

[0099] 如本文所用，术语“T细胞”包括CD4+T细胞和CD8+T细胞。术语“T细胞”还包括T辅助细胞1型T细胞和T辅助细胞2型T细胞两者。

[0100] 术语“抗原呈递细胞”包括专职性抗原呈递细胞(如B淋巴细胞、单核细胞、树突状细胞和朗格汉斯细胞)以及其他抗原呈递细胞(如角质细胞、内皮细胞、星形胶质细胞、成纤维细胞和少突细胞)。

[0101] 术语“抗原”在本文是指其中对其免疫应答的调节可能是治疗所需的抗原。就所需的对所关注的特定抗原的增强免疫应答而言，此类抗原包括但不限于示例性的，可对其引起保护性免疫应答的感染性疾病抗原。例如，所考虑的HIV抗原为蛋白gag、env、pol、tat、rev、nef、逆转录酶和其他HIV成分。得自人乳头状瘤病毒的E6和E7蛋白也在考虑之内。此外，得自单纯性疱疹病毒的EBNA1抗原也在考虑之内。考虑的其他病毒抗原为肝炎病毒抗原，诸如乙肝病毒的S、M和L蛋白、乙肝病毒的前S抗原以及其他肝炎(如甲肝、乙肝、丙肝)病毒成分，诸如丙肝病毒RNA；流感病毒抗原，诸如血凝素、神经氨酸酶、核蛋白、M2和其他流感病毒成分；麻疹病毒抗原，诸如麻疹病毒融合蛋白和其他麻疹病毒成分；风疹病毒抗原，诸如蛋白E1和E2以及其他风疹病毒成分；轮状病毒抗原，诸如VP7sc以及其他轮状病毒成分；巨细胞病毒抗原，诸如包膜糖蛋白B以及其他巨细胞病毒抗原成分；呼吸道合胞病毒抗原，诸如RSV融合蛋白、M2蛋白以及其他呼吸道合胞病毒抗原成分；单纯疱疹病毒抗原，诸如即刻早期蛋白、糖蛋白D以及其他单纯疱疹病毒抗原成分；水痘-带状疱疹病毒抗原，诸如gpI、gpII以及其他水痘-带状疱疹病毒抗原成分；日本脑炎病毒抗原，诸如蛋白E、M-E、M-E-NS1、NS 1、NS 1-NS2A、80%E以及其他日本脑炎病毒抗原成分；狂犬病毒抗原，诸如狂犬病毒糖蛋白、狂犬病毒核蛋白以及其他狂犬病毒抗原成分；西尼罗河病毒prM和E蛋白；以及埃博拉病毒包膜蛋白。有关病毒抗原的附加实例，参见Fundamental Virology，第二版，编者Knipe，D.M.和Howley P.M.(Lippincott Williams&Wilkins，New York，2001)。此外，还公开了细菌抗原。可用于本发明的组合物和方法中的细菌抗原包括但不限于百日咳细菌抗原，诸如百日咳毒素、丝状血凝素、百日咳杆菌粘附素、FIM2、FIM3、腺苷酸环化酶以及其他百日咳细菌抗原成分；白喉细菌抗原，诸如白喉毒素或类毒素以及其他白喉细菌抗原成分；破伤风细菌抗原，诸如破伤风毒素或类毒素以及其他破伤风细菌抗原成分；链球菌抗原，诸如M蛋白以及其他链球菌抗原成分；葡萄球菌抗原，诸如IsdA、IsdB、SdrD和SdrE；革兰氏阴性杆菌抗原，诸如脂多糖、鞭毛蛋白以及其他革兰氏阴性菌抗原成分；结核分枝杆菌抗原，诸如分枝菌酸、热休克蛋白65(HSP65)、30kDa主要分泌蛋白、抗原85A、ESAT-6以及其他分支杆菌抗原成分；幽门螺旋杆菌抗原成分；肺炎球菌抗原，诸如肺炎球菌溶血素、肺炎球菌荚膜多糖以及其他肺炎球菌抗原成分；流感嗜血杆菌抗原，诸如荚膜多糖以及其他流感嗜血杆菌抗原成分；炭疽杆菌抗原，诸如炭疽保护性抗原、炭疽致死因子以及其他炭疽杆菌抗原成分；得

自鼠疫耶尔森氏菌的FI和V蛋白;立克次氏体细菌抗原,诸如romps以及其他立克次氏体细菌抗原成分。本文所述的细菌抗原还包括任何其他细菌、分枝杆菌、支原体、立克次氏体或衣原体抗原。原生动物和其他寄生虫抗原的实例包括但不限于恶性疟原虫抗原,诸如裂殖子表面抗原、子孢子表面抗原、环子孢子抗原、配子体/配子表面抗原、红内期抗原pf 155/RESA以及其他疟原虫抗原成分;弓形虫抗原,诸如SAG-1、p30以及其他弓形虫抗原成分;血吸虫抗原,诸如谷胱甘肽-S-转移酶、副肌球蛋白以及其他血吸虫抗原成分;利什曼原虫主要和其他利什曼原虫抗原,诸如gp63、磷脂多糖及其相关蛋白以及其他利什曼原虫抗原成分;以及克氏锥虫抗原,诸如75-77kDa抗原、56kDa抗原以及其他锥虫抗原成分。真菌抗原的实例包括但不限于得自假丝酵母属(Candida species)、曲霉属(Aspergillus species)、芽生菌属(Blastomycesspecies)、组织胞浆菌属(Histoplasma species)、球孢子菌属(Coccidiodomycosis species)、糠秕马拉色菌(Malassezia furfur)及其他属、威尼克外瓶霉(Exophiala werneckii)及其他属、霍塔氏毛孢子菌(Piedraia hortai)及其他属、白氏毛孢子菌(Trichosporum beigelii)及其他属、小孢子癣菌属(Microsporum species)、毛癣菌属(Trichophytonspecies)、表皮癣菌属(Epidermophyton species)、申克氏孢子丝菌(Sporothrix schenckii)及其他属、裴氏着色霉(Fonsecaea pedrosoi)及其他属、皮炎万氏霉(Wangiella dermatitidis)及其他属、波氏假阿利什菌(Pseudallescheria boydii)及其他属、灰马杜拉分枝菌(Madurella grisea)及其他属、根霉属(Rhizopus species)、犁头霉属(Absidia species)以及毛霉菌属(Mucor species)的抗原。朊病毒病抗原的实例包括PrP、β-淀粉样蛋白以及其他朊病毒相关蛋白。

[0102] 除了上文提及的感染原和寄生虫原外,所需的对非感染性原的增强免疫原性的另一领域为增殖异常(dysproliferative)疾病领域,包括但不限于癌症,其中表达癌抗原的细胞有利地从体内消除。可用于本发明的组合物和方法中的肿瘤抗原包括但不限前列腺特异性抗原(PSA)、乳腺、膀胱、卵巢、睾丸、黑素瘤、端粒酶;多药抗性蛋白,诸如P-糖蛋白;MAGE-1、α-甲胎蛋白、癌胚抗原、突变体p53、乳头瘤病毒抗原、神经节苷脂或者黑素瘤或其他肿瘤细胞的其他含碳水化合物成分。本发明设想得自任何类型的肿瘤细胞的抗原均可用于本文所述的组合物和方法。抗原可以是癌细胞或从癌细胞分离的致免疫物质,诸如膜蛋白。其包括生存素和端粒酶通用抗原以及睾丸癌抗原的MAGE家族。已证明涉及在自身免疫中并可用于本发明的方法以诱导耐性的抗原包括但不限于髓鞘碱性蛋白、髓鞘少突胶质细胞糖蛋白以及多发性硬化的蛋白脂质蛋白和类风湿性关节炎的C Ⅱ胶原蛋白。

[0103] 作为非限制性实例,抗原可以是感染原诸如HZV-1、EBV、HBV、流感病毒、SARS病毒、痘病毒、疟疾或HSV的一部分,而需要针对其的调动强T细胞介导的免疫(通过树突状细胞)的疫苗。

[0104] 术语“肿瘤”是指至少一个细胞或组织赘生物形式的细胞团块,尤其是内源性组织的自发、自主和不可逆的或多或少脱抑制的过度生长形式,所述生长通常与或多或少的特定细胞和组织功能明显丧失相关。此细胞或细胞团块通过自身或通过宿主生物(如黑素瘤或淋巴瘤)的调节机制在其生长方面无有效抑制。肿瘤抗原不仅包括存在于恶性肿瘤细胞本身中或其上的抗原,还包括存在于肿瘤的基质支持组织(包括内皮细胞和其他血管成分)上的抗原。

[0105] 如本文所用,术语“免疫应答”包括受T细胞协同刺激的调节影响的T细胞介导的

和/或免疫B细胞介导的免疫应答。示例性免疫应答包括B细胞应答(如抗体产生)、T细胞应答(如细胞因子产生和细胞毒性)以及细胞因子应答细胞(如巨噬细胞)的活化。如本文所用,关于免疫应答的术语"下调"包括任何一种或多种免疫应答的降低,而关于免疫应答的术语"上调"则包括任何一种或多种免疫应答的升高。应当理解,一种类型的免疫应答的上调可导致另一种类型的免疫应答的相应下调。例如,产生某些细胞因子(如IL-10)的上调可导致细胞免疫应答的下调。

[0106] 如本文所用,术语"协同刺激受体"包括将协同刺激信号传递给免疫细胞的受体,如CD28或ICOS。如本文所用,术语"抑制性受体"包括将负信号传递给免疫细胞的受体。

[0107] 如本文所用,关于活化的免疫细胞的术语"协同刺激"包括协同刺激分子提供第二、非活化、受体介导的信号("协同刺激信号")的能力,所述信号诱导增殖或效应子功能。例如,协同刺激信号可导致细胞因子分泌,如在收到了T细胞受体介导的信号的T细胞中。收到了细胞受体介导的信号(如通过活化受体)的免疫细胞在本文中称为"活化的免疫细胞"。

[0108] 通过抑制性受体转导的抑制性信号即使协同刺激受体(诸如CD28或ICOS)不存在于免疫细胞上时也可发生,并因此不只是取决于抑制性受体与协同刺激受体之间对协同刺激分子结合的竞争(Fallarino等(1998)J.Exp.Med.188:205)。抑制性信号向免疫细胞的传递可导致免疫细胞无应答性、无能或程序性细胞死亡。优选地,抑制性信号的传递通过不涉及细胞凋亡的机制运行。

[0109] 如本文所用,术语"细胞凋亡"包括可使用本领域已知的技术表征的程序性细胞死亡。凋亡细胞死亡可例如通过细胞萎缩、膜起泡以及以细胞壁破壁而终结的染色质凝聚来表征。发生细胞凋亡的细胞还显示出核内核小体DNA裂解的特征性模式。

[0110] 本文的术语"自身免疫"或"自身免疫疾病或病症"是由个体自身组织引起或针对个体自身组织的疾病或失调,或其共分离(co-segregate)或表现,或由其产生的病症。自身免疫疾病或失调的实例包括但不限于:关节炎(类风湿性关节炎诸如急性关节炎、慢性类风湿性关节炎、痛风性关节炎、急性痛风关节炎、慢性炎症性关节炎、退化性关节炎、感染性关节炎、莱姆关节炎、增生性关节炎、银屑病性关节炎、椎关节炎、幼年型类风湿性关节炎、骨关节炎、慢性进行性关节炎(arthritis chronica progrediente)、变形性关节炎、原发慢性多发性关节炎(polyarthritis chronica primaria)、反应性关节炎和强直性脊柱炎)、炎症性增生性皮肤疾病、银屑病如斑块型银屑病、滴状银屑病、脓疱型银屑病和指甲银屑病、皮炎(包括接触性皮炎、慢性接触性皮炎、过敏性皮炎、过敏性接触性皮炎、疱疹样皮炎和特应性皮炎)、X连锁高IgM综合征、荨麻疹如慢性过敏性荨麻疹和慢性特发性荨麻疹(包括慢性自身免疫性荨麻疹)、多发性肌炎/皮肌炎、幼年型皮肌炎、中毒性表皮坏死松解症、硬皮病(包括系统性硬皮病)、硬化症诸如系统性硬化症、多发性硬化症(MS)诸如视神经脊髓型MS(spino-optical MS)、原发性进展型MS(PPMS)和复发缓解型MS(RRMS)、进行性系统性硬化症、动脉粥样硬化、动脉硬化、播散性硬化和共济失调硬化症、炎症性肠道疾病(IBD)(例如克罗恩病、自身免疫介导的胃肠疾病、结肠炎诸如溃疡性结肠炎、溃疡性结肠炎、显微镜性结肠炎、胶原性结肠炎、息肉状结肠炎、坏死性小肠结肠炎、和透壁性结肠炎和自身免疫性炎症性肠道疾病)、坏疽性脓皮病、结节性红斑、原发性硬化性胆管炎、表层巩膜炎、呼吸窘迫综合征(包括成人或急性呼吸窘迫综合征(ARDS))、脑膜炎、全部或部分葡萄膜的炎症、虹膜炎、脉络膜炎、一种自身免疫性血液疾病、、类风湿性脊柱炎、突发性听力丧失、IgE

介导的疾病诸如过敏反应和过敏性和特应性鼻炎、脑炎诸如拉斯马森脑炎、和边缘叶和/或脑干脑炎、葡萄膜炎诸如前葡萄膜炎、急性前葡萄膜炎、颗粒性葡萄膜炎、非颗粒性葡萄膜炎、晶状体抗原性葡萄膜炎、后葡萄膜炎或自身免疫性葡萄膜炎、伴有及不伴有肾病综合征的肾小球肾炎(GN)诸如慢性或急性肾小球肾炎诸如原发性GN、免疫介导的GN、膜性GN(膜性肾病)、特发性膜性GN或特发性膜性肾病、膜或膜性增生性GN(MPGN)(包括I型和II型)、和快速进展性GN、过敏性疾病、过敏反应、湿疹(包括过敏性或特应性湿疹)、哮喘诸如支气管哮喘和自身免疫哮喘、涉及T细胞浸润和慢性炎症反应的病症、慢性肺部炎性疾病、自身免疫性心肌炎、白细胞粘附缺陷病、系统性红斑狼疮(SLE)诸如皮肤红斑性狼疮、亚急性皮肤型红斑狼疮、新生儿狼疮综合征(NLE)、播散性红斑狼疮、狼疮(包括肾炎、脑炎、小儿、非肾性、肾外、盘状、脱发)、幼年型(I型)糖尿病(包括小儿胰岛素依赖型糖尿病(IDDM))、成年型糖尿病(II型糖尿病)、自身免疫性糖尿病、特发性尿崩症、与细胞因子和T淋巴细胞介导的急性和迟发性超敏反应相关的免疫应答、结核病、结节病、肉芽肿病(包括淋巴瘤样肉芽肿病、韦格纳氏肉芽肿病)、粒细胞缺乏症、血管炎病(包括血管炎(包括大血管炎(包括风湿性多肌痛和巨细胞(大动脉炎)动脉炎)、中血管炎(包括川崎病和结节性多动脉炎)、显微镜下多动脉炎、中枢神经系统血管炎、坏死性、皮肤性或过敏性血管炎、系统性坏死性血管炎、ANCA相关性血管炎,诸如变应性肉芽肿性血管炎或综合征(CSS))、颞动脉炎、再生障碍性贫血、自身免疫再生障碍性贫血、库氏试验阳性贫血、先天性纯红细胞再生障碍性贫血、溶血性贫血或免疫性溶血性贫血(包括自身免疫性溶血性贫血(AIHA)、恶性贫血(anemia pemiciosa)、阿狄森氏病、纯红细胞性贫血和再生障碍(PRCA))、第八因子缺乏症、甲型血友病、自身免疫性中性粒细胞减少症、全血细胞减少症、白细胞减少症、涉及白细胞渗出的疾病、中枢神经系统炎症性疾病、多器官损伤综合征诸如继发于败血症、创伤或出血的那些、抗原-抗体复合物介导的疾病、抗肾小球基底膜疾病、抗磷脂抗体综合征、过敏性神经炎、白塞病、Castleman综合征、肺出血-肾炎综合征、雷诺氏综合征、干燥综合征、史帝文-强生症候群、类天疱疮诸如大疱性类天疱疮和皮肤类天疱疮、天疱疮(包括寻常型天疱疮、落叶型天疱疮、天疱疮粘膜类天疱疮和红斑型天疱疮)、自身免疫性多内分泌腺病、赖特病或综合征、免疫复合物性肾炎、抗体介导的肾炎、视神经脊髓炎、多发性神经病、慢性神经病变诸如IgM多发性神经病或IgM介导的神经病变、血小板减少(例如,由心肌梗塞患者发生的)(包括血栓性血小板减少性紫癜(TTP)和自身免疫或免疫介导的血小板减少诸如特发性血小板减少性紫癜(ITP)(包括慢性或急性ITP))、睾丸和卵巢自身免疫疾病(包括自身免疫性睾丸炎和卵巢炎)、原发性甲状腺功能减退症、甲状旁腺功能减退症、自身免疫性内分泌疾病(包括甲状腺炎诸如自身免疫性甲状腺炎)、桥本氏病、慢性甲状腺炎(桥本甲状腺炎);或亚急性甲状腺炎、自身免疫性甲状腺疾病、特发性甲状腺功能减退症、格雷夫斯病、多腺体综合征诸如自身免疫性多腺体综合征(或腺体内分泌综合征)、副肿瘤综合征(包括神经系统副肿瘤性综合征诸如兰伯特-伊顿肌无力综合征或伊顿-兰伯特综合征)、僵人综合征、脑脊髓炎诸如过敏性脑脊髓炎或过敏型脑脊髓炎和实验性过敏性脑脊髓炎(EAE)、重症肌无力诸如胸腺瘤相关重症肌无力、小脑变性、神经性肌强直、斜视眼阵挛或眼阵挛-肌阵挛综合征(OMS)、和感觉神经病变、多灶性运动神经病变、席汉氏综合征、自身免疫性肝炎、慢性肝炎、狼疮样肝炎、巨细胞肝炎、慢性活动性肝炎或自身免疫性慢性活动性肝炎、淋巴细胞性间质性肺炎、闭塞性细支气管炎(非移植)与NSIP、格林-巴利综合征、伯杰疾病(IgA肾病)、特发

性IgA肾病、线状IgA皮肤病、原发性胆汁性肝硬化、肺硬变、自身免疫性肠病综合征、脂泻病、乳糜泻、口炎性腹泻(麦胶性肠病)、顽固性口炎性腹泻、特发性口炎性腹泻、冷球蛋白血症、肌萎缩侧索硬化症(ALS;葛雷克氏症)、冠状动脉疾病、自身免疫性耳部疾病诸如自身免疫性内耳病(AGED)、自身免疫性听力损失、眼阵挛-肌阵挛综合征(OMS)、多软骨炎诸如难治性或复发性多软骨炎、肺泡蛋白沉积症、淀粉样变性、巩膜炎、一种非癌性原发性淋巴细胞增多,一种原发性淋巴细胞增多症(包括单克隆B细胞淋巴细胞增多症(例如,良性单克隆丙种球蛋白病和意义未明的单克隆丙种球蛋白病,MGUS))、周围神经病变、副肿瘤综合征、离子通道病诸如癫痫、偏头痛、心律不齐、肌肉疾病、耳聋、失明、周期性麻痹、和中枢神经系统离子通道病、自闭症、炎症性肌病、局灶节段性肾小球硬化(FSGS)、内分泌性眼病、葡萄膜视网膜炎、脉络膜视网膜炎、自身免疫性血液病、纤维肌痛、多发性内分泌失调、施密特综合征、肾上腺炎、胃萎缩、早老性痴呆、脱髓鞘性疾病诸如自身免疫性脱髓鞘性疾病、糖尿病性肾病、心肌梗塞后综合征、圆形脱毛症、CREST综合征(钙质沉着,雷诺氏现象、食管运动功能障碍、指硬皮病和毛细血管扩张症)、男性和女性自身免疫性不育、混合性结缔组织病、恰加斯氏病、风湿热,复发性流产、农民肺、多形性红斑、心脏切开后综合征、库欣综合征、养鸟人肺、变应性肉芽肿血管炎、良性淋巴细胞性脉管炎、Alport综合征、肺泡炎诸如过敏性肺泡炎及纤维化肺泡炎、间质性肺病、输血反应、麻风病、疟疾、利什曼病、kypanosomiasis、血吸虫病、蛔虫病、曲霉病、Sampter综合征、卡普兰综合征、登革热、心内膜炎、心内膜心肌纤维化、弥漫性肺间质纤维化、肺间质纤维化、特发性肺纤维化、囊性纤维化、眼内炎、持久性隆起性红斑(erythema elevatum et diutinum)、胎儿成红细胞增多病、嗜酸性筋膜炎、舒尔曼综合征、Felly综合征、丝虫病、睫状体炎诸如慢性睫状体炎、异色性睫状体炎、虹膜睫状体炎或Fuch睫状体炎、过敏性紫癜、人类免疫缺陷病毒(HIV)感染、埃可病毒感染、心肌病、阿尔茨海默氏病、细小病毒感染、风疹病毒感染、接种后综合征、先天性风疹感染、EB病毒感染、腮腺炎、Evan综合征、自身免疫性腺衰竭、西德纳姆舞蹈病、链球菌感染后肾炎、血栓闭塞性脉管炎、甲状腺毒症、脊髓痨、绒膜炎、巨细胞性多肌痛、内分泌性眼疾、慢性过敏性肺炎、干燥性角结膜炎、流行性角结膜炎、特发性肾病综合征、微小病变性肾病、良性家族性和缺血-再灌注损伤、视网膜自身免疫性疾病、关节炎、支气管炎、慢性阻塞性气道疾病、矽肺、口疮、阿弗他口炎、动脉硬化性疾病、aspermiogenese、自身免疫性溶血、Boeck病、冷沉球蛋白血症、杜普伊特伦挛缩、水晶体过敏性内眼球炎(endophthalmia phacoanaphylactica)、过敏性肠炎(enteritisallergica)、麻风结节性红斑、特发性面神经瘫痪、慢性疲劳综合征、风湿性发热(febris rheumatica)、Hamman-Rich病、感音神经性耳聋、血红素尿症发作(haemoglobinuria paroxysmatica)、性腺机能减退、区域性回肠炎(ileitis regionalis)、白细胞减少、传染性单核细胞增多症、横贯性脊髓炎、原发性特发性粘液水肿、肾病、交感神经性眼炎(ophthalmia symphatica)、肉芽肿性睾丸炎(orchitis granulomatosa)、胰腺炎、急性多神经根炎(polyradiculitis acuta)、坏疽性脓皮病、Quervain甲状腺炎、获得性脾萎缩、因抗精原细胞抗体导致的不育、非恶性胸腺瘤、白癜风、SCID和EB病毒相关疾病、获得性免疫缺陷综合征(AIDS)、寄生虫病诸如利什曼虫病、中毒性休克综合征、食物中毒、涉及T细胞浸润的病症、白细胞粘附缺陷、与细胞因子和T淋巴细胞介导的急性和迟发性超敏反应相关的免疫应答、涉及白细胞渗出的疾病、多器官损伤综合征、抗原-抗体复合物介导的疾病、抗肾小球基底膜疾病、过敏性神经炎、自身免疫性多内分

泌腺病、卵巢炎、原发性粘液性水肿、自身免疫性萎缩性胃炎、交感性眼炎、风湿性疾病、混合性结缔组织病、肾病综合征、胰岛炎、多内分泌不良、周围神经病变、自身免疫多腺体综合征I型、成年发病型特发性甲状旁腺功能减退症(AOIH)、全秃、扩张型心肌病、获得性大疱性表皮松解症(EBA)、血色沉着病、心肌病、肾病综合征、原发性硬化性胆管炎、化脓性鼻窦炎或非化脓性鼻窦炎、急性或慢性鼻窦炎、筛窦、额窦、上颌窦或蝶窦炎、嗜酸性粒细胞相关疾病诸如嗜酸性粒细胞增多、肺嗜酸性细胞浸润症、嗜酸性粒细胞增多-肌痛综合征、吕弗勒氏综合征、慢性嗜酸性粒细胞性肺炎、热带肺嗜酸性粒细胞增多、支气管肺曲霉病、曲霉肿或含嗜酸性粒细胞的肉芽肿、过敏性症、血清阴性脊柱关节病、多内分泌自身免疫性疾病、硬化性胆管炎、巩膜、巩膜外层、慢性皮肤粘膜念珠菌病、Bruton综合征、婴儿短暂性低丙种球蛋白血症、Wiskott-Aldrich综合征、共济失调毛细血管扩张症、与胶原疾病相关的自身免疫紊乱、胶原性疾病、风湿病、神经性疾病、缺血性再灌注障碍、血压反应降低、血管功能障碍、脉管扩张(antgiectasis)、组织损伤、心血管缺血、痛觉过敏、脑缺血、以及伴随血管化的疾病、过敏性超敏反应紊乱、肾小球性肾炎、再灌注损伤、心肌或其他组织再灌注损伤、含急性炎症成分的皮肤病、急性化脓性脑膜炎或其他中枢神经系统炎症疾病、眼睛和眼眶炎性疾病、粒细胞输注相关综合征、细胞因子诱导的毒性、急性严重炎症、慢性顽固性炎症、肾盂炎、肺硬变、糖尿病视网膜病变、糖尿病大动脉疾病、子宫内膜增生、消化性溃疡、心瓣炎和子宫内膜异位。

[0111] 术语“癌症”和“癌性”是指或描述哺乳动物中特征通常在于不受调控的细胞生长的生理状况。癌症的实例包括但不限于恶性肿瘤、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤和白血病。此类癌症的更具体实例包括鳞状细胞癌、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌(包括胃肠癌)、胰腺癌、恶性胶质瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝恶性肿瘤和各种类型的头颈癌以及B细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡非霍奇金淋巴瘤(NHL);小淋巴细胞性(SL)NHL;中级/滤泡NHL;中级弥散性NHL;高级免疫母细胞NHL;高级淋巴母细胞NHL;高级小无裂细胞NHL;肿块性NHL;套细胞淋巴瘤;AIDS相关淋巴瘤;和瓦氏巨球蛋白血症);慢性淋巴细胞性白血病(CLL);急性淋巴母细胞性白血病(ALL);毛细胞白血病;慢性髓性白血病;多发性骨髓瘤和移植后淋巴细胞增殖性疾病(PTLD)。

[0112] 短语“过敏性疾病”是指涉及过敏反应的疾病。更具体地讲,“过敏性疾病”定义为鉴定了其过敏原的疾病,其中在暴露于该过敏原与发生病理变化之间存在强相关性,并且其中已证实该病理变化具有免疫学机制。在本文中,免疫学机制是指白细胞对免疫原刺激表现出免疫应答。过敏原的实例包括螨虫抗原和花粉抗原。代表性过敏性疾病包括支气管哮喘、过敏性鼻炎、特应性皮炎以及花粉和昆虫过敏。过敏体质是会由过敏父母的孩子继承的遗传因素。家族过敏性疾病也称为特应性疾病,而致病的遗传因素为特应性体质。“特应性皮炎”是特应性疾病,特别是伴有皮炎症状的疾病的一般性术语。优选的实例包括选自由湿疹、过敏性鼻炎、枯草热、荨麻疹和食物过敏组成的组的过敏病症。过敏病症包括湿疹、过敏性鼻炎、枯草热、支气管哮喘、荨麻疹和食物过敏以及其他特应性病症。

[0113] “哮喘”是指特征在于炎症、呼吸道变窄以及呼吸道对吸入物的反应性增加的呼吸系统疾病。哮喘较为常见,但不仅仅与特应性或过敏性症状相关。

[0114] 本文的短语“炎性病症或炎性疾病”包括慢性或急性炎性疾病，包括选自由下列组成的组的疾病或病症：风湿性疾病(包括但不限于类风湿性关节炎、骨关节炎、银屑病性关节炎)、脊椎关节病(包括但不限于强直性脊柱炎、反应性关节炎和赖特综合征)、结晶性关节病(包括但不限于痛风、假痛风、焦磷酸钙沉着症)、莱姆病、风湿性多肌痛；结缔组织疾病(包括但不限于系统性红斑狼疮、系统性硬化症、多肌炎、皮肌炎、干燥综合征)；血管炎病(包括但不限于结节性多动脉炎、韦格纳氏肉芽肿病、变应性肉芽肿性血管炎)；炎性病症(包括创伤或局部缺血的结果、结节病)；血管疾病(包括粥样硬化血管疾病、动脉硬化和血管阻塞性疾病(包括但不限于动脉硬化、缺血性心脏病、心肌梗塞、中风、外周血管疾病)以及血管支架再狭窄)；眼病(包括葡萄膜炎、角膜疾病、虹膜炎、虹膜睫状体炎和白内障)。

[0115] 适合由本发明治疗的术语“癌症”包括但不限于恶性肿瘤、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤和白血病或淋巴恶性肿瘤。此类癌症的更具体实例包括膀胱癌、卵巢癌、黑素瘤、鳞状细胞癌、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌(包括胃肠癌)、胰腺癌、恶性胶质瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝恶性肿瘤和各种类型的头颈癌以及B细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡非霍奇金淋巴瘤(NHL)；小淋巴细胞性(SL)NHL；中级/滤泡NHL；中级弥散性NHL；高级免疫母细胞NHL；高级淋巴母细胞NHL；高级小无裂细胞NHL；肿块性NHL；套细胞淋巴瘤；AIDS相关淋巴瘤；和瓦氏巨球蛋白血症)；慢性淋巴细胞性白血病(CLL)；急性淋巴母细胞性白血病(ALL)；毛细胞白血病；慢性髓性白血病；和移植后淋巴细胞增殖性疾病(PTLD)以及与瘢痣病相关的异常血管增殖、浮肿(诸如与脑瘤相关)和梅格斯综合征。优选地，癌症选自由下列组成的组：乳腺癌、结直肠癌、直肠癌、非小细胞肺癌、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、肾细胞癌、前列腺癌、肝癌、胰腺癌、软组织肉瘤、卡波西氏肉瘤、良性肿瘤、恶性肿瘤、头颈癌、黑素瘤、卵巢癌、间皮瘤和多发性骨髓瘤。在一个示例性实施方案中(参见工作实施例)，癌症为早晚期(包括转移性)膀胱癌、卵巢癌或黑素瘤。在另一个实施方案中，癌症为结直肠癌。适合由本发明治疗的癌性病症包括转移癌，其中通过髓源性抑制细胞的VISTA表达抑制抗肿瘤应答和抗侵袭免疫应答。本发明的方法尤其适合用于治疗血管化肿瘤。

[0116] 本发明还适于与化疗或放疗或其他生物疗法相结合来治疗癌症以及增强它们的活性，即，在其中髓源性抑制细胞的VISTA表达抑制抗肿瘤应答以及化疗或放疗或生物疗法疗效的个体中。根据本发明可使用任何表现出抗癌活性的化疗剂。优选地，化疗剂选自由下列组成的组：烷化剂、抗代谢物、叶酸类似物、嘧啶类似物、嘌呤类似物及相关抑制剂、长春花生物碱、表鬼臼毒素、抗生素、L-天冬酰胺酶、拓扑异构酶抑制剂、干扰素、铂配位复合物、蒽二酮取代的脲、甲肼衍生物、肾上腺皮质抑制剂、肾上腺皮质激素、孕酮、雌激素、抗雌激素、雄激素、抗雄激素和促性腺素释放激素类似物。更优选地，化疗剂选自由下列组成的组：5-氟尿嘧啶(5-FU)、亚叶酸(LV)、伊立替康、奥沙利铂、卡培他滨、紫杉醇和多西紫杉醇。可与抗VEGF抗体的施用相结合，以“混合物(cocktail)”方式施用两种或更多种化疗剂。一种优选的联合化疗基于氟尿嘧啶，包括5-FU和一种或多种其他化疗剂。联合化疗的合适的给药方案在本领域中是已知的，并在例如Saltz等(1999)Proc ASCO 18:233a和Douillard等(2000)Lancet355:1041-7中有所描述。生物制品可以是另一种免疫增强剂，诸如抗PD-L1、PD-L2、CTLA-4抗体和PD-L1、PD-L2、CTLA-4融合蛋白以及细胞因子、生长因子拮抗剂和激动

剂、激素以及抗抗细胞因子抗体。

[0117] 取决于结合到受体的PD-L3OR VISTA分子的形式，信号可以被传递(例如，通过导致受体交联的多价形式的PD-L3OR VISTA分子，或通过结合到抗原呈递细胞上的Fc受体的可溶形式的PD-L3ORVISTA)或抑制(例如，通过可溶、单价形式的PD-L3OR VISTA分子，或使用本领域已知的方法改变以使得不结合到抗原呈递细胞上的Fc受体的可溶形式的PD-L3OR VISTA)，例如通过与活化形式的PD-L3OR VISTA分子竞争与受体的结合。然而，存在其中可溶性分子能起刺激作用的情况。各种调节剂的作用可使用本文所述的常规筛选检测分析法容易地证实。

[0118] 如本文所用，术语“活化受体”包括结合抗原、复合抗原(如，在MHC分子的背景下)或抗体的免疫细胞受体。此类活化受体包括T细胞受体(TCR)、B细胞受体(BCR)、细胞因子受体、LPS受体、互补序列受体和Fc受体。

[0119] 例如，T细胞受体存在于T细胞上并与CD3分子相关。T细胞受体在MHC分子的背景下受抗原刺激(以及受多克隆T细胞活化试剂刺激)。通过TCR发生的T细胞活化导致许多变化，如蛋白磷酸化、膜脂质变化、离子流、环核苷酸改变、RNA转录变化、蛋白合成变化以及细胞容积变化。

[0120] 如本文所用的术语“B细胞受体”(BCR)包括存在于B细胞上的膜Ig(mIg)与其他跨膜多肽(如Igα和Igβ)之间的复合物。mIg的信号转导功能通过寡聚抗原或多聚抗原由受体分子的交联触发。B细胞也可通过抗免疫球蛋白抗体活化。在BCR活化时，在B细胞中将发生许多变化，包括酪氨酸磷酸化。

[0121] 术语“Fc受体”(FcR)包括免疫球蛋白分子(Ig)的Fc部分的细胞表面受体。Fc受体存在于许多参与免疫应答的细胞上。在迄今为止已鉴定的人FcR中，为识别IgG(命名为FcγR)、IgE(FcεR1)、IgA(FcαR)和多聚IgM/A(Fcμ/αR)的那些。FcR存在于以下细胞类型中：FcεRI(肥大细胞)、FcεRⅡ(许多白细胞)、FcαR(中性粒细胞)和FcμαR(腺上皮、肝细胞)(Hogg，N.(1988)Immunol.Today 9:185-86)。得到广泛研究的FcγR在细胞免疫防御中处于核心地位，并负责刺激自身免疫疾病发病中涉及到的炎症和水解酶的介体的释放(Unkeless，J.C(1988)Annu.Rev.Immunol.6:251-87)。FcγR在效应细胞与分泌Ig的淋巴细胞之间提供重要的联系，因为巨噬细胞/单核细胞、多形核白细胞以及自然杀伤(NK)细胞FcγR赋予IgG介导的特异性识别的元件。人白细胞具有IgG的至少三个不同的受体：hFcγRI(存在于单核细胞/巨噬细胞上)、hFcγRⅡ(存在于单核细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、血小板、可能有B细胞和K562细胞系上)以及FcγⅢ(存在于NK细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和巨噬细胞上)。

[0122] 关于T细胞，协同刺激信号向T细胞的传递涉及不受环孢菌素A抑制的信号通路。此外，协同刺激信号可在T细胞中诱导细胞因子分泌(如IL-2和/或IL-10)和/或可在T细胞中防止诱导对抗原的无应答性、诱导无能或诱导细胞死亡。

[0123] 如本文所用，术语“抑制性信号”是指通过免疫细胞上的抑制性受体分子传递的信号。这样的信号通过活化受体(如通过TCR、CD3、BCR或Fc分子)拮抗信号并可导致例如以下方面的抑制：第二信使产生；增殖；或免疫细胞中的效应子功能，如减弱吞噬作用、减少抗体产生、降低细胞毒性或使免疫细胞无法产生介体(诸如细胞因子(如IL-2)和/或变应性反应介体)；或发展无能。

[0124] 如本文所用，术语“无应答性”包括免疫细胞对刺激（例如，通过活化受体或细胞因子的刺激）的折射性。无应答性可例如由于暴露于免疫抑制剂或高剂量的抗原而发生。

[0125] 如本文所用，术语“无能”或“耐受”包括对活化受体介导的刺激的折射性。这种折射性通常为抗原特异性的，并在停止暴露于耐受抗原后仍然存在。例如，T细胞中的无能（与无应答性相对）的特征在于缺乏细胞因子的产生，如IL-2。T细胞无能在T细胞暴露于抗原并在不存在第二信号（协同刺激信号）的情况下收到第一信号（T细胞受体或CD-3介导的信号）时发生。在这些条件下，再次将细胞暴露于相同的抗原（即便再次暴露在存在协同刺激分子的情况下发生）将导致不能产生细胞因子，并因此不能增殖。然而，无能T细胞可发生对不相关抗原的应答，并可在用细胞因子（如IL-2）培养时增殖。例如，T细胞无能也可通过T淋巴细胞缺乏IL-2的产生而观察到，如通过ELISA或通过使用指示细胞系的增殖检测分析法测量。可选地，可使用报告基因构建体。例如，无能T细胞不能引发通过异源启动子在5’IL-2基因增强子控制下或通过可存在于增强子内的API序列的多聚体诱导的IL-2基因转录（Kang等(1992)Science 257:1134）。

[0126] 协同刺激信号的调节导致免疫细胞效应子功能的调节。因此，术语“PD-L3OR VISTA活性”包括PD-L3OR VISTA多肽结合到其天然结合伴侣的能力、调节免疫细胞协同刺激性或抑制性信号的能力以及调节免疫应答的能力。

[0127] 免疫细胞中抑制性信号的调节导致免疫细胞增殖和/或免疫细胞分泌细胞因子受到调节。

[0128] 如本文所用，“天然存在的”核酸分子是指具有存在于自然界中的核苷酸序列（例如，编码天然蛋白）的RNA或DNA分子。

[0129] 如本文所用，“反义”核酸分子包含与编码蛋白的“有义”核酸互补的核苷酸序列，例如与双链cDNA分子的编码链互补、与mRNA序列互补或与基因的编码链互补。因此，反义核酸分子可通过氢键结合到有义核酸分子。

[0130] 如本文所用，术语“编码区”是指包含翻译成氨基酸残基的密码子的核苷酸序列区域，而术语“非编码区”是指不翻译成氨基酸的核苷酸序列区域（例如，5’和3′非翻译区）。

[0131] 如本文所用，术语“载体”是指能够转运其所连接到的另一核酸分子的核酸分子。一种类型的载体为“质粒”，它是指可向其中连接另外的DNA片段的环状双链DNA环。另一种类型的载体为病毒载体，其中可将另外的DNA片段连接到病毒基因组中。某些载体能够在它们所引入的宿主细胞中自主复制（如，具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体）。其他载体（如非附加型哺乳动物载体）在引入宿主细胞中时整合进宿主细胞的基因组，并因而随宿主基因组一起复制。此外，某些载体能够指导它们有效连接的基因的表达。此类载体在本文称为“重组表达载体”或简称为“表达载体”。一般来讲，在重组DNA技术中有用的表达载体通常为质粒的形式。在本说明书中，“质粒”和“载体”可互换使用，因为质粒是最常用的载体形式。然而，本发明旨在包括此类发挥等同功能的其他形式的表达载体，诸如病毒载体（如复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒）。

[0132] 如本文所用，术语“宿主细胞”意指已向其中引入了本发明的核酸分子诸如本发明的重组表达载体的细胞。术语“宿主细胞”和“重组宿主细胞”可在本文互换使用。应当理解，此类术语不仅指代特定的受试者细胞，还指代这样的细胞的子代或潜在子代。由于某些修饰可能会因突变或环境影响而在后代中发生，因此这种子代事实上可以不与亲代细胞相

同，但仍包括在如本文所用的术语的范围内。

[0133] 如本文所用，“转基因动物”是指其中动物细胞的一个或多个包含“转基因”的非人动物，优选地为哺乳动物，更优选地为小鼠。术语“转基因”是指整合进转基因动物发育细胞的基因组中并保留在成熟动物基因组中的外源DNA，例如指导转基因动物一种或多种细胞类型或组织中所编码基因产物的表达。

[0134] 如本文所用，“同源重组动物”是指一种类型的转基因非人动物，优选地为哺乳动物，更优选地为小鼠，其中内源性基因已通过内源性基因与动物发育前引入动物细胞(例如动物胚胎细胞)中的外源性DNA分子之间的同源重组而改变。

[0135] 如本文所用，“分离的蛋白”是指当从细胞中分离或通过重组DNA技术产生时基本上不含其他蛋白、细胞物质和培养基的蛋白或当通过化学方法合成时基本上不含化学前体或其他化学物质的蛋白。

[0136] “分离的”或“纯化的”蛋白或其生物活性部分基本上不含PD-L3OR VISTA蛋白所来源的细胞或组织源中的细胞物质或其他污染蛋白，或当通过化学方法合成时基本上不含化学前体或其他化学物质。用语“基本上不含细胞物质”包括这样的PD-L3OR VISTA蛋白制品，其中该蛋白与其从中分离的细胞的细胞成分相分离或通过重组法产生。在一个实施方案中，用语“基本上不含细胞物质”包括具有低于约30%(按干重计)非PD-L3OR VISTA蛋白(在本文也称为“污染蛋白”)，更优选地低于约20%非PD-L3OR VISTA蛋白，还更优选地低于约10%非PD-L3OR VISTA蛋白以及最优选地低于约5%非PD-L3ORVISTA蛋白的PD-L3OR VISTA蛋白制品。当PD-L3OR VISTA蛋白或其生物活性部分通过重组法产生时，还优选的是基本上不含培养基，即，培养基占蛋白制品的体积小于约20%，更优选地小于约10%以及最优选地小于约5%。

[0137] 用语“基本上不含化学前体或其他化学物质”包括其中将蛋白与蛋白合成中涉及到的化学前体或其他化学物质相分离的PD-L3ORVISTA蛋白制品。在一个实施方案中，用语“基本上不含化学前体或其他化学物质”包括具有低于约30%(按干重计)化学前体或非PD-L3OR VISTA化学物质，更优选地低于约20%化学前体或非PD-L3ORVISTA化学物质，还更优选地低于约10%化学前体或非PD-L3ORVISTA化学物质以及最优选地低于约5%化学前体或非PD-L3ORVISTA化学物质的PD-L3OR VISTA蛋白制剂。

[0138] 如本文所用的术语“抗体”包括抗体的“抗原结合部分”(或简称为“抗体部分”)以及整个抗体分子。如本文所用的术语“抗原结合部分”是指保留特异性结合到抗原(如PD-L3OR VISTA)的能力的抗体的一个或多个片段。已表明，抗体的抗原结合功能可通过全长抗体的片段执行。术语抗体的“抗原结合部分”所涵盖的结合片段的实例包括(i)Fab片段，其为由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段；(ii)F(ab')2片段，其为包含由铰链区的二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段；(iii)由VH和CH1结构域组成的Fd片段；(iv)由抗体的单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段；(v)dAb片段(Ward等(1989)Nature 341:544-546)，其由VH结构域组成；以及(vi)分离的互补决定区(CDR)。此外，虽然Fv片段的两个结构域VL和VH由单独的基因编码，但是它们可通过合成接头使用重组方法而接合，所述合成接头使得它们能够制备成单条蛋白链，其中VL和VH区配对形成单价分子(称为单链Fv(scFv)；参见例如Bird等(1988)Science 242:423-426;Huston等(1988)Proc Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883;以及Osbourn等1998Nat.Biotechnol.16:778)。此类单链抗体也旨在包括在术语抗体

的“抗原结合部分”的范围内。特定scFv的任何VH和VL序列均可连接到人免疫球蛋白恒定区cDNA或基因组序列，以便生成编码完整IgG分子或其他同种型的表达载体。VH和V1也可使用蛋白化学或重组DNA技术用于生成Fab、Fv或免疫球蛋白的其他片段。其他形式的单链抗体，诸如双体也包括在内。双体是二价双特异性抗体，其中VH和VL结构域在单条多肽链上表达，但使用太短而不能在同一链上的两个结构域之间配对的接头，从而迫使这两个结构域与另一条链的互补结构域配对并形成两个抗原结合位点(参见例如Holliger,P.等(1993)Proc Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448;Poljak,R.J.等(1994)Structure 2:1121-1123)。

[0139] 更进一步地，抗体或其抗原结合部分可以是通过抗体或抗体部分与一个或多个其他蛋白或肽的共价或非共价结合而形成的更大免疫粘附分子的一部分。此类免疫粘附分子的实例包括使用链霉亲和素核心区制备四聚scFv分子(Kipriyanov,S.M.等(1995)Hum.AntibodiesHybridomas 6:93-101)以及使用半胱氨酸残基、标记肽和C端多组氨酸标签制备二价和生物素化scFv分子(Kipriyanov,S.M.等(1994)Mol Immunol.31:1047-1058)。诸如Fab和F(ab')2片段的抗体部分可由整个抗体使用常规技术(诸如分别通过整个抗体的木瓜酶或胃蛋白酶消化)制成。此外，抗体、抗体部分和免疫粘附分子可使用标准重组DNA技术获得，如本文所述。

[0140] 抗体可以是多克隆或单克隆的；异种的、同种异体的或同基因的；或其修饰形式，例如人源化的、嵌合的等等。优选地，本发明的抗体特异性结合或基本上特异性结合到PD-L3OR VISTA分子。如本文所用的术语“单克隆抗体”和“单克隆抗体组合物”是指这样一组抗体分子，其只含一种能够与抗原的特定表位免疫反应的抗原结合位点，而术语“多克隆抗体”和“多克隆抗体组合物”是指这样一组抗体分子，其含有多种能够与特定抗原相互作用的抗原结合位点。单克隆抗体组合物通常显示出对与其发生免疫反应的特定抗原的单一结合亲和力。

[0141] 如本文所用的术语“人源化抗体”旨在包括通过具有可变区和恒定区的非人细胞制成的抗体，所述可变区和恒定区已发生改变从而与将通过人细胞制备的抗体更加高度相似。例如，通过改变非人抗体氨基酸序列以整合存在于人种系免疫球蛋白序列中的氨基酸。本发明的人源化抗体可包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(如，通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变所引入的突变)，例如在CDR中。如本文所用的术语“人源化抗体”还包括这样的抗体，其中已将衍生自另一种哺乳动物物种(诸如小鼠)种系的CDR序列移植到人构架序列上。

[0142] 如本文所用的“分离的抗体”意指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如，特异性结合PD-L3OR VISTA的分离的抗体基本上不含与除PD-L3OR VISTA以外的抗原特异性结合的抗体)。此外，分离的抗体可以基本上不含其他细胞物质和/或化学物质。

[0143] “寡聚化结构域”在本文是指当连接到VISTA胞外域或其片段时有利于寡聚化的结构域。所述寡聚化结构域包含自缔合α-螺旋，例如亮氨酸拉链结构，其可通过另外的二硫键进一步稳定。这些结构域设计为与跨膜的矢量折叠(vectorial folding)相容，这一过程被认为有利于多肽体内折叠成功能性结合蛋白。其实例在本领域中是已知的，并以举例的方式包括卷曲GCN4以及COMP。

[0144] α-螺旋型卷曲螺旋可能是存在于蛋白中的最广泛的亚单位寡聚化。相应地，卷曲

螺旋发挥许多不同的功能。在转录活化因子的多个家族中，例如，短亮氨酸拉链结构在DNA上布置DNA结合区中发挥着重要作用(Ellenberger等,1992,Cell 71:1223-1237)。卷曲螺旋还用于形成中间丝蛋白的寡聚物。卷曲螺旋蛋白此外似乎还在囊泡和病毒膜融合两者中发挥着重要作用(Skehel和Wiley,1998,Cell95:871-874)。在两种情况中，嵌入待融合的膜中的疏水序列位于由一束长α螺旋构成的杆状复合体的同一端。此分子排列据信会在组装复合体以进行膜融合时导致亲密的膜并列。卷曲螺旋通常用于控制寡聚化。其存在于许多类型的蛋白中，包括转录因子，诸如但不限于GCN4、病毒融合肽、SNARE复合体以及某些tRNA合成酶等等。许多长的卷曲螺旋存在于诸如原肌球蛋白、中间丝蛋白和纺锤极体成分的蛋白中。卷曲螺旋涉及许多α-螺旋，它们围绕彼此以高度组织化形式(以平行或反平行取向缔合)形成超螺旋。但二聚体和三聚体是最常见的。螺旋可以来自相同的或来自不同的蛋白。卷曲螺旋由汇合在一起以埋藏它们的疏水缝的组成螺旋形成。由于疏水缝围绕每个螺旋扭曲，因此螺旋也绕彼此扭曲成圈，从而埋藏疏水缝并形成超螺旋。它是相邻螺旋之间侧链的特征性交错接合，称为结节入洞堆积(knobs-into-holes packing)，其将结构限定为卷曲螺旋。对于发生这种类型的相互作用，螺旋不必以相同的方向行进，但平行构象是最常见的。反平行构象在三聚体中非常罕见，在五聚体中未知，但在分子内二聚体中更常见，其中两个螺旋通常通过短环连接。在细胞外间隙中，异源三聚卷曲螺旋蛋白层粘蛋白在基底膜的形成中起着重要作用。其他实例为血小板反应素和软骨寡聚基质蛋白(COMP)，其中连接了三条(血小板反应素1和2)或五条(血小板反应素3、4和COMP)链。这些分子具有花束样外观，并且它们的寡聚结构的原因可能是C端结构域与细胞受体的多价相互作用。酵母转录活化因子GCN4是超过30种已鉴定的含碱性区亮氨酸拉链结构(bZIP)DNA结合基序的真核蛋白中的1种(Ellenberger等,1992,Cell 71:1223-1237)。bZIP二聚体是一对连续的α螺旋，它们在其羧基末端34个残基上方形成平行的卷曲螺旋并朝其氨基末端逐渐分开以通过DNA结合位点的大沟。卷曲螺旋二聚化接口几乎垂直于DNA轴线取向，从而使复合体具有字母T外观。bZIP包含疏水非极性残基的4-3七肽重复区域，这些残基以平行的α螺旋型卷曲螺旋堆叠在一起(Ellenberger等,1992,Cell71:1223-1237)。二聚体的稳定性由以下方面产生：亮氨酸以及七肽重复区域a和d位的非极性残基的并列型堆积(side-by-side packing)以及有限数量的螺旋内和螺旋间盐桥，如在GCN4亮氨酸拉链肽的晶体结构中所示(Ellenberger等,1992,Cell 71:1223-1237)。另一个实例为从牛气管软骨中作为Mr 52,000亚单位的同源三聚体而分离的CMP(母系蛋白-1)(Paulsson和Heinegard,1981,Biochem J.197:367-375)，其中每个亚单位由一个vWFA1模块、单个EGF结构域、一个vWFA2模块以及跨五个七肽的卷曲螺旋结构域组成(Kiss等,1989,J.Biol.Chem.264:8126-8134;Hauser和Paulsson,1994,J.Biol.Chem.269:25747-25753)。经纯化的CMP的电子显微镜分析显示出花束样三聚体结构，其中每个亚单位形成从对应于卷曲螺旋的共同点显露出来的椭圆体(Hauser和Paulsson,1994,J.Biol.Chem.269:25747-25753)。母系蛋白-1中的卷曲螺旋结构域已得到了广泛的研究。三聚体结构在非变性条件下完全还原链间二硫键后得以保持(Hauser和Paulsson,1994,J.Biol.Chem.269:25747-25753)。又一个实例为软骨寡聚基质蛋白(COMP)。非胶原性糖蛋白COMP最初在胶原中鉴定出(Hedbom等,1992,J.Biol.Chem.267:6132-6136)。该蛋白为524kDa的五个亚单位的同源五聚体，其由一个N端七肽重复区(cc)接着四个表皮生长因子(EGF)样结构域(EF)、七个钙结合结构域(T3)和一个C端球状结构域

(TC)组成。根据此结构域的组织化,COMP属于血小板反应素家族。在位置a和d具有优先疏水性残基的七肽重复区(abcdefg)n形成螺旋型卷曲螺旋结构域(Cohen和ParTy,1994,Science 263:488-489)。近来,得到了COMP的重组五链卷曲螺旋结构域(COMPcc)的晶体,并以0.2nm的解析度对其结构进行了解析(Malashkevich等,1996,Science274:761-765)。

[0145] 术语"家族"当涉及本发明的多肽和核酸分子时旨在表示具有共同结构域或基序并具有如本文所定义的充分的氨基酸或核苷酸序列同一性的两种或更多种多肽或核酸分子。此类家族成员可以是天然或非天然存在的,并可来自相同的或不同的物种。例如,一个家族可包含第一种人源多肽以及其他不同的人源多肽,或者作为另外一种选择可包含非人源同系物,如猴多肽。家族成员还可以具有共同的功能特性。

[0146] 例如,本发明的PD-L3OR VISTA多肽的家族优选地包含至少一个"信号肽结构域"。如本文所用,"信号序列"或"信号肽"包括这样的肽,其包含约15个或更多个出现在分泌性和膜结合多肽N端的氨基酸并且包含大量的疏水性氨基酸残基。例如,信号序列包含至少约10-30个氨基酸残基,优选地约15-25个氨基酸残基,更优选地约18-20个氨基酸残基,甚至更优选地约19个氨基酸残基,并具有至少约35-65%,优选地约38-50%,更优选地约40-45%的疏水性氨基酸残基(如缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸或苯丙氨酸)。这样的"信号序列"在本领域中也称为"信号肽",其作用是指导包含这样的序列的多肽形成脂质双层,并在分泌性和膜结合多肽中裂解。如下文所述,信号序列在天然人PD-L3OR VISTA的氨基酸序列中得到了鉴定,还在天然小鼠PD-L3OR VISTA的氨基酸序列中得到了鉴定。

[0147] 在本发明的另一个实施方案中,本发明的PD-L3OR VISTA多肽基于"跨膜结构域"的存在而鉴定。如本文所用,术语"跨膜结构域"包括长度为约15个氨基酸残基的跨越质膜的氨基酸序列。更优选地,跨膜结构域包含约至少20、25、30、35、40或45个氨基酸残基并跨越质膜。跨膜结构域在疏水性残基中富含,并通常具有α-螺旋结构。在一个优选的实施方案中,跨膜结构域的氨基酸中的至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多为疏水性的,如亮氨酸、异亮氨酸、酪氨酸或色氨酸。跨膜结构域在例如Zagotta,W.N.等(1996)Annu.Rev.Neurosci.19:235-263中有所描述,该文献的内容以引用方式并入本文。PDL3的跨膜结构域区在本文中进行了鉴定(参见例如图1)。

[0148] 在另一个实施方案中,本发明的PD-L3OR VISTA分子基于多肽或相应核酸分子中"IgC结构域"的不存在以及"IgV结构域"的存在而鉴定。如本文所用,IgV和IgC结构域在本领域中被认为是Ig超家族成员结构域。这些结构域对应于具有不同折叠模式(称为Ig折叠)的结构单元。Ig折叠由两个β片层的夹心结构构成,每个片层由5-10个氨基酸的反平行β链与大多数但非全部结构域中的两个片层之间的保守二硫键组成。Ig、TCR和MHC分子的IgC结构域共有相同类型的序列模式并称为Ig超家族内的C1组。其他IgC结构域落在其他组内。IgV结构域也共有序列模式并称为V组结构域。IgV结构域长于C结构域并形成另外一对β链。构成IgV结构域的天然人和鼠PD-L3OR VISTA多肽的氨基酸残基可见于图1。IgV结构域的存在可能为PD-L3OR VISTA结合到其天然结合伴侣所必需。

[0149] 在另一个实施方案中,本发明的PD-L3OR VISTA分子基于多肽或相应核酸分子中"胞外域"的存在而鉴定。如本文所用,术语"胞外域"表示从细胞表面作为尾部延伸的N端氨基酸。本发明的胞外域包括IgV结构域并可以包括信号肽结构域。(参见图1)。

[0150] 在再一个实施方案中,本发明的PD-L3OR VISTA分子基于多肽或相应核酸分子中

“胞质结构域”的存在而鉴定。如本文所用，术语“胞质结构域”表示作为尾部延伸进预计包含胞质结构域的细胞的细胞质的C端氨基酸。

[0151] 在一个优选的实施方案中，本发明的PD-L3OR VISTA分子包含至少一个或多个以下结构域：信号肽结构域、IgV结构域、胞外域、跨膜域和胞质域。

[0152] 本发明的分离的多肽，优选地为PD-L3OR VISTA多肽，具有与SEQ ID NO:2或4或5的氨基酸序列足够相同的氨基酸序列并由与SEQ ID NO:1或3或其片段或互补序列足够相同的核苷酸序列编码。如本文所用，术语“足够相同”是指包含与第二氨基酸或核苷酸序列足够或最少数量的相同或等同(如具有相似侧链的氨基酸残基)氨基酸残基或核苷酸以使得第一和第二氨基酸或核苷酸序列享有共同的结构域或基序和/或共同的功能活性的第一氨基酸或核苷酸残基。例如，享有共同结构域的氨基酸或核苷酸序列在该结构域的整个氨基酸序列上具有至少30%、40%或50%的同源性，优选地60%的同源性，更优选地70%-80%，甚至更优选地90-95%的同源性，并包含至少一个、优选两个结构域或基序，则在本文中定义为足够相同。此外，享有至少30%、40%或50%，优选地60%，更优选地70-80%或90-95%同源性并享有共同功能活性的氨基酸或核苷酸序列在本文中定义为足够相同。

[0153] 如本文中可以互换使用，“PD-L3OR VISTA活性”、“PD-L3ORVISTA的生物活性”或“PD-L3OR VISTA的功能活性”是指PD-L3ORVISTA蛋白、多肽或核酸分子对PD-L3OR VISTA应答细胞或组织或对PD-L3OR VISTA多肽结合伴侣发挥的活性，如根据标准技术在体内或体外测定。这些活性包括调节CD4+和CD8+T细胞增殖以及细胞因子产生。在另一个实施方案中，PD-L3OR VISTA活性为直接活性，诸如与PD-L3OR VISTA结合伴侣的缔合。如本文所用，“目标分子”或“结合伴侣”是天然的(即，在T细胞上表达的)PD-L3ORVISTA多肽所结合或相互作用以便实现PD-L3OR VISTA介导的功能的分子。可选地，PD-L3ORVISTA活性为间接活性，诸如PD-L3OR VISTA多肽介导的细胞信号传导活性。PD-L3OR VISTA的生物活性在本文有所描述。例如，本发明的PD-L3OR VISTA多肽以及PD-L3OR VISTA激动剂或拮抗剂可具有以下活性中的一种或多种：(1)抑制或促进CD4+和CD8+T细胞增殖，(2)抑制或促进细胞因子产生，(3)用作调节性配体，调节性配体负调节T细胞与骨髓源性APC之间的同种相互作用期间的T细胞应答，(4)通过抑制早期TCR活化并阻止细胞分裂而负调节CD4+T细胞应答，但对细胞凋亡具有微弱的直接影响，(5)抑制或促进APC与T细胞之间的同种相互作用期间的抗原特异性T细胞活化，和/或(6)抑制或促进T细胞介导的免疫应答；(7)调节免疫细胞(如T淋巴细胞)的活化，以及(8)调节免疫应答，如生物体(如小鼠或人生物体)的炎性免疫应答。

[0154] 因此，本发明的另一个实施方案的特征在于调节一种或多种PD-L3OR VISTA活性的分离的PD-L3OR VISTA蛋白和多肽。这些多肽将包括具有以下结构域的一个或多个的PD-L3OR VISTA多肽：信号肽结构域、IgV结构域、胞外域、跨膜域和胞质域，并优选地为PD-L3OR VISTA活性。

[0155] 另外优选的PD-L3OR VISTA多肽可具有至少一个胞外域以及信号肽结构域、IgV结构域、跨膜结构域和胞质结构域的一个或多个，并优选地由下述核酸分子编码，所述核酸分子具有的核苷酸序列在严格杂交条件下杂交到包含本文SEQ ID NO:1或3核苷酸序列的互补序列的核酸分子。示例性分离的人和鼠PD-L3OR VISTA cDNA的核苷酸和氨基酸序列以及预测的人PD-L3OR VISTA多肽的氨基酸序列包含在本文的序列表中。

[0156] 人VISTA或PD-L3OR VISTA在T细胞转录谱筛选中被鉴定为上调的分子。我们对从

鼠CD4+T细胞cDNA文库中回收的相同的930bp基因产物的表征确认了大小和序列。电子延伸序列和结构分析预测出成熟时309个氨基酸的I型跨膜蛋白。其胞外域包含136个氨基酸的单个胞外Ig-V结构域，其连接到23个氨基酸的茎区、21个残基的跨膜片段以及97氨基酸的胞质结构域。VISTA的胞质尾部不含任何信号传导结构域。通过VISTA Ig-V结构域的BLAST序列检索鉴定出B7家族的PD-L1为最接近的进化相关蛋白，其具有边缘显著性e值得分。VISTA与B7家族成员PD-L1、PD-L2、B7-H3和B7-H4基于结构的序列比对突出了在所有Ig-V结构域蛋白中系统性保守的若干氨基酸。

[0157] 本发明的各个方面在下面的小节中进一步详细说明：

[0158] I.PD-L3OR VISTA分离的核酸分子

[0159] 本发明的一个方面涉及编码PD-L3OR VISTA多肽或其生物活性部分的分离的核酸分子，以及足以用作杂交探针以鉴定编码PD-L3OR VISTA的核酸分子(如PD-L3OR VISTA mRNA)的核酸片段以及用作PCR引物以扩增或突变PD-L3OR VISTA核酸分子的片段。如本文所用，术语“核酸分子”旨在包括DNA分子(如cDNA或基因组DNA)和RNA分子(如mRNA)以及使用核苷酸类似物生成的DNA或RNA类似物。核酸分子可以是单链的或双链的，但优选地为双链DNA。

[0160] 术语“分离的核酸分子”包括从存在于核酸天然源中的其他核酸分子中分离而得的核酸分子。例如，相对于基因组DNA，术语“分离的”包括从基因组DNA与其天然相关的染色体中分离而得的核酸分子。优选地，“分离的”核酸分子不含在该核酸分子所来源的生物体基因组DNA中天然位于核酸侧翼的序列(即，位于核酸分子5’和3’末端的序列)。例如，在多个实施方案中，分离的PD-L3OR VISTA核酸分子可包含低于约5kb、4kb、3kb、2kb、1kb、0.5kb或0.1kb的在该核酸分子所来源的生物体基因组DNA中天然位于核酸分子侧翼的核苷酸序列。此外，“分离的”核酸分子，诸如cDNA分子，可基本上不含其他细胞物质或培养基(当通过重组技术产生时)或基本上不含化学前体或其他化学物质(当通过化学方法合成时)。

[0161] 本发明的核酸分子，例如具有SEQ ID NO:1、3的核苷酸序列的核酸分子，或其部分，可使用标准分子生物学技术和本文提供的序列信息分离。使用SEQ ID NO:1或3的核酸序列的全部或一部分作为杂交探针时，PD-L3OR VISTA核酸分子可使用标准杂交和克隆技术而分离(例如，如在Sambrook,J.等Molecular Cloning:A LaboratoryManual.第2版，Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring HarborLaboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1989中所述)。

[0162] 此外，涵盖SEQ ID NO:1、3的全部或一部分的核酸分子，或直系同源体或变体可使用基于SEQ ID NO:1、2、3、4或5的序列而设计的合成寡核苷酸引物通过聚合酶链反应(PCR)分离。

[0163] 本发明的核酸分子可使用cDNA、mRNA或基因组DNA作为模板以及合适的寡核苷酸引物根据标准PCR扩增技术而扩增。如此扩增的核酸分子可克隆进合适的载体并通过DNA序列分析而表征。此外，对应于PD-L3核苷酸序列的寡核苷酸可通过标准合成技术而制备，例如使用自动化DNA合成仪。

[0164] 在一个优选的实施方案中，本发明的分离的编码PD-L3ORVISTA的核酸分子包含SEQ ID NO:1或3所示的核苷酸序列，或其片段。在另一个实施方案中，本发明的核酸分子包括作为SEQ ID NO:1或3所示的核苷酸序列的互补序列或任何这些核苷酸序列的一部分的

核酸分子。与SEQ ID NO:1或3所示的核苷酸序列互补的核酸分子为这样的核酸分子，其与SEQ ID NO:1或3所示的核苷酸序列充分互补，以使得其可分别杂交到SEQ ID NO:1或3所示的核苷酸序列，从而形成稳定的复合体。

[0165] 在又一个优选的实施方案，本发明的分离的核酸分子包含与SEQID NO:1或3所示的核苷酸序列的整个长度至少约70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高程度相同的核苷酸序列，或任何这些核苷酸序列的一部分。

[0166] 此外，本发明的核酸分子可只包含SEQ ID NO:1或3的核酸序列的一部分，例如可用作探针或引物的片段或编码PD-L3OR VISTA多肽的一部分(例如PD-L3OR VISTA多肽的生物活性部分)的片段。通过克隆人PD-L2基因确定的核苷酸序列允许生成设计用于鉴定和/或克隆其他PD-L2家族成员以及得自其他物种的PD-L3OR VISTA同系物的探针和引物。探针/引物通常包含基本上纯化的寡核苷酸。寡核苷酸通常包含在严格杂交条件下杂交到SEQ ID NO:1或3的有义序列;SEQ ID NO:1、3的反义序列;或SEQ ID NO:1或3的天然存在的等位变体或突变体的至少约12或15，优选约20或25，更优选约30、35、40、45、50、55、60、65或75个连续核苷酸的核苷酸序列区。

[0167] 在一个实施方案中，本发明的核酸分子包含长度大于约50-100、100-150、150-200、200-250、250-300、300-350、350-400、400-450、450-500、500-550、550-600、600-650、650-700、700-750、750-800、800-850、850-900、900-950或更多个核苷酸的核苷酸序列，并在严格杂交条件下杂交到SEQ ID NO:1或3或其互补序列的核酸分子。在又一个实施方案中，本发明的核酸分子包含长度大于约880-900、900-950、950-1000、1000-1050、1050-1100、1100-1150或更多个核苷酸的核苷酸序列，并在严格杂交条件下杂交到SEQ ID NO:1或3或其互补序列的核酸分子。在再一个实施方案中，本发明的核酸分子包含长度大于约50-100、100-150、150-200、200-250、250-300或更多个核苷酸的核苷酸序列，并在严格杂交条件下杂交到包含SEQ IDNO:1或3或其互补序列中的编码区的核酸分子。在再进一步的实施方案中，本发明的核酸分子包含长度大于约50-100、100-150、150-200、200-250、250-300、300-350、350-400、400-450、450-500、500-550、550-600、600-650、650-700、700-750、750-800、850-900、900-950或更多个核苷酸的核苷酸序列，包含构成SEQ ID NO:1或3的编码区的序列或其互补序列的至少约15个(即，15个连续的)核苷酸，并在严格杂交条件下杂交到包含SEQ ID NO:1或3所示的核苷酸序列或其互补序列的核酸分子。

[0168] 基于PD-L3OR VISTA核苷酸序列的探针可用于检测转录物或编码相同或同源多肽的基因组序列。在优选的实施方案中，探针进一步包含连接到其上的标签组，例如，标签组可以是放射性同位素、荧光化合物、酶或酶辅因子。此类探针可用作诊断测试试剂盒的一部分，以鉴定误表达PD-L3OR VISTA多肽的细胞或组织，诸如通过测量受试者细胞样品中编码PD-L3OR VISTA的核酸的水平，如检测PD-L3OR VISTA mRNA水平或确定基因组PD-L3OR VISTA基因是否已突变或缺失。

[0169] 编码“PD-L3OR VISTA多肽的生物活性部分”的核酸片段可通过以下方法制备：分离编码具有PD-L3OR VISTA生物活性(如，结合到其天然结合伴侣和/或调节免疫细胞活性的能力)的多肽的SEQ IDNO:1或3的核苷酸序列的一部分，表达PD-L3OR VISTA多肽的编码部分(如通过体外重组表达)，以及评价PD-L3OR VISTA多肽的编码部分的活性。

[0170] 本发明进一步涵盖下述核酸分子，其与SEQ ID NO:1或3所示的核苷酸序列因遗传

密码简并性而不同并因此编码与SEQ ID NO:1或3所示的核苷酸序列编码的那些相同的PD-L3OR VISTA多肽。在另一个实施方案中，本发明的分离的核酸分子具有编码下述多肽的核苷酸序列，所述多肽具有SEQ ID NO:2、4或5所示的氨基酸序列。

[0171] 除了SEQ ID NO:1和3所示的PD-L3OR VISTA核苷酸序列外，本领域的技术人员将会认识到，导致PD-L3OR VISTA多肽的氨基酸序列发生变化的DNA序列多态性也可存在于种群(例如人种群)中。在PD-L3OR VISTA基因中的这种遗传多态性可因天然等位变异而存在于种群的个体之中。如本文所用，术语“基因”和“重组基因”是指包含编码PD-L3OR VISTA多肽，优选哺乳动物PD-L3OR VISTA多肽的开放阅读框的核酸分子，并可进一步包含非编码调控性序列和内含子。

[0172] 人或小鼠PD-L3OR VISTA的等位变体包括功能性和非功能性PD-L3OR VISTA多肽两者。功能性等位变体是人或小鼠PD-L3ORVISTA多肽的天然存在的氨基酸序列变体，其维持结合天然PD-L3OR VISTA结合伴侣和/或调节CD4+和CD8+T细胞增殖和细胞因子产生以及淋巴细胞活化的能力。功能性等位变体将通常只含SEQ IDNO:2、4或5的一个或多个氨基酸的保守取代，或多肽非关键区中非关键残基的取代、缺失或插入。

[0173] 非功能性等位变体是人或小鼠PD-L3OR VISTA多肽的天然存在的氨基酸序列变体，其不具有结合天然PD-L3OR VISTA结合伴侣和/或调节本文所述的任何PD-L3OR VISTA活性的能力。非功能性等位变体将通常包含SEQ ID NO:2、4或5的氨基酸序列的非保守取代、缺失或插入或提前截短，或多肽的关键残基或关键区(如IgV结构域中)的取代、插入或缺失。

[0174] 本发明进一步提供人或小鼠PD-L3OR VISTA多肽的非人、非小鼠直系同源体。人或小鼠PD-L3OR VISTA多肽的直系同源体是从非人非小鼠生物体中分离而得并具有与本文所公开的人和鼠PD-L3ORVISTA多肽相同的结合活性和/或淋巴细胞活化-调节活性以及调节CD4+和CD8+T细胞增殖和细胞因子产生的能力的多肽。人或小鼠PD-L3多肽的直系同源体可作为包含与SEQ ID NO:2、4或5基本上相同的氨基酸序列而容易地鉴定。

[0175] 此外，编码其他PD-L3OR VISTA家族成员并因此具有与SEQ IDNO:1或3的PD-L3OR VISTA序列不同的核苷酸序列的核酸分子也旨在落在本发明的范围之内。例如，另一种PD-L3OR VISTA cDNA可基于小鼠或人PD-L3OR VISTA的核苷酸序列而鉴定。此外，编码来自不同物种的PD-L3OR VISTA多肽并因此具有与SEQ ID NO:1或3的PD-L3ORVISTA序列不同的核苷酸序列的核酸分子也旨在落在本发明的范围之内。例如，猴PD-L3OR VISTA cDNA可基于小鼠或人PD-L3OR VISTA的核苷酸序列而鉴定。

[0176] 对应于本发明的PD-L3OR VISTA cDNA的天然等位变体和同系物的核酸分子可基于它们与本文所公开的PD-L2核酸的同源性使用本文所公开的cDNA或其部分作为杂交探针根据标准杂交技术在严格杂交条件下分离。对应于本发明的PD-L3OR VISTA cDNA的天然等位变体和同系物的核酸分子可进一步通过作为PD-L3OR VISTA基因对相同的染色体或基因座作图而分离。

[0177] 因此，在另一个实施方案中，本发明的分离的核酸分子为至少15、20、25、30或更多个核苷酸长，并在严格杂交条件下杂交到包含SEQ ID NO:1或3的核苷酸序列的编码区的核酸分子。在其他实施方案中，核酸分子的长度为至少700、750、800、850、880-900、900-950、950-1000、1000-1050、1050-1100、1100-1150或更多个核苷酸。

[0178] 如本文所用，术语“在严格条件下杂交”旨在描述彼此显著相同或同源的核苷酸序列保持彼此杂交所处的杂交和洗涤条件。优选地，该条件使得至少约70%，更优选地至少约80%，甚至更优选至少约85%或90%彼此相同的序列保持彼此杂交。此类严格杂交条件是本领域技术人员已知的，并可见于Current Protocols in Molecular Biology，Ausubel等编者，John Wiley&Sons，Inc(1995)，第2、4和6节。另外的严格条件可见于Molecular Cloning:A Laboratory Manual，Sambrook等，Cold Spring Harbor Press，Cold Spring Harbor，N.Y.(1989)，第7、9和11章。严格杂交条件的优选非限制性实例包括：在4倍或6倍氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中在约65-70℃下杂交(或在4倍SSC加50%甲酰胺中在约42-50℃下杂交)，然后在1倍SSC中在约65-70℃下洗涤一次或多次。严格杂交条件的进一步优选的非限制实例包括：在6倍SSC中在45℃杂交，然后在0.2倍SSC、0.1%SDS中在65℃下洗涤一次或多次。高度严格杂交条件的优选非限制性实例包括：在1倍SSC中在约65-70℃杂交(或在1倍SSC加50%甲酰胺中在约42-50℃杂交)，然后在0.3倍SSC中在约65-70℃下洗涤一次或多次。降低的严格杂交条件的优选非限制性实例包括：在4倍或6倍SSC中在约50-60℃下杂交(或在6倍SSC加50%甲酰胺中在约40-45℃下杂交)，然后在2倍SSC中在约50-60℃下洗涤一次或多次。上面列举的值中间的范围，如在65-70℃下或在42-50℃下，也旨在包括在本发明的范围内。在杂交和洗涤缓冲液中可以用SSPE(1倍SSPE为0.15M NaCl、10mM NaH2PO4和1.25mM EDTA，pH 7.4)代替SSC(1倍SSC为0.15M NaCl和15mM柠檬酸钠)；洗涤在每次完成杂交后进行15分钟。对于预期长度短于50个碱基对的杂交体而言，杂交温度应低于杂交体的熔融温度(Tm)5-10℃，其中Tm根据以下公式确定：对于长度短于18个碱基对的杂交体，Tm(℃)-2(A+T碱基数)+4(G+C碱基数)。对于长度介于18和49个碱基对之间的杂交体，Tm(℃)=81.5+16.6(log10[Na+])+0.41(%G+C)-(600/N)，其中N为杂交体的碱基数，而[Na+1]为杂交缓冲液中钠离子的浓度(1倍SSC的[Na+]＝0.165M)。技术人员还将认识到，可将另外的试剂加到杂交和/或洗涤缓冲液中以降低核酸分子与膜(例如硝化纤维或尼龙膜)的非特异性杂交，包括但不限于封闭剂(如BSA或硅鱼或鲱鱼精子载体DNA)、洗涤剂(如SDS)、螯合剂(如EDTA)、Ficoll、PVP等。当使用尼龙膜时，具体地讲，严格杂交条件的另外优选的非限制性实例为在0.25-0.5M NaH2PO4、7%SDS中在约65℃杂交，然后在0.02MNaH2PO4、1%SDS中在约65℃洗涤一次或多次，参见例如Church和Gilbert(1984)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:1991-1995(或可选地，0.2倍SSC，1%SDS)。

[0179] 优选地，本发明在严格杂交条件下杂交到SEQ ID NO:1或3的序列的分离的核酸分子对应于天然存在的核酸分子。如本文所用，“天然存在的”核酸分子是指具有存在于自然界中的核苷酸序列的RNA或DNA分子(即编码天然多肽)。

[0180] 除了可存在于种群中的PD-L3OR VISTA序列的天然存在的等位变体外，技术人员将进一步认识到，可通过突变将变化引入SEQ IDNO:1或3的核苷酸序列，从而导致所编码的PD-L3OR VISTA多肽的氨基酸序列发生变化，而不改变PD-L3OR VISTA多肽的功能能力。例如，可在SEQ ID NO:1或3的序列中进行将导致“非必需”氨基酸残基处的氨基酸取代的核苷酸取代。“非必需”氨基酸残基是可从PD-L3OR VISTA的野生型序列(如，SEQ ID NO:2、4或5的序列)中变化而不改变生物活性的残基，而“必需”氨基酸残基则为生物活性所必需。例如，在本发明的PD-L3OR VISTA多肽中保守的氨基酸残基，如那些存在于胞外域中的残基，预计尤其不适合改变。此外，在本发明的PD-L3OR VISTA多肽与PD-L3OR VISTA家族的其他

成员之间保守的另外氨基酸残基不大可能适合改变。

[0181] 因此，本发明的另一方面涉及下述核酸分子，其编码在对活性非必需的氨基酸残基中含有变化的PD-L3OR VISTA多肽。此类PD-L3OR VISTA多肽不同于SEQ ID NO:2、4或5的氨基酸序列，而仍保留生物活性。在一个实施方案中，分离的核酸分子包含编码多肽的核苷酸序列，其中该多肽含有与SEQ ID NO:2、4或5至少约71%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高程度相同的氨基酸序列。

[0182] 编码与SEQ ID NO:2、4或5的多肽相同的PD-L3OR VISTA多肽的分离的核酸分子可通过以下方式创建：将一个或多个核苷酸取代、添加或缺失引入SEQ ID NO:1或3的核苷酸序列，使得将一个或多个氨基酸取代、添加或缺失引入编码的多肽。突变可通过标准技术，诸如定点诱变和PCR介导的诱变，而引入SEQ ID NO:1或3。优选地，在一个或多个预测的非必需氨基酸残基处进行保守氨基酸取代。“保守氨基酸取代”是其中将氨基酸残基替换为具有相似侧链的氨基酸残基的取代。具有相似侧链的氨基酸残基的家族在本领域中已有定义。这些家族包括：具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(例如天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、具有β-分支侧链的氨基酸(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳族侧链的氨基酸(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此，预测的PD-L3OR VISTA多肽中的非必需氨基酸残基优选地被替换为来自相同侧链家族的另一氨基酸残基。可选地，在另一个实施方案中，突变可沿着PD-L3OR VISTA编码序列的全部或一部分而随机引入，诸如通过饱和诱变引入，然后可筛选所得突变体的PD-L3ORVISTA生物活性，以鉴定保留活性的突变体。在SEQ ID NO:1或3的诱变后，可通过重组方法表达编码的多肽，并可确定多肽的活性。

[0183] 在一个优选的实施方案中，可测定突变体PD-L3OR VISTA多肽以下方面的能力：结合到天然PD-L3OR VISTA结合伴侣和/或调节其活性，调节细胞内或细胞间信号传导，调节T淋巴细胞活化和/或调节生物体免疫应答。

[0184] 本发明的又一个方面涉及编码PD-L3OR VISTAPD-L3ORVISTA OR VISTA融合蛋白的分离的核酸分子。此类至少包含有效连接到编码非PD-L3OR VISTA蛋白、多肽或肽的第二核苷酸序列的编码PD-L3OR VISTAPD-L3OR VISTA OR VISTA蛋白、多肽或肽的第一核苷酸序列的核酸分子可通过标准重组DNA技术制备。

[0185] 除了上述编码PD-L3OR VISTA多肽的核酸分子外，本发明的另一方面涉及与其反义的分离的核酸分子。“反义”核酸分子包含与编码多肽的“有义”核酸互补的核苷酸序列，例如与双链cDNA分子的编码链互补或与mRNA序列互补。因此，反义核酸可通过氢键结合到有义核酸。反义核酸可与整个PD-L3OR VISTA编码链互补或只与其一部分互补。在一个实施方案中，反义核酸分子与编码PD-L3OR VISTA的核苷酸序列的编码链的“编码区”反义。术语“编码区”是指包含翻译成氨基酸残基的密码子的核苷酸序列区。在另一个实施方案中，反义核酸分子与编码PD-L的核苷酸序列的编码链的“非编码区”反义。术语“非编码区”是指不翻译成氨基酸的位于编码区侧翼的5’和3’序列(也称为5’和3′非翻译区)。给定编码本文所公开的人或小鼠PD-L3ORVISTAPD-L3OR VISTA OR VISTA的编码链序列，可根据沃森克里克碱基配对原则设计本发明的反义核酸。反义核酸分子可与PD-L3OR VISTA mRNA的整个编码

区互补，但更优选地为寡核苷酸，其只与PD-L3OR VISTA mRNA的编码或非编码区的一部分反义。例如，反义寡核苷酸可与围绕PD-L3OR VISTA OR VISTA mRNA的反义起始位点的区域互补。反义寡核苷酸的长度可以为例如约5、10、15、20、25、30、35、40、45或50个核苷酸。本发明的反义核酸分子可使用化学合成和酶连接反应使用本领域已知的步骤构建。例如，反义核酸分子(如反义寡核苷酸)可使用天然存在的核苷酸或各种经设计以增强分子生物稳定性或增强反义与有义核酸间形成的双链体物理稳定性的修饰核苷酸通过化学方法合成，例如，可以使用硫代磷酸衍生物和吖啶取代的核苷酸。可用于生成反义核酸的修饰核苷酸的实例包括5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、4-乙酰胞嘧、5-(羧羟基甲基)尿嘧啶、5-羧甲基氨甲基-2-硫代尿苷、5-羧甲基氨甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、β-D-半乳糖基Q核苷(beta-D-galactosylqueosine)、肌苷、N6-异戊烯基腺嘌呤、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨甲基-2-硫脲嘧啶、β-D-甘露糖基Q核苷(beta-D-mannosylqueosine)、5'-甲氧基羧甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲基硫代-N6-异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧乙酸(v)、wybutoxosine、假尿嘧啶、Q核苷(queosine)、2-巯基胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基脲嘧啶、尿嘧啶-5-氧乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧乙酸(v)、5-甲基-2-硫尿嘧啶、3-(3-氨基-3-N-2-羧丙基)尿嘧啶、(acp3)w和2,6-二氨基嘌呤。可选地，反义核酸可使用已按反义取向(即，从插入的核酸转录的RNA将具有与所关注的靶核酸的反义取向，这将在下面的小节中进一步描述)将核酸亚克隆进其中的表达载体通过生物学方法产生。

[0186] 本发明的反义核酸分子通常施用给受试者或原位生成，使得它们与编码PD-L3OR VISTAPD-L3OR VISTA OR VISTA多肽的细胞mRNA和/或基因组DNA杂交或与之结合，从而抑制多肽的表达，例如通过抑制转录和/或翻译。杂交可以通过常规核苷酸互补性以形成稳定双链体，或例如，就结合到DNA双链体的反义核酸分子而言，通过双螺旋的大沟中的特定相互作用。施用本发明的反义核酸分子的途径的实例包括在组织部位直接注射。可选地，可对反义核酸分子进行修饰以靶向所选的细胞，然后进行全身性施用。例如，对于全身施用，可对反义分子进行修饰，使得它们特异性结合到在所选细胞表面表达的受体或抗原，例如通过将反义核酸分子连到结合到细胞表面受体或抗原的肽或抗体。反义核酸分子还可使用本文所述的载体递送到细胞。为了实现反义分子足够的细胞内浓度，其中在强pol Ⅱ或pol Ⅲ启动子的控制下放置核酸分子的载体构建体是优选的。

[0187] 在又一个实施方案中，本发明的反义核酸分子为α-异头物核酸分子。α-异头物核酸分子与互补的RNA形成特异性双链杂交体，其中与通常的β单元相反，链的走向彼此平行(Gaultier等(1987)NucleicAcids Res.15:6625-6641)。反义核酸分子还可以包含2'-o-甲基核糖核苷酸(Inoue等(1987)Nucleic Acids Res.15:6131-6148)或嵌合RNA-DNA类似物(Inoue等(1987)FEBS Lett.215:327-330)。

[0188] 在再一个实施方案中，本发明的反义核酸为核糖酶。核糖酶是具有核糖核酸酶活性的催化性RNA分子，它们能够裂解与其具有互补区的单链核酸，诸如mRNA。因此，核糖酶(如锤头核糖酶(在Haseloff和Gerlach(1988)Nature 334:585-591中有所描述))可用于催化裂解PD-L3OR VISTA mRNA转录物从而抑制PD-L3OR VISTA ORVISTA mRNA的翻译。具有针对编码PD-L3OR VISTA的核酸的特异性的核糖酶可基于本文所公开的PD-L3OR VISTA cDNA

的核苷酸序列(即SEQ ID NO:1或3)而设计。例如,可构建四膜虫L-19IVS RNA的衍生物,其中活性位点的核苷酸序列与编码PD-L3ORVISTAPD-L3OR VISTA OR VISTA的mRNA中待裂解的核苷酸序列互补。参见例如Cech等人的美国专利No.4,987,071以及Cech等人的美国专利No.5,116,742。可选地,PD-L3OR VISTA mRNA可用于从RNA分子库中选择具有特定核糖核酸酶活性的催化性RNA。参见例如Bartel,D.和Szostak,J.W.(1993)Science 261:1411-1418。

[0189] 可选地,PD-L3OR VISTA基因表达可通过以下方法抑制:靶向与PD-L3OR VISTA的调节区互补的核苷酸序列(例如PD-L3ORVISTA启动子和/或增强子)以形成防止靶细胞中PD-L3基因转录的三螺旋结构。通常可参见Helene,C(1991)Anticancer Drug Des.6(6):569-84;Helene,C等(1992)Ann.N.Y.Acad.Sci.660:27-36;和Maher,L.J.(1992)Bioessays 14(12):807-15。

[0190] 在又一个实施方案中,本发明的PD-L3OR VISTA核酸分子可在碱基部分、糖部分或磷酸主链中修饰,以改善例如分子的稳定性、杂交或可溶性。例如,核酸分子的脱氧核糖磷酸主链可进行修饰以生成肽核酸(参见Hyrup,B.和Nielsen,P.E.(1996)Bioorg.Med.Chem.4(1):5-23)。如本文所用,术语"肽核酸"或"PNA"是指核酸模拟物,如DNA模拟物,其中脱氧核糖磷酸主链被伪肽主链替换,并且只有四个天然核碱基得以保留。已表明,PNA的中性主链允许在低离子强度条件下特异性杂交到DNA和RNA。PNA寡聚物的合成可使用标准固相肽合成方案进行,如在Hyrup和Nielsen(1996)同上和Perry-O'Keefe等(1996)Proc Natl.Acad.Sci.USA 93:14670-675中所述。

[0191] PD-L3OR VISTA核酸分子的PNA可用于治疗和诊断应用。例如,PNA可用作反义或有义剂用于序列特异性调节基因表达,例如通过诱导转录或翻译阻止或通过抑制复制。PD-L3OR VISTA核酸分子的PNA还可用于基因中单一碱基对突变的分析(例如,通过PNA指导的PCR发夹技术);作为与其他酶联合使用时的"人工限制酶"(例如,S 1核酸酶(Hyrup和Nielsen(1996)同上));或作为探针或引物用于DNA测序或杂交(Hyrup和Nielsen(1996)同上;Perry-O'Keefe等(1996)同上)。

[0192] 在另一个实施方案中,PD-L3OR VISTA的PNA可进行修饰(例如以增强它们的稳定性或细胞摄取),方式是通过将亲脂性或其他辅助基团连接到PNA,通过形成PNA-DNA嵌合体或通过使用脂质体或本领域已知的其他药物递送技术。例如,能生成可结合PNA和DNA的有利特性的PD-L3OR VISTA核酸分子的PNA-DNA嵌合体。此类嵌合体允许DNA识别酶(如RNA酶H和DNA聚合酶)与DNA部分相互作用,同时PNA部分将提供高结合亲和力和特异性。PNA-DNA嵌合体可使用根据碱基堆积、核碱基之间的键合数以及取向选择的合适长度的连接基连接(Hyrup和Nielsen(1996)同上)。PNA-DNA嵌合体的合成可如Hyrup和Nielsen(1996)同上和Finn P J.等(1996)Nucleic Acids Res.24(17):3357-63中所述进行。例如,DNA链可在固相载体上使用标准亚磷酰胺偶联化学而合成,而修饰的核苷类似物,如5'-(4-甲氧基三苯甲基)氨基-5'-脱氧胸苷亚磷酰胺,可用作PNA与DNA 5'末端之间的桥(Mag,M.等(1989)Nucleic Acids Res.17:5973-88)。PNA单体然后按逐步方式偶联,以与5'PNA片段和3'DNA片段产生嵌合分子(Finn P.J.等(1996)同上)。可选地,嵌合分子可用5'DNA片段和3'PNA片段合成(Peterser,K.H.等(1975)Bioorganic Med.Chem.Lett.5:1119-11124)。

[0193] 在其他实施方案中,寡核苷酸可以包含其他附加基团,诸如肽(如,用于体内靶向宿主细胞受体)或利于跨细胞膜(参见例如Letsinger等(1989)Proc Natl.Acad.Sci.USA

86:6553-6556;Lemaitre等(1987)Proc Natl.Acad.Sci.USA 84:648-652;PCT公开No.WO 88/09810)或血脑屏障(参见例如PCT公开No.WO 89/10134)转运的试剂。此外,寡核苷酸可用杂交触发裂解剂(参见例如Krol等(1988)Biotechniques6:958-976)或嵌入剂(参见例如Zon(1988)Pharm.Res.5:539-549)进行修饰。为此,可将寡核苷酸偶联到另一分子(如肽、杂交触发交联剂、转运剂或杂交触发裂解剂)。

[0194] 可选地,细胞系或微生物中的内源性PD-L3OR VISTA基因的表达特性可通过以下方式修饰:将异源DNA调节元件插入稳定细胞系或克隆微生物的基因组,使得插入的调节元件与内源性PD-L3ORVISTA基因有效连接。例如,通常为"转录沉默"的内源性PD-L3ORVISTA基因(即,在细胞系或微生物中通常不表达,或仅以非常低的水平表达的PD-L3OR VISTA基因)可通过以下方式活化:插入能够促进在该细胞系或微生物中通常所表达的基因产物进行表达的调节元件。可选地,转录沉默的内源性PD-L3OR VISTA基因可以通过插入在所有细胞类型中都有效的混杂调节元件。

[0195] 异源性调节元件可以使用诸如靶向同源重组的技术插入稳定的细胞系或克隆的微生物,使得其与内源性PD-L3OR VISTA基因有效连接,这些技术对本领域的技术人员是熟知的并例如在Chappel的美国专利No.5,272,071和1991年5月16日公布的PCT公开No.WO91/06667中有所描述。

[0196] Ⅱ.分离的PD-L3OR VISTA多肽和抗PD-L3OR VISTA抗体

[0197] 本发明的一个方面涉及分离的PD-L3OR VISTA多肽及其生物活性部分以及适合用作免疫原以提高抗PD-L3OR VISTA抗体的多肽片段。在一个实施方案中,天然PD-L3OR VISTA多肽可通过合适的纯化方案使用标准蛋白纯化技术从细胞或组织源中分离而得。在另一个实施方案中,PD-L3OR VISTA多肽通过重组DNA技术产生。作为重组表达的另外一种选择,PD-L3OR VISTA蛋白或多肽可使用标准肽合成技术通过化学方法合成。

[0198] "分离的"或"纯化的"多肽或其生物活性部分基本上不含PD-L3OR VISTA多肽所来源的细胞或组织源中的细胞物质或其他污染蛋白,或当通过化学方法合成时基本上不含化学前体或其他化学物质。用语"基本上不含细胞物质"包括这样的PD-L3OR VISTA多肽制品,其中该多肽与从中分离的细胞的细胞成分相分离或通过重组法产生。在一个实施方案中,用语"基本上不含细胞物质"包括具有低于约30%(按干重计)非PD-L3OR VISTA蛋白(在本文也称为"污染蛋白"),更优选地低于约20%非PD-L3OR VISTA蛋白,还更优选地低于约10%非PD-L3OR VISTA蛋白以及最优选地低于约5%非PD-L3ORVISTA蛋白的PD-L3OR VISTA多肽制品。当PD-L3OR VISTA多肽或其生物活性部分通过重组法产生时,还优选的是基本上不含培养基,即,培养基占蛋白制品的体积小于约20%,更优选地小于约10%以及最优选地小于约5%。

[0199] 用语"基本上不含化学前体或其他化学物质"包括其中将多肽与多肽合成中涉及到的化学前体或其他化学物质相分离的PD-L3ORVISTA多肽制品。在一个实施方案中,用语"基本上不含化学前体或其他化学物质"包括具有低于约30%(按干重计)化学前体或非PD-L3OR VISTA化学物质,更优选地低于约20%化学前体或非PD-L3ORVISTA化学物质,还更优选地低于约10%化学前体或非PD-L3ORVISTA化学物质以及最优选地低于约5%化学前体或非PD-L3ORVISTA化学物质的PD-L3OR VISTA多肽制剂。

[0200] 如本文所用,PD-L3OR VISTA多肽的"生物活性部分"包括参与PD-L3OR VISTA分子

与非PD-L3OR VISTA分子(如PD-L3ORVISTA的天然配体)之间的相互作用的PD-L3OR VISTA多肽片段。PD-L3OR VISTA多肽的生物活性部分包括含有以下氨基酸序列的肽,所述序列与PD-L3OR VISTA多肽的氨基酸序列(例如SEQ ID NO:2、4或5所示的氨基酸序列)足够相同或由其衍生而来,所述肽包含比全长PD-L3OR VISTA多肽更少的氨基酸并表现出PD-L3ORVISTA多肽的至少一种活性。通常,生物活性部分包括具有PD-L3ORVISTA多肽的至少一种活性的结构域或基序,这些活性例如为调节(抑制)CD4T细胞对抗CD3的增殖应答,以抗原特异性方式抑制同种CD4T细胞的增殖应答,作用于特定细胞因子的表达等等。PD-L3ORVISTA多肽的生物活性部分可以是长度例如为25、50、75、100、125、150、175、200、225或更多个氨基酸的多肽。PD-L3ORVISTA多肽的生物活性部分可用作开发调节PD-L3OR VISTA介导的活性(如免疫细胞活化)的试剂的靶标。

[0201] 在一个实施方案中,PD-L3OR VISTA多肽的生物活性部分包含胞外域的至少一部分。应当理解,本发明的PD-L3OR VISTA多肽的优选生物活性部分可包含胞外域的至少一部分(例如包含IgV)以及以下结构域中的一者或多者:信号肽结构域、跨膜结构域和胞质结构域。此外,其中多肽的其他区域发生缺失的其他生物活性部分可通过重组技术制备,并对其评估天然PD-L3OR VISTA多肽的一种或多种功能活性。

[0202] 在一个优选的实施方案中,PD-L3OR VISTA多肽具有SEQ IDNO:2、4或5所示的氨基酸序列。在其他实施方案中,PD-L3ORVISTA多肽基本上与SEQ ID NO:2、4或5相同,并保留SEQ ID NO:2、4或5多肽的功能活性,但在氨基酸序列中因天然等位变异或诱变而不同,如上所述。

[0203] 本发明的核酸和多肽序列可以进一步用作“查询序列”来对公共数据库进行检索,例如用来鉴定其他家族成员或相关序列。此类检索可以用Altschul等(1990)J.Mol.Biol.215:403-10的NBLAST和XBLAST程序(2.0版)进行。BLAST核苷酸检索可以用NBLAST程序进行,得分=100,字长=12,以获得与本发明的PD-L3OR VISTA核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST蛋白质检索可以用XBLAST程序进行,得分=100,字长=3,以获得与本发明的PD-L3OR VISTA多肽分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的空位比对,可以采用如Altschul等(1997)Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402所述的空位BLAST。当采用BLAST和空位BLAST程序时,可以使用各自程序(例如XBLAST和NBLAST)的缺省参数。参见美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)的互联网网站。

[0204] 本发明还提供PD-L3OR VISTA嵌合或融合蛋白。如本文所用,PD-L3OR VISTA“嵌合蛋白”或“融合蛋白”包含有效连接到非PD-L3OR VISTA多肽的PD-L3OR VISTA多肽。“PD-L3OR VISTA多肽”是指具有对应于PD-L3OR VISTA分子的氨基酸序列的多肽,而“非PD-L3OR VISTA多肽”是指具有对应于与PD-L3OR VISTA多肽不基本同源的多肽(例如与PD-L3OR VISTA多肽不同并衍生自相同或不同生物体的多肽)的氨基酸序列的多肽。在PD-L3OR VISTA融合蛋白内,PD-L3OR VISTA多肽可对应于PD-L3OR VISTA多肽的全部或一部分。在一个优选的实施方案中,PD-L3OR VISTA融合蛋白包含PD-L3OR VISTA多肽的至少一个生物活性部分。在另一个优选的实施方案中,PD-L3OR VISTA融合蛋白包含PD-L3OR VISTA多肽的至少两个结构域。在融合蛋白内,术语“有效连接”旨在表示PD-L3OR VISTA多肽以及非PD-L3OR VISTA多肽彼此框内融合。非PD-L3OR VISTA多肽可融合到PD-L3OR VISTA多肽的N端

或C端，并对应于改变PD-L3OR VISTA多肽的溶解性、结合亲和力、稳定性或价态的部分。

[0205] 例如，在一个实施方案中，融合蛋白为GST-PD-L3OR VISTA融合蛋白，其中PD-L3OR VISTA序列融合到GST序列的C端。此类融合蛋白可有利于重组PD-L3OR VISTA的纯化。在另一个实施方案中，融合蛋白为在其N端包含异源信号序列的PD-L3OR VISTA多肽。在某些宿主细胞(例如哺乳动物宿主细胞)中，PD-L3OR VISTA的表达和/或分泌可通过使用异源信号序列而增强。在一个优选的实施方案中，融合蛋白为Ig-PD-L3OR VISTA融合蛋白，其中PD-L3ORVISTA序列融合到Ig分子的一部分。融合蛋白的Ig部分可包含免疫球蛋白恒定区，如人Cγ1结构域或Cγ4结构域(例如人IgCγ1或人IgCγ4的铰链、CH2和CH3区)(参见例如Capon等人的美国专利No.5,116,964、5,580,756、5,844,095等，它们以引用方式并入本文)。所得的融合蛋白可以具有改变的PD-L3OR VISTA溶解性、结合亲和力、稳定性和/或价态(即，每个分子的结合位点数)并可提高蛋白纯化的效率。

[0206] 尤其优选的PD-L3OR VISTA Ig融合蛋白包含偶联到免疫球蛋白恒定区(如Fc区)的PD-L3OR VISTA的胞外域部分。免疫球蛋白恒定区可以包含降低或消除免疫球蛋白结构中固有的效应子活性的遗传修饰。例如，编码PD-L3OR VISTA多肽的胞外域的DNA可接合到编码通过定点诱变修饰的人IgGγ1和/或IgGγ4的铰链、CH2和CH3区的DNA，例如，如WO 97/28267中所教导。本发明的PD-L3OR VISTA融合蛋白可掺入到药物组合物中并体内施用给受试者。PD-L3OR VISTA融合蛋白可用于影响PD-L3OR VISTA结合伴侣的生物利用率。使用PD-L3OR VISTA融合蛋白可在治疗学上用于治疗将会受益于免疫应答调节的病症或疾病。此外，本发明的PD-L3ORVISTA融合蛋白可用作免疫原，以在受试者中产生抗PD-L3ORVISTA抗体，以纯化PD-L3OR VISTA结合蛋白，以及在筛选检测分析中鉴定抑制PD-L3OR VISTA与其天然结合伴侣间的相互作用的分子。

[0207] 优选地，本发明的PD-L3OR VISTA嵌合或融合蛋白通过标准重组DNA技术产生。

[0208] 本发明还涉及起PD-L3OR VISTA激动剂(模拟物)或PD-L3ORVISTA拮抗剂作用的PD-L3OR VISTA多肽的变体。PD-L3OR VISTA多肽的变体可通过诱变生成，例如PD-L3OR VISTA多肽的不连续点突变或截短。PD-L3OR VISTA多肽的激动剂可保持与天然存在形式的PD-L3OR VISTA多肽的生物活性基本上相同或保持所述生物活性的子集。PD-L3OR VISTA多肽的拮抗剂可抑制天然存在形式的PD-L3OR VISTA多肽的活性中的一种或多种，例如通过竞争性调节PD-L3OR VISTA多肽的PD-L3OR VISTA介导的活性。因此，特定的生物效应可通过用有限功能的变体进行治疗而引起。在一个实施方案中，用具有天然存在形式的多肽的生物活性的子集的变体治疗受试者相对于用天然存在形式的PD-L3OR VISTA多肽进行治疗将在受试者中具有更少的副作用。

[0209] 在一个实施方案中，起PD-L3OR VISTA激动剂(模拟物)或PD-L3OR VISTA拮抗剂作用的PD-L3OR VISTA多肽的变体可通过以下方式鉴定：筛选PD-L3OR VISTA多肽变体(如截短变体)的组合文库的PD-L3OR VISTA多肽激动剂或拮抗剂活性。在一个实施方案中，PD-L3OR VISTA变体的多样化文库(variegated library)通过核酸水平的组合诱变生成并通过多样化基因文库编码。PD-L3OR VISTA变体的多样化文库可通过以下方式产生，例如将合成寡核苷酸的混合物通过酶法连接到基因序列中，使得潜在PD-L3OR VISTA序列的简并组可作为单独的多肽表达，或者作为在其中包含PD-L3OR VISTA序列的一组的较大融合蛋白组(例如对于噬菌体展示而言)表达。有多种方法可用于由简并寡核苷酸序列产生潜在PD-

L3OR VISTA变体的文库。简并基因序列的化学合成可在自动DNA合成仪中进行，且合成基因随后连接到合适的表达载体中。使用基因的简并组允许在一种混合物中提供编码所需的潜在PD-L3OR VISTA序列组的所有序列。用于合成简并寡核苷酸的方法在本领域中是已知的(参见例如Narang,S.A.(1983)Tetrahedron 39:3;Itakura等(1984)Annu.Rev.Biochem.53:323;Itakura等(1984)Science 198:1056;Ike等(1983)Nucleic Acids Res.11:477)。

[0210] 此外，PD-L3OR VISTA多肽编码序列的片段的文库可用于生成PD-L3OR VISTA片段的多样化群体，以筛选及随后选择PD-L3ORVISTA多肽的变体。在一个实施方案中，编码序列片段的文库可通过以下方法生成：用核酸酶在其中每个分子只出现大约一次切口的条件下处理PD-L3OR VISTA编码序列的双链PCR片段，使双链DNA变性，使DNA复性以形成可包含来自不同的带切口产物的有义/反义对的双链DNA，通过S1核酸酶从重新形成的双链体中移除单链部分，以及将所得的片段文库连接到表达载体中。通过此方法，可衍生出编码PD-L3OR VISTA多肽的各种大小的N端、C端和内部片段的表达文库。

[0211] 用于筛选通过点突变或截短制得的组合文库的基因产物以及用于筛选cDNA文库中具有所选特性的基因产物的若干技术在本领域中是已知的。此类技术适于快速筛选通过PD-L3OR VISTA多肽的组合诱变生成的基因文库。适于高通量分析的用于筛选大型基因文库的最广泛使用的技术通常包括：将基因文库克隆进可复制的表达载体，将合适的细胞用所得的载体文库转化，以及在下述条件下表达组合基因，其中检测所需的活性有利于分离编码检测其产物的基因的载体。递归总体诱变(Recursive ensemble mutagenesis,REM)是一种提高文库中功能性突变体频率的新技术，可与筛选检测分析法联合使用以鉴定PD-L3OR VISTA突变体(Arkin和Youvan(1992)Proc Natl.Acad.Sci.USA 89:7811-7815;Delagrave等(1993)Protein Eng.6(3):327-331)。

[0212] 除了只由天然存在的氨基酸组成的PD-L3OR VISTA多肽外，还提供了PD-L3OR VISTA拟肽。肽类似物通常用于制药行业，作为具有与模板肽相似性质的非肽类药物。这些类型的非肽类化合物称为“肽模拟物”或“拟肽”(Fauchere,J.(1986)Adv.Drug Res.15:29;Veber和Freidinger(1985)TINS第392页;以及Evans等(1987)J.Med.Chem 30:1229，它们以引用方式并入本文)并通常在计算机分子建模的辅助下开发。与治疗学上有用的肽结构相似的肽模拟物可用于产生等同的治疗或预防作用。一般来讲，拟肽与范式多肽(即，具有生物学或药理学活性的多肽)诸如人或小鼠PD-L3OR VISTA在结构上相似，但具有一个或多个可选地被选自由下列组成的组的键合代替的肽键：-CH2NH-、-CH2S-、-CH2-CH2-、-CH.dbd.CH-(顺式和反式)、-COCH2-、-CH(OH)CH2-和-CH2SO-，其中通过本领域已知的并在以下参考文献中进一步描述的方法进行：Spatola,A.F.于Chemistry andBiochemistry of Amino Acids,Peptides,and Proteins Weinstein,B.,ed.,Marcel Dekker,New York,p.267(1983);Spatola,A.F.,Vega Data(March 1983),Vol.1,Issue 3,"Peptide Backbone Modifications";Morley,J.S.(1980)Trends.Pharm.Sci.第463-468页;Hudson,D.等(1979)Int.J.Pept.Prot.Res.14:177-185(-CH2NH-、CH2CH2-);Spatola,A.F.等(1986)Life.Sci.38:1243-1249(-CH2-S);Hann,M.M.(1982)J.Chem.SoC Perkin.Trans.I 307-314(-CH-CH-，顺式和反式);Almquist,R.G.等(1980)J.Med.Chem.23:1392-1398(-COCH2-);Jennings-White,C等(1982)Tetrahedron Lett.23:2533(-COCH2-);Szelke,M.等

人的欧洲专利申请No.EP 45665(1982)CA:97:39405(-CH(OH)CH2-);Holladay,M.W.等(1983)Tetrahedron.Lett.24:4401-4404(-C(OH)CH2-);以及Hruby,V.J.(1982)Life Sci.31:189-199(-CH2-S-);这些参考文献的每一份都以引用方式并入本文。尤其优选的非肽键合为-CH2NH-。此类肽模拟物可具有明显优于多肽实施方案的优势,包括例如:更经济的生产、更高的化学稳定性、增强的药理学性质(半衰期、吸收、效能、功效等)、改变的特异性(例如广谱生物活性)、降低的抗原性等等。标记拟肽通常涉及将一个或多个标签直接地或通过间隔物(如酰胺基)共价连接到通过定量结构-活性数据和/或分子建模而预测的拟肽上的非干扰位置。此类非干扰位置通常为与拟肽所结合的以产生治疗效果的大分子不形成直接接触的位置。拟肽的衍生化(如,标记)应基本上不干扰拟肽的所需生物学或药理学活性。

[0213] PD-L3OR VISTA氨基酸序列的一个或多个氨基酸用相同类型的D-氨基酸进行系统性取代(如D-赖氨酸取代L-赖氨酸)可用于生成更稳定的肽。此外,包含PD-L3OR VISTA氨基酸序列或基本上相同的序列变异性的限制性肽可通过本领域已知的方法生成(Rizo和Gierasch(1992)Annu.Rev.Biochem.61:387,以引用方式并入本文);例如,通过添加能够形成使肽环化的分子内二硫桥的内部半胱氨酸残基。本文鉴定的PD-L3OR VISTA多肽的氨基酸序列将使得本领域的技术人员能够产生对应于PD-L3OR VISTA肽序列及其序列变体的多肽。此类多肽可在原核或真核宿主细胞中通过表达编码PD-L3ORVISTA肽序列(通常为较大多肽的一部分)的多核苷酸而产生。可选地,此类多肽可通过化学方法合成。在重组宿主中表达异源多肽、化学合成多肽以及体外翻译的方法在本领域中是熟知的。某些氨基末端和/或羧基末端修饰和/或肽延伸到核心序列可提供有利的物理、化学、生物化学和药理学特性,诸如:增强的稳定性、增强的效能和/或疗效、血清蛋白酶抗性、所需的药动学特性等等。肽可在治疗学上用于治疗疾病,例如通过改变患者中的协同刺激。

[0214] 分离的PD-L3OR VISTA多肽或者其部分或片段可用作免疫原以使用多克隆和单克隆抗体标准制备技术生成结合PD-L3OR VISTA的抗体。可使用全长PD-L3OR VISTA多肽,或者可选地,本发明提供PD-L3OR VISTA的抗原肽片段以用作免疫原。在一个实施方案中,PD-L3OR VISTA的抗原肽包含SEQ ID NO:2、4或5所示氨基酸残基的至少8个氨基酸残基,并涵盖PD-L3OR VISTA的表位,使得针对该肽提高的抗体与PD-L3OR VISTA多肽形成特异性免疫复合体。优选地,抗原肽包含至少10个氨基酸残基,更优选地至少15个氨基酸残基,甚至更优选地至少20个氨基酸残基,以及最优选地至少30个氨基酸残基。抗原肽所涵盖的优选表位是位于多肽胞外域中的PD-L3OR VISTA区域,如,亲水区以及具有高抗原性的区域。

[0215] PD-L3OR VISTA免疫原通常用于通过使用该免疫原使合适的受试者(如兔、山羊、小鼠或其他哺乳动物)免疫而制备抗体。合适的免疫原性制剂可包含例如重组表达的PD-L3OR VISTA多肽或化学合成的PD-L3OR VISTA多肽。制剂可进一步包含佐剂,诸如弗氏完全佐剂或不完全佐剂,或类似的免疫刺激剂。用免疫原性PD-L3ORVISTA制剂使合适的受试者免疫将诱导多克隆抗PD-L3OR VISTA抗体应答。

[0216] 因此,本发明的另一方面涉及抗PD-L3OR VISTA抗体。如本文所用的术语“抗体”是指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分,所述分子即包含特异性结合(与之发生免疫反应)抗原(诸如PD-L3OR VISTA)的抗原结合位点的分子。免疫球蛋白分子的免疫活性部分的实例包括可通过用诸如胃蛋白酶的酶处理抗体而生成的F(ab)和F(ab')2片段。

本发明提供结合PD-L3OR VISTA分子的多克隆和单克隆抗体。如本文所用的术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指这样一组抗体分子，其只含一种能够与PD-L3OR VISTA的特定表位发生免疫反应的抗原结合位点。因此，单克隆抗体组合物通常显示出针对与其发生免疫反应的特定PD-L3OR VISTA多肽的单一结合亲和力。

[0217] 多克隆抗PD-L3OR VISTA抗体可如上所述通过用PD-L3ORVISTA免疫原(如PD-L3OR VISTA-Ig融合蛋白)使合适的受试者免疫而制备。免疫受试者中抗PD-L3OR VISTA抗体的滴度可通过标准技术随时间而监测，诸如通过使用固定的PD-L3OR VISTA的酶联免疫吸附测定法(ELISA)。如果需要，可将针对PD-L3OR VISTA的抗体分子从哺乳动物中(例如，从血液中)分离，并通过熟知的技术诸如蛋白A层析进一步纯化，以得到IgG组分。在免疫后的合适时间，例如，当抗PD-L3OR VISTA抗体滴度最高时，可从受试者中获得产抗体的细胞，并用于通过标准技术制备单克隆抗体，诸如最初由Kohler和Milstein (1975)Nature 256:495-497描述的杂交瘤技术(另见Brown等(1981)J.Immunol.127:539-46;Brown等(1980)J.Biol.Chem.255:4980-83;Yeh等(1976)Proc Natl.Acad.Sci.USA 76:2927-31;以及Yeh等(1982)Int.J.Cancer 29:269-75)，最近的人B细胞杂交瘤技术(Kozbor等(1983)Immunol.Today 4:72)，EBV杂交瘤技术(Cole等(1985)Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,Inc.,第77-96页)或三瘤体技术。产生单克隆抗体杂交瘤的技术是熟知的(通常可参见Kenneth,R.H.in Monoclonal Antibodies:A NewDimension In Biological Analyses,Plenum Publishing Corp.,New York,N.Y.(1980);Lemer,E.A.(1981)Yale J.Biol.Med.54:387-402;Gefter,M.L.等(1977)Somatic Cell Genet.3:231-36)。简而言之，将永生细胞系(通常为骨髓瘤)融合到得自如上所述用PD-L3OR VISTA免疫原免疫的哺乳动物的淋巴细胞(通常为脾细胞)，并筛选所得杂交瘤细胞的培养物上清液以鉴定产生结合PD-L3OR VISTA的单克隆抗体的杂交瘤。用于融合淋巴细胞和永生化细胞系的许多熟知方案的任何一种均适用于生成抗PD-L3OR VISTA单克隆抗体的目的(参见例如Galfre,G.等(1977)Nature 266:55052;Gefter等(1977)同上;Lemer(1981)同上;和Kenneth(1980)同上)。此外，普通技术人员将会知道此类方法存在许多也会有用的变型形式。通常，永生细胞系(如，骨髓瘤细胞系)衍生自与淋巴细胞相同的哺乳动物物种。例如，鼠杂交瘤可通过将得自用本发明的免疫原制剂免疫的小鼠的淋巴细胞与永生化小鼠细胞系进行融合而制备。优选的永生细胞系为对含次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷的培养基(“HAT培养基”)敏感的小鼠骨髓瘤细胞系。多种骨髓瘤细胞系中的任何一种均可根据标准技术用作融合伴侣，例如P3-NS1/1-Ag4-1、P3-x63-Ag8.653或Sp2/0-Ag14骨髓瘤细胞系。这些骨髓瘤细胞系可得自ATCC。通常，将HAT敏感型小鼠骨髓瘤细胞使用聚乙二醇("PEG")融合到小鼠脾细胞。融合所产生的杂交瘤细胞然后使用HAT培养基选择，该培养基将杀死未融合的以及非生产性融合的杂交瘤细胞(未融合的脾细胞在几天后死亡，因为它们未转化)。生产本发明的单克隆抗体的杂交瘤细胞通过例如使用标准ELISA检测分析法筛选杂交瘤培养物上清液中结合PD-L3ORVISTA的抗体而检测。

[0218] 生产结合PD-L3OR VISTA的抗体的具体方法可使用本领域已知的以及如实施例中所述的方法实现。作为制备分泌单克隆抗体的杂交瘤的另外一种选择，可鉴定单克隆抗PD-L3抗体，并通过用PD-L3OR VISTA筛选重组组合免疫球蛋白文库(例如抗体噬菌体展示文库)而分离，从而分离结合PD-L3OR VISTA的免疫球蛋白文库成员。生成和筛选噬菌体展示

文库的试剂盒可商购获得。

[0219] 如所述，再次筛选这些抗体，以鉴定结合PD-L3OR VISTA的特定表位(如在IgV结构域或其他特定结构域中)的那些抗体和/或选择对PD-L3OR VISTA蛋白具有高亲和力与亲合力的抗体。此外，筛选这些抗体以鉴定能在体外和体内调节PD-L3OR VISTA对免疫力和免疫细胞的特定功能和作用的那些抗体。例如，可进行检测分析以确定特定抗PD-L3OR VISTA抗体对由PD-L3OR VISTA负调节的免疫功能的调节作用(若有)，这些功能包括CD4+或CD8+T细胞产生细胞因子、CD28协同刺激、CD4+T细胞增殖以及首次接触试验的和记忆CD4+T细胞增殖等等。在一个优选的实施方案中，进行检测分析以鉴定潜在的治疗性抗PD-L3OR VISTA抗体，其在体外当存在PD-L3OR VISTA-Ig时可增强PD-L3OR VISTA-Ig的抑制作用，因为这些抗PD-L3OR VISTA抗体在体内的表现相反，即，它们是免疫抑制性的。本发明涵盖特异性结合到136个氨基酸胞外域(如，结合到氨基酸1-50、50-100、100-136)的抗VISTA抗体及其用途，特异性结合IgV的抗体，特异性结合茎区的抗体，特异性结合跨膜区的抗体以及特异性结合VISTA的胞质区的抗体。这些特定区域在本申请中进行了鉴定。

[0220] 另外，可使用标准重组DNA技术制备的包含人和非人部分两者的重组抗PD-L3OR VISTA抗体，诸如嵌合和人源化单克隆抗体，也在本发明的范围内。此类嵌合和人源化单克隆抗体可通过本领域已知的重组DNA技术而产生，例如使用Robinson等人的国际专利申请No.PCT/US86/02269;Akira等人的欧洲专利申请184,187;Taniguchi,M.的欧洲专利申请171,496;Morrison等人的欧洲专利申请173,494;Neuberger等人的PCT国际公布No.WO 86/01533;Cabilly等人的美国专利No.4,816,567;Cabilly等人的欧洲专利申请125,023;Better等(1988)Science 240:1041-1043;Liu等(1987)Proc Natl.Acad.Sci.USA 84:3439-3443;Liu等(1987)J.Immunol.139:3521-3526;Sun等(1987)Proc Natl.Acad.Sci.USA 84:214-218;Nishimura等(1987)Cancer Res.47:999-1005;Wood等(1985)Nature 314:446-449;Shaw等(1988)J.Natl.Cancer Inst.80:1553-1559;Morrison,S.L.(1985)Science 229:1202-1207;Oi等(1986)Biotechniques 4:214;Winter,美国专利No.5,225,539;Jones等(1986)Nature 321:552-525;Verhoeyen等(1988)Science 239:1534;以及Beidler等(1988)J.Immunol.141:4053-4060中所述的方法。

[0221] 抗PD-L3OR VISTA抗体(如单克隆抗体)可用于通过标准技术分离PD-L3OR VISTA，诸如亲和层析或免疫沉淀。抗PD-L3OR VISTA抗体可有利于细胞中天然PD-L3OR VISTA以及宿主细胞中表达的重组产生的PD-L3OR VISTA的纯化。此外，抗PD-L3OR VISTA抗体可用于检测PD-L3OR VISTA多肽(如，细胞裂解物或细胞上清液中)以便评价PD-L3OR VISTA多肽的丰度和表达模式。抗PD-L3ORVISTA抗体可在诊断学上用于监测组织中的多肽水平例如作为临床检验程序的一部分，以便例如确定给定治疗方案的疗效。检测可通过将抗体偶联(即，物理连接)到可检测物质而更容易进行。可检测物质的实例包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料和放射性材料。合适的酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶识别或乙酰胆碱酯酶；合适的辅基复合物的实例包括链霉亲和素/生物素和亲和素/生物素；合适的荧光材料的实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明、二氯三嗪基氨基荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白；发光材料的实例包括鲁米诺；生物发光材料的实例包括荧光素酶、虫荧光素和水母发光蛋白，以及合适的放射性材料包括125I、131I、35S或3H。

[0222] Ⅲ.重组表达载体和宿主细胞

[0223] 本发明的另一方面涉及包含编码PD-L3OR VISTA多肽的核酸分子(或其部分)的载体,优选地为表达载体。如本文所用,术语“载体”是指能够转运其所连接到的另一核酸分子的核酸分子。一种类型的载体为“质粒”,它是指可向其中连接另外的DNA片段的环状双链DNA环。另一种类型的载体为病毒载体,其中可将另外的DNA片段连接到病毒基因组中。某些载体能够在它们所引入的宿主细胞中自主复制(如,具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其他载体(如非附加型哺乳动物载体)在引入宿主细胞中时整合进宿主细胞的基因组,并因而随宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够指导它们有效连接的基因的表达。此类载体在本文称为“表达载体”。一般来讲,在重组DNA技术中有用的表达载体通常为质粒的形式。在本说明书中,“质粒”和“载体”可互换使用,因为质粒是最常用的载体形式。然而,本发明旨在包括此类发挥等同功能的其他形式的表达载体,诸如病毒载体(如复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0224] 本发明的重组表达载体包含本发明的核酸,其形式适于核酸在宿主细胞中的表达,这意味着该重组表达载体包含一个或多个基于将用于表达的宿主细胞而选择的调控序列,其有效连接到待表达的核酸序列。在重组表达载体内,“有效连接”旨在表示所关注的核苷酸序列连接到调节序列,其方式允许该核苷酸序列的表达(例如,在体外转录/翻译系统中或将载体引入宿主细胞时则在宿主细胞中)。术语“调节序列”旨在包括启动子、增强子和其他表达控制元件(如聚腺苷酸化信号)。此类调节序列例如在Goeddel(1990)Methods Enzymol.185:3-7中有所描述。调节序列包括在许多类型的宿主细胞中指导核苷酸序列组成型表达的那些以及只在某些宿主细胞中指导核苷酸序列表达的那些(例如,组织特异性调节序列)。本领域的技术人员将会认识到,表达载体的设计可取决于诸如待转化的宿主细胞的选择、所需的蛋白表达水平等等因素。本发明的表达载体可引入宿主细胞,从而产生通过如本文所述的核酸编码的蛋白或肽(包括融合蛋白或肽)(例如PD-L3OR VISTA多肽、PD-L3OR VISTA多肽的突变体形式、融合蛋白等等)。

[0225] 可设计本发明的重组表达载体以在原核或真核细胞中表达PD-L3OR VTSTA多肽。例如,PD-L3OR VTSTA多肽可在细菌细胞(诸如大肠杆菌)、昆虫细胞(使用杆状病毒表达载体)、酵母细胞或哺乳动物细胞中表达。合适的宿主细胞在Goeddel(1990)同上中有进一步讨论。可选地,可例如使用T7启动子调节序列和T7聚合酶在体外转录和翻译重组表达载体。纯化的融合蛋白可用于PD-L3ORVISTA活性检测分析(如下文将详细描述的直接检测分析或竞争检测分析)或例如生成PD-L3OR VISTA多肽的特异性抗体。在另一个实施方案中,PD-L3OR VISTA表达载体为酵母表达载体。在酿酒酵母(S.cerevisiae)中表达的载体的实例包括pYepSec1(Baldari等(1987)EMBO J.6:229-234)、pMFa(Kuijan和Herskowitz(1982)Cell30:933-943)、pJRY88(Schultz等(1987)Gene 54:113-123)、pYES2(Invitrogen Corporation,San Diego,Calif.)和picZ(Invitrogen Corp,SanDiego,Calif.)。可选地,PD-L3OR VISTA多肽可使用杆状病毒表达载体在昆虫细胞中表达。可用于在培养的昆虫细胞(例如Sf9细胞)中表达多肽的杆状病毒载体包括pAc系列(Smith等(1983)Mol.ell Biol.3:2156-2165)和pVL系列(Lucklow和Summers(1989)Virology170:31-39)。在又一个实施方案中,本发明的核酸使用哺乳动物表达载体在哺乳动物细胞中表达。哺乳动物表达载体的实例包括pCDM8(Seed,B.(1987)Nature 329:840)和pMT2PC(Kaufman等(1987)EMBO

J.6:187-195)。当用于哺乳动物细胞时,表达载体的控制功能通常由病毒调节元件提供。例如,常用的启动子衍生自多瘤病毒、2型腺病毒、巨细胞病毒和猿猴病毒40。对于适合原核和真核细胞两者的其他表达系统,参见Sambrook,J.等,Molecular Cloning:ALaboratory Manual.第2版,Cold Spring Harbor Laboratory,ColdSpring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1989中的第16和17章。

[0226] 在另一个实施方案中,重组哺乳动物表达载体能够指导优先在特定细胞类型中的核酸表达(如,组织特异性调节元件用于表达核酸)。组织特异性调节元件在本领域中是已知的。合适的组织特异性启动子的非限制性实例包括白蛋白启动子(肝特异性;Pinkert等(1987)Genes Dev.1:268-277)、淋巴特异性启动子(Calame和Eaton(1988)Adv.Immunol.43:235-275)、T细胞受体的特定启动子(Winoto和Baltimore(1989)EMBO J.8:729-733)和免疫球蛋白(Baneiji等(1983)Cell33:729-740;Queen和Baltimore(1983)Cell 33:741-748)、神经元特异性启动子(如,神经丝启动子;Byrne和Ruddle(1989)Proc Natl.Acad.Sci.USA 86:5473-5477)、胰腺特异性启动子(Edlund等(1985)Science230:912-916)和乳腺特异性启动子(如乳清启动子;美国专利No.4,873,316和欧洲专利公布No.264,166)。发育调节的启动子也包括在内,例如通过鼠hox启动子(Kessel和Gruss(1990)Science 249:374-379)和α-甲胎蛋白启动子(Campes和Tilghman(1989)Genes Dev.3:537-546)。

[0227] 本发明进一步提供包含本发明DNA分子的重组表达载体,所述分子以反义取向克隆进表达载体。也就是说,DNA分子有效连接到调节序列,其方式允许PD-L3OR VISTA mRNA的反义RNA分子的表达(通过DNA分子的转录)。可对有效连接到以反义取向克隆的核酸分子的调节性序列进行选择,其指导多种细胞类型中反义RNA分子的连续表达,例如病毒启动子和/或增强子,或者可对调节序列进行选择,其指导反义RNA的组成型、组织特异性或细胞类型特异性表达。反义表达载体的形式可以为重组质粒、噬菌粒和减毒病毒,其中反义核酸分子在高效调节区的控制下产生,其活性可通过载体所引入的细胞类型而决定。有关使用反义基因调节基因表达的讨论,参见Weintraub,H.等,Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis,Reviews-Trends in Genetics,Vol.1(1)1986。

[0228] 本发明的另一方面涉及将本发明的PD-L3OR VISTA核酸分子引入其中的宿主细胞,例如重组表达载体内的PD-L3OR VISTA核酸分子,或包含允许其同源重组到宿主细胞基因组特定位点中的序列的PD-L3OR VISTA核酸分子。术语"宿主细胞"和"重组宿主细胞"可在本文互换使用。应当理解,此类术语不仅指代特定的受试者细胞,还指代这样的细胞的子代或潜在子代。由于某些修饰可能会因突变或环境影响而在后代中发生,因此这种子代事实上可以不与亲代细胞相同,但仍包括在如本文所用的术语的范围内。宿主细胞可以是任何原核或真核细胞。载体DNA可通过常规转化或转染技术引入原核或真核细胞。如本文所用,术语"转化"和"转染"意指多种本领域公认的用于将外源核酸(如DNA)引入宿主细胞的技术,包括磷酸钙或氯化钙共沉淀、DEAE葡聚糖介导的转染、脂质体转染或电穿孔。合适的转化或转染宿主细胞的方法可见于Sambrook等(Molecular Cloning:ALaboratory Manual.第2版,Cold Spring Harbor Laboratory,ColdSpring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1989)以及其他实验室手册。为了鉴定和选择这些要素,通常将编码选择性标记(如抗生素抗性)的基因与所关注的基因一起引入宿主细胞。优选的

选择性标记包括对药物(诸如G418、潮霉素和甲氨蝶呤)赋予抗性的那些。本发明的宿主细胞,诸如培养中的原核或真核宿主细胞,可用于产生(即,表达)PD-L3OR VISTA多肽。因此,本发明进一步提供使用本发明的宿主细胞产生PD-L3OR VISTA多肽的方法。在一个实施方案中,该方法包括在合适的培养基中培养本发明的宿主细胞(已向其中引入了编码PD-L3OR VISTA多肽的重组表达载体),使得产生PD-L3OR VISTA多肽。在另一个实施方案中,该方法进一步包括从培养基或宿主细胞中分离PD-L3OR VISTA多肽。

[0229] 本发明的宿主细胞还可用于产生非人转基因动物。例如,在一个实施方案中,本发明的宿主细胞为已向其中引入了PD-L3OR VISTA编码序列的受精卵或胚胎干细胞。此类宿主细胞然后可用于创建非人转基因动物,其中已将外源PD-L3OR VISTA序列引入它们的基因组;或同源重组动物,其中已改变了内源PD-L3OR VISTA序列。此类动物可用于研究PD-L3OR VISTA的功能和/或活性以及用于鉴定和/或评价PD-L3OR VISTA活性的调节因子。如本文所用,“转基因动物”是非人动物,优选地为哺乳动物,更优选地为啮齿动物诸如大鼠或小鼠,其中动物细胞的一个或多个包含转基因。转基因动物的其他实例包括非人灵长类动物、绵羊、狗、牛、山羊、鸡、两栖动物等等。转基因是整合进转基因动物发育细胞的基因组中并保留在成熟动物基因组中的外源DNA,从而指导转基因动物的一种或多种细胞类型或组织中编码基因产物的表达。如本文所用,“同源重组动物”是非人动物,优选地为哺乳动物,更优选地为小鼠,其中内源性PD-L3ORVISTA基因已通过内源性基因与动物发育前引入动物细胞(例如动物胚胎细胞)中的外源性DNA分子之间的同源重组而改变。本发明的转基因动物可通过以下方式创建:将编码PD-L3OR VISTA的核酸引入受精卵的精核,例如通过显微注射、逆转录病毒感染,然后让受精卵在假孕雌性暂养动物中发育。SEQ ID NO:1或4的PD-L3OR VISTAcDNA序列可作为转基因引入非人动物的基因组。可选地,人PD-L3OR VISTA基因的非人同系物,诸如猴或大鼠PD-L3OR VISTA基因,可用作转基因。可选地,PD-L3OR VISTA基因同系物,诸如另一种PD-L3OR VISTA家族成员,可基于与SEQ ID NO:1或3的PD-L3ORVISTA cDNA序列的杂交而分离(在上文的第I小节中进一步描述)并用作转基因。内含子序列和聚腺苷酸化信号也可包含在转基因中以提高转基因表达的效率。组织特异性调节序列可有效连接到PD-L3ORVISTA转基因以指导PD-L3OR VISTA多肽在特定细胞中的表达。通过胚胎操作和显微注射产生转基因动物(尤其是诸如小鼠的动物)的方法已成为本领域的常规方法,并例如在Leder等人的美国专利No.4,736,866和4,870,009、Wagner等人的美国专利No.4,873,191中以及在Hogan,B.,Manipulating the Mouse Embryo,(Cold SpringHarbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1986)中有所描述。类似的方法用于产生其他转基因动物。转基因创始动物可基于PD-L3OR VISTA转基因在其基因组中的存在性和/或PD-L3OR VISTAmRNA在动物组织或细胞中的表达而鉴定。转基因创始动物然后可用于繁殖携带转基因的另外动物。此外,携带编码PD-L3OR VISTA多肽的转基因的转基因动物可进一步繁殖成携带其他转基因的其他转基因动物。

[0230] 为了创建同源重组动物,制备包含PD-L3OR VISTA基因至少一部分的载体,已向所述基因中引入了缺失、添加或取代,从而改变例如在功能破坏上PD-L3OR VISTA基因。PD-L3OR VISTA基因可以是人或鼠基因(如SEQ ID NO:1或3的cDNA)。

[0231] 在另一个实施方案中,可产生这样的转基因非人动物,其包含允许转基因的调节性表达的所选系统。这样的系统的一个实例为P1噬菌体的cre/loxP重组酶系统。有关cre/

loxP重组酶的描述，参见例如Lakso等(1992)Proc Natl.Acad.Sci.USA 89:6232-6236。重组酶系统的另一个实例为酿酒酵母的FLP重组酶系统(O'Gorman等(1991)Science 251:1351-1355)。如果将cre/loxP重组酶用于调节转基因的表达，则需要包含编码Cre重组酶和所选多肽两者的转基因的动物。此类动物可通过构建"双"转基因动物而提供，例如，通过交配两个转基因动物，一者含有编码所选多肽的转基因，另一者包含编码重组酶的转基因。

[0232] 本文所述的非人转基因动物的克隆也可根据Wilmut,I.等(1997)Nature 385:810-813以及PCT国际公布No.WO 97/07668和WO97/07669中所述的方法产生。简而言之，可分离得自转基因动物的细胞(例如体细胞)，然后进行诱导以退出生长周期并进入G0期。静止细胞然后可例如通过使用电脉冲而融合到得自与分离静止细胞相同物种动物的去核卵母细胞。重构的卵母细胞然后进行培养，使得发育到桑椹胚期或胚泡期，然后转移到假孕雌性暂养动物中。此雌性暂养动物产生的子代将是分离细胞(如体细胞)的动物的克隆。

[0233] Ⅳ.药物组合物

[0234] 本发明的PD-L3OR VISTA分子，如PD-L3OR VISTA核酸分子、PD-L3OR VISTA多肽片段以及抗PD-L3OR VISTA抗体(也称为"活性化合物"或"调节剂")可掺入适合施用的药物组合物中。此类组合物通常包含核酸分子、多肽或抗体以及载体，例如药学上可接受的载体。如本文所用，用语"药学上可接受的载体"旨在包括与药物施用相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等等。将此类介质和试剂用于药学活性物质是本领域熟知的。除非任何常规介质或试剂与活性化合物不相容，否则均设想了其在组合物中的应用。还可以向组合物中掺入补充性活性化合物。

[0235] 如所述，此类组合物另外可包含所需的抗原(如肿瘤抗原)或另一种免疫调节化合物诸如Toll样受体激动剂、1型干扰素诸如α和β干扰素以及CD40激动剂诸如激动性CD40抗体和抗体片段，优选地为抗人CD40激动性抗体和抗体片段或其他免疫增强剂或抑制剂诸如PD-L1、PD-L2、CTLA4融合蛋白及其特异性抗体。

[0236] 在一些优选的实施方案中，组合物或基于PD-L3OR VISTA的疗法可进一步包含抗原或其他免疫激动剂。当存在于组合物或疗法中时，抗原可按结合其他组分时能有效产生对抗原的免疫应答的量施用。例如，抗原可按约100μg/kg至约100mg/kg的量施用。在一些实施方案中，抗原可按约10μg/kg至约10mg/kg的量施用。在一些实施方案中，抗原可按约1mg/kg至约5mg/kg的量施用。然而，构成产生免疫应答有效量的抗原的特定量在一定程度上取决于诸如以下的某些因素，例如所施用的特定抗原；所施用的特定激动剂及其量；所施用的特定激动剂及其量；免疫系统状态；施用激动剂和抗原的方法及顺序；制剂施用给的物种；以及所需的治疗结果。因此，一般而言，阐述构成抗原有效量的量是不实际的。然而，本领域的技术人员可通过考虑此类因素而容易地确定合适的量。

[0237] 抗原可以是能够提高Th1免疫应答的任何物质，所述应答可以包括例如CD8+T细胞应答、NK T细胞应答、γ/δT细胞应答或Th1抗体应答中的一者或多者。合适的抗原包括但不限于肽、多肽、脂质、糖脂、多糖、碳水化合物、多核苷酸、朊病毒、活或灭活细菌、病毒或真菌，以及细菌、病毒、真菌、原生动物、肿瘤源性或生物体源性抗原、毒素或类毒素。

[0238] 此外，某些目前实验性的不提高强免疫应答的抗原，特别是诸如重组蛋白、糖蛋白和肽的物质，可结合本发明的佐剂组合而使用。示例的实验性亚单位抗原包括与病毒性疾病相关的那些，诸如腺病毒、AIDS、水痘、巨细胞病毒、登革热、猫白血病、禽类瘟疫、甲肝、乙

肝、HSV-1、HSV-2、猪瘟、甲型流感、乙型流感、日本脑炎、麻疹、副流感病毒、狂犬病、呼吸道合胞病毒、轮状病毒、疣和黄热病。

[0239] 在一个实施方案中，抗原可以是癌抗原或肿瘤抗原。术语“癌抗原”和“肿瘤抗原”可互换使用并指由癌细胞差异表达的抗原。因此，癌抗原可用于差异靶向针对癌细胞的免疫应答。癌抗原可因此潜在地刺激肿瘤特异性免疫应答。某些癌抗原由正常细胞编码，但不一定由正常细胞表达。其中一些这样的抗原可表征为在正常细胞中通常沉默(即，不表达)、只在分化的某些阶段表达的那些以及暂时表达的那些(如胚胎和胎儿抗原)。其他癌抗原可通过突变细胞基因编码，诸如例如癌基因(如活化的ras癌基因)、抑制基因(如突变体p53)或通过内部缺失或染色体易位而产生的融合蛋白。另外的其他癌抗原可通过病毒基因编码，诸如RNA和DNA肿瘤病毒携带的那些基因。

[0240] 肿瘤抗原的实例包括：MAGE、MART-1/Melan-A、gp100、二肽基肽酶IV(DPPUV)、腺苷脱氨酶结合蛋白(ADAbp)、亲环素b、结直肠相关抗原(CRC)-C017-1A/GA733、癌胚抗原(CEA)及其抗原表位CAP-1和CAP-2、etv6、am11、前列腺特异性抗原(PSA)及其抗原表位PSA-1、PSA-2和PSA-3、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、T细胞受体/CD3-ζ链、肿瘤抗原MAGE家族(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-C 1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、MAGE-C5)、肿瘤抗原GAGE家族(如GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、GAGE-9)、BAGE、RAGE、LAGE-1、NAG、GnT-V、MUM-1、CDK4、酪氨酸酶、p53、MUC家族、HER2/neu、p21ras、RCAS1、α-甲胎蛋白、ε-钙粘蛋白、α-连环蛋白、β-连环蛋白、γ-连环蛋白、p120ctn、gp10.sup.Pmel 117、PRAME、NY-ESO-1、cdc27、腺瘤样结肠息肉癌蛋白(APC)、胞衬蛋白、连接蛋白37、Ig独特型、p15、gp75、GM2和GD2神经节甘脂、病毒产物诸如人乳头状瘤病毒蛋白、肿瘤抗原Smad家族、Imp-1、PIA、EBV编码核抗原(EBNA)-1、脑糖原磷酸化酶、SSX-1、SSX-2(HOM-MEL-40)、SSX-3、SSX-4、SSX-5、SCP-1和CT-7以及c-erbB-2。

[0241] 癌或肿瘤以及与此类肿瘤相关(但不排他)的特异性肿瘤抗原包括：急性淋巴母细胞性白血病(etv6、am11、亲环素b)、B细胞淋巴瘤(Ig独特型)、胶质瘤(E-钙粘蛋白、α-连环蛋白、β-连环蛋白、γ-连环蛋白、p120ctn)、膀胱癌(p21ras)、胆管癌(p21ras)、乳腺癌(MUC家族、HER2/neu、c-erbB-2)、宫颈癌(p53、p21ras)、结肠癌(p21ras、HER2/neu、c-erbB-2、MUC家族)、结直肠癌(结直肠相关抗原(CRC)-C017-1A/GA733、APC)、绒毛膜癌(CEA)、上皮细胞癌(亲环素b)、胃癌(HER2/neu、c-erbB-2、ga733糖蛋白)、肝细胞癌(甲胎蛋白)、霍奇金淋巴瘤(Imp-1、EBNA-1)、肺癌(CEA、MAGE-3、NY-ESO-1)、淋巴细胞性白血病(亲环素b)、黑素瘤(p5蛋白、gp75、癌胚抗原、GM2和GD2神经节苷脂、Melan-A/MART-1、cdc27、MAGE-3、p21ras、gp100.sup.Pmel 117)、骨髓瘤(MUC家族、p21ras)、非小细胞肺癌(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(前列腺特异性抗原(PSA)及其抗原表位PSA-1、PSA-2和PSA-3、PSMA、HER2/neu、c-erbB-2、ga733糖蛋白)、肾癌(HER2/neu、c-erbB-2)、宫颈和食道鳞状细胞癌(病毒产物，诸如人乳头状瘤病毒蛋白)、睾丸癌(NY-ESO-1)和T细胞白血病(HTLV-1表位)。

[0242] 本发明的药物组合物配制成与预期施用途径相容。施用途径的实例包括胃肠外，如静脉内、真皮内、皮下、口腔(如吸入)、透皮(如外用)、粘膜和直肠施用。用于胃肠外、真皮

内或皮下应用的溶液剂或混悬剂可包含以下组分:无菌稀释剂,诸如注射用水、盐水溶液、非挥发性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗菌剂,诸如苄醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,诸如乙二胺四乙酸;缓冲剂,诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;以及调节张力的试剂,诸如氯化钠或右旋糖。pH值可用酸或碱调节,诸如盐酸或氢氧化钠。胃肠外制剂可封装在安瓿、一次性注射器或由玻璃或塑料制成的多剂量西林瓶中。

[0243] 适于注射使用的药物组合物包括无菌水溶液(如果为水溶性的)或分散剂以及适于临时配制无菌注射溶液或分散剂的无菌粉末。对于静脉内施用,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL.TM.(BASF,Parsippany,NJ.)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,组合物都必须为无菌的,并且应当为达到易于注射程度的液体。其在生产和贮存条件下必须稳定,并且必须防止微生物诸如细菌和真菌的污染作用。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液态聚乙二醇等)及其合适混合物的溶剂或分散介质。例如,通过使用诸如卵磷脂等包被材料,在分散液的情况下通过保持所需的粒度,以及通过使用表面活性剂,可以保持适当的流动性。防止微生物作用可通过各种抗菌剂和抗真菌剂实现,例如尼泊金、氯代丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等。在很多情况下,组合物中优选包含等渗剂,例如,糖、多元醇诸如甘露糖醇、山梨糖醇,以及氯化钠。可通过在组合物中包含延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸铝和明胶,来实现注射用组合物的延长吸收。

[0244] 无菌注射溶液可通过以下方式配制:将活性化合物(如,调节剂,诸如PD-L3OR VISTA核酸分子、PD-L3OR VISTA多肽片段、抗PD-L3OR VISTA抗体、或抗PD-L3OR VISTA抗体与抗PD-L1抗体的组合)以所需的量掺入具有上列成分之一或组合(根据需要)的合适溶剂中,然后进行除菌过滤。通常,通过将活性化合物掺入到含有基本分散介质和上面所列其他所需成分的无菌媒介物中而制备分散剂。对于用于制备无菌注射溶液的无菌粉末而言,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,该方法由其预先无菌过滤的溶液得到活性成分加任何额外所需成分的粉末。

[0245] 口腔组合物通常包含惰性稀释剂或可食用载体。它们可封装在明胶胶囊中或压制成片。对于口服治疗施用的目的,活性化合物可与赋形剂复合并以片剂、锭剂或胶囊剂形式使用。口腔组合物还可使用液体载体制备以用作漱口水,其中液体载体中的化合物经口腔应用并漱洗和吐出或吞下。药学上相容的粘合剂和/或佐剂材料可包含在内作为组合物的一部分。片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂等等可包含以下成分或具有类似性质的化合物中的任何一种:粘合剂,诸如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂,诸如淀粉或乳糖;崩解剂,诸如藻酸、Primogel或玉米淀粉;润滑剂,诸如硬脂酸镁或Sterotes;助流剂,诸如胶态二氧化硅;甜味剂,诸如蔗糖或糖精;或矫味剂,诸如胡椒薄荷、水杨酸甲酯或橙香精。

[0246] 对于通过吸入施用,化合物从装有合适推进剂(如,诸如二氧化碳的气体)的压力容器或分配器中或喷雾器中以喷雾剂的形式递送。

[0247] 全身性施用还可以通过经粘膜或透皮方法进行。对于经粘膜或透皮施用,在制剂中使用适于待渗透的屏障的渗透剂。此类渗透剂在本领域中是众所周知的,并包括例如用于经粘膜施用的洗涤剂、胆汁盐和夫西地酸衍生物。经粘膜施用可通过使用鼻喷剂或栓剂而实现。对于透皮施用,将活性化合物配制成如本领域众所周知的软膏剂、药膏、凝胶剂或乳膏剂。

[0248] 化合物还可配制成栓剂形式(如,通过常规栓剂基质,诸如可可油和其他甘油酯)或灌肠剂用于直肠递送。在一个实施方案中,将活性化合物与将避免化合物从体内快速消除的载体一起制备,诸如控释制剂,包括植入物和微囊化递送系统。可以使用可生物降解的、生物相容的聚合物,诸如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐类、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于配制此类制剂的方法对本领域的技术人员而言将显而易见。这些材料还可从Alza Corporation和NovaPharmaceuticals,Inc.商购获得。脂质体混悬剂(包括含有针对病毒抗原的单克隆抗体的靶向感染细胞的脂质体)也可用作药学上可接受的载体。这些均可根据本领域技术人员已知的方法而制备,例如,如美国专利No.4,522,811中所述。

[0249] 特别有利的是将口腔或胃肠外组合物配制成容易施用并且剂量均匀的剂量单位形式。如本文所用的剂量单位形式是指适合作为单位剂量用于所治疗的受试者的物理不连续单位;每个单位含有预定量的活性化合物,经计算该预定量的活性化合物与所需的药物载体组合产生所需的治疗效果。对本发明剂量单位形式的具体说明限定于且直接依赖于活性化合物的独特特性和要达到的特定治疗效果,和本领域中固有的对于配制这种用于治疗个体的活性化合物的限制。

[0250] 此类化合物的毒性和治疗疗效可通过在细胞培养或实验动物中的标准制药学方法而确定。从细胞培养检测分析和动物研究中获得的数据可用于配制一系列人用剂量。此类化合物的剂量优选地位于包括具有低毒性或无毒性的ED50的循环浓度范围内。剂量可以在此范围内根据采用的剂型以及所用的施用途径而变化。对于用于本发明方法中的任何化合物,治疗有效剂量可最初通过细胞培养检测分析而估计。可以在动物模型中配制剂量,以达到包括在细胞培养中确定的IC50(即,达到症状的半最大抑制的测试化合物的浓度)的循环血浆浓度范围。此类信息可用于更准确地确定人体中的有用剂量。血浆中的水平可例如通过高效液相色谱法测量。

[0251] 如本文所定义,蛋白或多肽的治疗有效量(即,有效剂量)在约0.001至30mg/kg体重,优选约0.01至25mg/kg体重,更优选约0.1至20mg/kg体重,甚至更优选约1至10mg/kg、2至9mg/kg、3至8mg/kg、4至7mg/kg或5至6mg/kg体重的范围内。技术人员将认识到,某些因素可影响有效治疗受试者所需的剂量,包括但不限于疾病或失调的严重性、之前的治疗、受试者的整体健康情况和/或年龄以及存在的其他疾病。此外,用治疗有效量的蛋白、多肽或抗体治疗受试者可包括单次治疗,或优选地可包括一系列治疗。

[0252] 在一个优选的实例中,将受试者用约0.1至20mg/kg体重范围内的抗体、蛋白或多肽治疗,每周一次,持续约1至10周,优选地2至8周,更优选地约3至7周,甚至更优选地约4、5或6周。还将认识到,用于治疗的抗体、蛋白或多肽的有效剂量可随着特定治疗的过程而提高或降低。剂量变化可以产生,并通过本文所述的诊断检测分析的结果而变得明显。

[0253] 本发明涵盖调节PD-L3OR VISTA的表达或活性的试剂。试剂可以例如为小分子。例如,此类小分子包括但不限于肽、拟肽、氨基酸、氨基酸类似物、多核苷酸、多核苷酸类似物、核苷酸、核苷酸类似物、分子量低于约10,000克每分子的有机或无机化合物(即,包括混合有机和有机金属化合物)、分子量低于约5,000克每分子的有机或无机化合物、分子量低于约1,000克每分子的有机或无机化合物、分子量低于约500克每分子的有机或无机化合物以及此类化合物的盐、酯和其他药学上可接受的形式。应当理解,小分子试剂的合适剂量取决于普通技术医生、兽医或研究人员知识范围内的多种因素。小分子的剂量将例如根据所治

疗的受试者或样本的身份、大小和病症而变化，进一步根据组合物施用途径(适用时)以及医师希望小分子对本发明的核酸或多肽产生的作用而变化。

[0254] 示例性剂量包括每千克受试者或样本体重毫克或微克量的小分子(例如，每千克约1微克至每千克约500毫克，每千克约100微克至每千克约5毫克，或每千克约1微克至每千克约50微克)。还应当理解，小分子的合适剂量取决于小分子相对于待调节的表达或活性的效能。此类合适的剂量可使用本文所述的检测分析法确定。当要将这些小分子中的一者或多者施用给动物(如，人)以便调节本发明的多肽或核酸的表达或活性时，医生、兽医或研究人员可例如首先开具相对低的剂量处方，然后增加剂量，直到获得合适的响应。此外，应当理解，任何特定动物受试者的具体剂量水平将随多种因素而变化，包括所用具体化合物的活性，受试者年龄、体重、整体健康情况、性别和饮食、施用时间、施用途径、排泄率、任何药物组合，以及待调节的表达或活性的程度。

[0255] 进一步地，抗体(或其片段)可偶联到治疗性部分诸如细胞毒素、治疗剂或放射性金属离子。细胞毒素或细胞毒性剂包括对细胞有害的任何试剂。实例包括紫杉醇、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙啶、吐根碱、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙素、阿霉素、柔红霉素、二羟基蒽醌(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌、光辉霉素、放线菌素D、1-脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素以及它们的类似物或同系物。治疗剂包括但不限于抗代谢物(例如，甲氨喋呤、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、达卡巴嗪(decarbazine))，烷化剂(例如，氮芥、噻替派苯丁酸氮芥(thioepa chlorambucil)、美法仑、卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露糖醇、链唑霉素、丝裂霉素C和顺-二氯二胺合铂(Ⅱ)(DDP)顺铂)、蒽环类(例如，柔红菌素(以前称为道诺霉素)和阿霉素)、抗生素类(例如，放线菌素D(以前称为放线菌素)、博来霉素、光辉霉素和安曲霉素(AMC))，以及抗有丝分裂剂(例如，长春新碱和长春碱)。

[0256] 本发明的偶联物可以用来改变给定的生物学反应，且药物部分不应理解为局限于经典的化疗剂。例如，药物部分可以是具有需要的生物活性的蛋白或多肽。此类多肽可以包括例如毒素，诸如相思豆毒素、蓖麻毒素A、假单胞菌外毒素或白喉毒素；蛋白，诸如肿瘤坏死因子、α-干扰素、β-干扰素、神经生长因子、血小板源性生长因子、组织型纤溶酶原激活剂；或生物反应调节物，诸如淋巴因子、白介素-1("IL-1")、白介素-2("IL-2")、白介素-6("IL-6")、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子("GM-CSF")、粒细胞集落刺激因子("G-CSF")或其他生长因子。偶联此类治疗性部分或抗体的技术是熟知的。

[0257] 本发明的核酸分子可插入载体中并用作基因治疗载体。基因治疗载体可通过例如静脉内注射、局部施用(参见美国专利No.5,328,470)或通过立体定位注射(参见例如Chen等(1994)Proc Natl.Acad.Sci.USA 91:3054-3057)而递送给受试者。基因治疗载体的药物制剂可包含合适的稀释剂中的基因治疗载体，或可包含基因递送媒介物所嵌入的缓释基质。可选地，如果整个基因递送载体可完整地由重组细胞产生(如逆转录病毒载体)，则药物制剂可包含产生基因递送系统的一个或多个细胞。药物组合物可与用药说明一起装在容器、包或分配器中。

[0258] Ⅴ.本发明的应用和方法

[0259] 本文所述的PD-L3OR VISTA分子，如PD-L3OR VISTA核酸分子、多肽、多肽同系物和

抗体及抗体片段可用于以下方法中的一种或多种:a)筛选检测分析;b)预测医学(如,诊断检测分析、预后检测分析和临床试验监测);以及c)治疗方法(如,治疗和预防,如通过上调或下调免疫应答)。如本文所述,本发明的PD-L3OR VISTA多肽具有以下活性中的一种或多种:1)结合到其天然结合伴侣和/或调节其天然结合伴侣的活性,2)调节细胞内或细胞间信号传导,3)调节T淋巴细胞的活化,4)调节生物体的免疫应答,如哺乳动物生物体,诸如小鼠或人。本发明的分离的核酸分子可用于例如表达PD-L3OR VISTA多肽(如,在基因疗法应用中通过宿主细胞中的重组表达载体)、检测PD-L3OR VISTA mRNA(如,在生物样品中)或PD-L3OR VISTA基因中的遗传变化以及调节PD-L3OR VISTA活性,如下文进一步所述。PD-L3OR VISTA多肽可用于治疗特征在于PD-L3OR VISTA多肽的产生或PD-L3OR VISTA抑制剂的产生不足或过量的病症或疾病。此外,PD-L3OR VISTA多肽可用于筛选天然存在的PD-L3ORVISTA结合伴侣,筛选调节PD-L3OR VISTA活性的药物或化合物,以及治疗特征在于PD-L3OR VISTA多肽的产生或下述PD-L3ORVISTA多肽形式的产生不足或过量的病症或疾病,所述多肽形式与PD-L3OR VISTA野生型多肽相比具有降低的、异常的或不需要的活性(例如,免疫系统疾病诸如重症联合免疫缺陷、多发性硬化、系统性红斑狼疮、I型糖尿病、淋巴增生综合征、炎性肠病、过敏、哮喘、移植物抗宿主病和移植排斥;对感染性病原体诸如细菌和病毒的免疫应答;以及免疫系统癌症诸如淋巴瘤和白血病)。此外,本发明的抗PD-L3OR VISTA抗体可用于检测和分离PD-L3OR VISTA多肽,调节PD-L3OR VISTA多肽的生物利用率以及调节PD-L3OR VISTA活性,例如通过调节PD-L3ORVISTA与其天然结合伴侣之间的相互作用。

[0260] A.筛选检测分析:

[0261] 本发明提供鉴定下述调节剂,即候选或测试化合物或试剂(如,肽、拟肽、小分子或其他药物)的方法(在本文中也称为"筛选检测分析"),所述调节剂结合到PD-L3OR VISTA多肽,对例如PD-L3ORVISTA表达或PD-L3OR VISTA活性具有刺激或抑制作用,或对PD-L3OR VISTA与其天然结合伴侣之间的相互作用具有刺激或抑制作用。

[0262] 在一个实施方案中,本发明提供筛选候选或测试化合物的检测分析法,所述化合物结合到PD-L3OR VISTA蛋白或多肽或其生物活性部分,例如调节PD-L3OR VISTA多肽与其天然结合伴侣之间的相互作用的能力。在另一个实施方案中,本发明提供筛选候选或测试化合物的检测分析法,所述化合物结合到PD-L3OR VISTA蛋白或多肽或其生物活性部分或调节其活性。在一个优选的实施方案中,本发明提供筛选候选或测试化合物的检测分析法,所述化合物对由诸如本文所鉴定的PD-L3OR VISTA负调节的免疫功能具有刺激或抑制作用,或基于其对PD-L3OR VISTA与其天然结合伴侣之间相互作用的影响。这些PD-L3OR VISTA相关功能以举例方式包括抑制细胞因子产生(如T细胞产生的I1-2,γ干扰素)、抑制适度的CD28协同刺激、抑制CD4+和CD8+T细胞增殖、抑制首次接触试验的和记忆CD4+T细胞增殖以及抑制TCR活化而不诱导细胞凋亡。本发明的测试化合物可使用本领域已知的组合文库方法中的任何多种途径而获得,包括:生物学文库;空间可寻址平行固相或液相文库;需要去卷积的合成文库方法;"一珠一化"文库方法;以及使用亲和层析选择的合成文库方法。生物学文库途径不限于肽文库,而其他四种途径适用于肽、非肽寡聚物或化合物的小分子文库(Lam,K.S.(1997)Anticancer Drug Des.12:145)。

[0263] 在一个实施方案中,检测分析法为基于细胞的检测分析法,其中将表达PD-L3OR VISTA多肽或其生物活性部分的细胞与测试化合物接触,然后确定测试化合物调节PD-L3OR

VISTA活性的能力。确定测试化合物调节PD-L3OR VISTA活性的能力可通过监测例如PD-L3OR VISTA结合其天然结合伴侣和调节免疫细胞活性的能力而实现。免疫细胞可以是例如T细胞、B细胞或骨髓细胞。确定测试化合物调节PD-L3OR VISTA结合其反受体(待测定)的能力可例如通过以下方式实现:将PD-L3OR VISTA与放射性同位素或酶标签偶联,以监测测试化合物调节PD-L3OR VISTA结合到表达PD-L3ORVISTA反受体的T细胞的能力。确定测试化合物结合PD-L3ORVISTA的能力可例如通过以下方式实现:将化合物与放射性同位素或酶标签偶联,使得化合物与PD-L3OR VISTA的结合可通过检测复合物中带标签的PD-L3OR VISTA化合物而确定。

[0264] 在不用任何作用物标记的情况下测定化合物与PD-L3OR VISTA相互作用的能力也在本发明的范围内。例如,微生理记录仪可用于在不标记化合物或PD-L3OR VISTA的情况下检测化合物与PD-L3ORVISTA 的相互作用(McConnell,H.M.等(1992)Science257:1906-1912)。如本文所用,“微生理记录仪”(如Cytosensor)是一种分析仪器,其使用光寻址电位传感器(LAPS)测量细胞酸化其环境的速率。此酸化速率的变化可用作化合物与PD-L3OR VISTA之间相互作用的指标。

[0265] 在另一个实施方案中,检测分析法是基于细胞的检测分析,其包括将表达PD-L3OR VISTA结合伴侣的T细胞与测试化合物接触,并测定测试化合物调节(如刺激或抑制)PD-L3OR VISTA结合伴侣活性的能力。测定测试化合物调节PD-L3OR VISTA结合伴侣活性的能力可例如通过以下方式实现:测定PD-L3OR VISTA多肽结合到PD-L3OR VISTA结合伴侣或与其相互作用的能力。

[0266] 测定PD-L3OR VISTA多肽或其生物活性部分结合到PD-L3ORVISTA结合伴侣或与其相互作用的能力可通过上文所述用于测定直接结合的方法之一而实现。在一个优选的实施方案中,测定PD-L3ORVISTA多肽结合到PD-L3OR VISTA结合伴侣或与其相互作用的能力可通过测定结合伴侣的活性而实现。例如,结合伴侣的活性可通过以下方法测定:检测细胞第二信使(如,酪氨酸激酶或磷酸酶活性)的诱导,检测合适底物的催化/酶活性,检测报告基因(包括有效连接到编码可测标记的核酸的靶应答调节元件)的诱导或检测靶调节型细胞应答。例如,测定PD-L3OR VISTA多肽结合到天然PD-L3OR VISTA结合伴侣或与其相互作用的能力可通过以下方式实现:通过在增殖检测分析中测量化合物调节免疫细胞协同刺激或抑制的能力,或通过干扰PD-L3OR VISTA多肽结合到识别PD-L3OR VISTA多肽一部分的抗体的能力。在一个实施方案中,调节T细胞活化的化合物可通过测定化合物调节T细胞增殖或细胞因子产生的能力而鉴定。在一个优选的实施方案中,调节T细胞活化的化合物可通过在不止一种抗原浓度下测定化合物调节T细胞增殖或细胞因子产生的能力而鉴定。

[0267] 在再一个实施方案中,本发明的检测分析法为基于细胞的检测分析法,其中将PD-L3OR VISTA多肽或其生物活性部分与测试化合物接触,然后确定测试化合物结合到PD-L3OR VISTA多肽或其生物活性部分的能力。待用于本发明检测分析法中的PD-L3OR VISTA多肽的优选生物活性部分包括参与与非PD-L3OR VISTA分子的相互作用的片段,例如,结合到PD-L3OR VISTA结合伴侣的胞外域的至少一部分。测试化合物与PD-L3OR VISTA多肽的结合可如上所述直接或间接地测定。

[0268] 在另一个实施方案中,检测分析法为无细胞的检测分析,其中将PD-L3OR VISTA多肽或其生物活性部分与测试化合物接触,然后确定测试化合物调节(如刺激或抑制)PD-

L3OR VISTA多肽或其生物活性部分的活性的能力。测定测试化合物调节PD-L3OR VISTA多肽活性的能力可例如通过以下方式实现:通过上文所述测定直接结合的方法之一测定PD-L3OR VISTA多肽结合到PD-L3OR VISTA结合伴侣的能力。本发明的无细胞检测分析适用于多肽(如,PD-L3OR VISTA多肽或其生物活性部分,或PD-L3OR VISTA所结合的结合伴侣)的可溶和/或膜结合形式。就其中使用膜结合形式的多肽(如,细胞表面PD-L3OR VISTA)的无细胞检测分析法而言,可能有利的是利用增溶剂,使得将膜结合形式的多肽维持在溶液中。此类增溶剂的实例包括非离子洗涤剂,诸如正辛基葡萄糖苷、正十二烷基葡萄糖苷、正十二烷基麦芽糖苷、辛酰基-N-甲基葡萄糖胺、癸酰基-N-甲基葡萄糖胺、Triton.RTM.X-100、Triton.RTM.X-114、Thesit、异十三烷基聚(乙二醇醚)n、3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]-1-丙磺酸内盐(CHAPS)、3-[(3-胆固醇氨丙基)二甲基氨基]-2-羟基-1-丙磺酸盐(CHAPSO)或N-十二烷基.dbd.N,N-二甲基-3-胺基-1-丙磺酸盐。

[0269] 在本发明的上述检测分析法的不止一个实施方案中,可能有利的是固定PD-L3OR VISTA或其结合伴侣以利于所述多肽一者或两者的复合形式与未复合形式的分离,以及适应检测分析的自动化。在存在和不存在候选化合物的情况下测试化合物结合到PD-L3OR VISTA多肽或者PD-L3OR VISTA多肽与其结合伴侣的相互作用可在适于容纳反应物的任何容器中进行。此类容器的实例包括微量滴定板、试管和微量离心管。在一个实施方案中,可提供增添了以下结构域的融合蛋白,所述结构域允许多肽的一者或两者结合到基质。例如,谷胱甘肽-S-转移酶/PD-L3OR VISTA融合蛋白或谷胱甘肽-S-转移酶/结合伴侣融合蛋白可被吸附到谷胱甘肽琼脂糖凝胶珠(Sigma Chemical,St.Louis,Mo.)或谷胱甘肽衍生化微量滴定板,其随后与测试化合物或测试化合物和未吸附的结合伴侣多肽或PD-L3OR VISTA多肽相结合,再将混合物在有利于形成复合物的条件下温育(例如,在盐和pH的生理条件下)。在温育后,将微珠或微量滴定板孔进行洗涤,以移除任何未结合的组分,就微珠而言将基质固定,然后直接或间接地测定复合物形成,例如,如上所述。可选地,可将复合物与基质解离,并使用标准技术测定PD-L3OR VISTA结合或活性的水平。用于在基质上固定多肽的其他技术也可用于本发明的筛选检测分析。在一个替代性的实施方案中,测定测试化合物调节PD-L3OR VISTA多肽活性的能力可通过以下方法实现:测定测试化合物调节起PD-L3OR VISTA下调作用的分子的活性的能力,例如,通过与PD-L3OR VISTA结合伴侣的胞质结构域相互作用。例如,第二信使的水平、相互作用分子对合适靶标的活性或相互作用子与合适靶标的结合可如之前所述而测定。

[0270] 在另一个实施方案中,在一种方法中鉴定PD-L3OR VISTA表达的调节剂,其中将细胞与候选化合物接触,并测定细胞中PD-L3ORVISTA mRNA或多肽的表达。将存在候选化合物时PD-L3OR VISTAmRNA或多肽的表达水平与不存在候选化合物时PD-L3OR VISTAmRNA或多肽的表达水平进行比较。然后,基于此比较,如果变化具有统计学显著性,则可将候选化合物确定为PD-L3OR VISTA表达的调节剂。

[0271] 在本发明的又一个方面,PD-L3OR VISTA多肽可在双杂交检测分析或三杂交检测分析中用作“诱饵蛋白”(参见例如美国专利No.5,283,317;Zervos等(1993)Cell 72:223-232;Madura等(1993)J.Biol.Chem.268:12046-12054;Bartel等(1993)Biotechniques 14:920-924;Iwabuchi等(1993)Oncogene 8:1693-1696;以及Brent WO 94/10300),以鉴定结合到PD-L3OR VISTA或与其相互作用的并牵涉PD-L3ORVISTA活性的其他多肽(“PD-L3OR

VISTA结合蛋白”、“PD-L3ORVISTA结合伴侣”或“PD-L3OR VISTA-bp”)。此类PD-L3OR VISTA结合蛋白还可能通过PD-L3OR VISTA多肽或者PD-L3OR VISTA靶标牵涉信号的传播,作为例如PD-L3OR VISTA介导的信号通路的下游元件。可选地,此类PD-L3OR VISTA结合多肽可以为PD-L3ORVISTA抑制剂。双杂交系统基于大多数转录因子的模块化性质,这些转录因子由可分离的DNA结合和活化结构域组成。简而言之,检测分析法采用两个不同的DNA构建体。在一个构建体中,将编码PD-L3OR VISTA多肽的基因融合到编码已知转录因子(如GAL-4)的DNA结合域的基因。在另一个构建体中,将编码未鉴定的多肽(“猎物”或“样品”)的得自DNA序列文库的DNA序列融合到编码已知转录因子的活化结构域的基因。如果“诱饵”和“猎物”多肽能够在体内相互作用,从而形成PD-L3OR VISTA依赖性复合物,则使转录因子的DNA结合和活化结构域靠近。此靠近允许有效连接到转录调节位点的报告基因(如LacZ)响应转录因子而进行转录。可检测报告基因的表达,并可分离包含功能性转录因子的细胞集落并将其用于获得编码与PD-L3OR VISTA多肽相互作用的多肽的克隆基因。

[0272] 在另一方面,本发明涉及本文所述的两种或更多种检测分析法的组合。例如,可使用基于细胞的或无细胞的检测分析法鉴定调节剂,以及在体内(例如动物中,诸如细胞转化和/或肿瘤发生的动物模型中)确认试剂调节PD-L3OR VISTA多肽活性的能力。

[0273] 本发明进一步涉及通过上文所述的筛选检测分析法鉴定的新型试剂。因此,本发明的范围包括在合适的动物模型中进一步使用如本文所述而鉴定的试剂。例如,如本文所述鉴定的试剂(如,PD-L3ORVISTA调节剂、反义PD-L3OR VISTA核酸分子、PD-L3OR VISTA特异性抗体或PD-L3OR VISTA结合伴侣)可用在动物模型中以确定用这种试剂进行治疗的疗效、毒性或副作用。可选地,如本文所述鉴定的试剂可用在动物模型中以确定这种试剂的作用机理。此外,本发明涉及通过上述筛选检测分析法鉴定的新型试剂用于如本文所述的治疗。

[0274] B.检测分析

[0275] 本文鉴定的cDNA序列的部分或片段(以及相应的完整基因序列)可按多种方式用作多核苷酸试剂。例如,这些序列可用于:(i)在染色体上绘制其各自的基因;并因此找到与遗传疾病相关的基因区域;(ii)通过微量的生物样品鉴定个体(组织分型);以及(iii)帮助生物样品的法医学鉴定。这些应用将在下面的小节中描述。

[0276] 1.染色体作图

[0277] 分离基因序列(或序列一部分)后,可将该序列用于绘制基因在染色体上的位置。此过程称为染色体作图。因此,本文所述的PD-L3ORVISTA核苷酸序列的部分或片段可用于绘制PD-L3OR VISTA基因在染色体上的位置。PD-L3OR VISTA序列对染色体的作图是将这些序列与疾病相关基因相联系的重要的第一步。简而言之,可通过由PD-L3OR VISTA核苷酸序列制备PCR引物(优选长15-25bp)而将PD-L3OR VISTA基因对染色体作图。PD-L3OR VISTA序列的计算机分析可用于预测在基因组DNA中跨度不超过一个外显子从而使扩增过程复杂化的引物。这些引物然后可用于含单独人染色体的体细胞杂种的PCR筛选。只有含有对应于PD-L3OR VISTA序列的人基因的那些杂种才会产生扩增片段。体细胞杂种通过融合来自不同哺乳动物的体细胞(如,人和小鼠细胞)而制备。随着人和小鼠细胞杂种的生长和分裂,它们逐渐以随机顺序丢失人染色体,但保留小鼠染色体。通过使用小鼠细胞无法生长(由于它们缺乏特定的酶)而人细胞可以生长的培养基,将保留一个含有编码所需酶的基因的人染

色体。通过使用各种培养基，可建立起多组杂种细胞系。一组中的每个细胞系含有单个人染色体或低数量的人染色体以及全套小鼠染色体，从而允许容易地将各个基因对特定的人染色体作图(D'Eustachio,P.等(1983)Science 220:919-924)。只含人染色体片段的体细胞杂种还可通过使用具有易位和缺失的人染色体而产生。

[0278] 体细胞杂种的PCR作图是将特定序列分配到特定染色体的快速过程。使用单台热循环仪每天可以分配三个或更多个序列。使用PD-L3OR VISTA核苷酸序列设计寡核苷酸引物时，通过得自特定染色体的多组片段可以实现亚定位。可类似地用于将PD-L3OR VISTA序列对其染色体作图的其他作图策略包括原位杂交(见述于Fan,Y.等(1990)Proc Natl.Acad.Sci.USA 87:6223-27)、通过带标记的流式分选染色体进行预筛选以及通过杂交到染色体特异性cDNA文库而预选。

[0279] DNA序列与中期染色体涂片的荧光原位杂交(FISH)可进一步用于以一步方式提供精确的染色体位置。染色体涂片可使用其分裂已在中期通过破坏有丝分裂纺锤体的化学试剂诸如秋水仙碱而阻断的细胞制备。染色体可通过胰蛋白酶简单处理，并用吉姆萨染色。浅暗条带的图案在每个染色体上显现，使得可单独地鉴定染色体。FISH技术可用在短至500或600个碱基的DNA序列。然而，大于1,000个碱基的克隆具有较高的结合到独特染色体位置的可能性，并具有足够的信号强度，可容易地检测。优选地1,000个碱基，更优选地2,000个碱基将足够以合理的时长获得良好的结果。对于此技术的综述，参见Verma等,Human Chromosomes:A Manual of basic Techniques(Pergamon Press,New York 1988)。染色体作图的试剂可单独使用以标记单一染色体或该染色体上的单个位点，或者多组试剂可用于标记多个位点和/或多个染色体。实际上，对应于基因非编码区的试剂对作图目的是优选的。编码序列在基因家族内更可能是保守的，从而增加染色体作图过程中交叉杂交的机会。

[0280] 对序列作图到精确的染色体位置后，可将染色体上序列的物理位置与遗传图谱数据相关联。最终，可执行得自多个个体的基因的完整测序，以确认突变的存在性以及区分突变与多态性。2.组织分型

[0281] 本发明的PD-L3OR VISTA序列还可用于从微量的生物样品鉴定个体。此外，本发明的序列可用于提供确定个体基因组中所选部分的实际碱基并碱基(base-by-base)DNA序列的替代技术。因此，本文所述的D-L3或VISTA核苷酸序列可用于从序列的5'和3'末端制备两个PCR引物。这些引物然后可用于扩增个体DNA，并随后对其测序。

[0282] 以此方式制备的得自个体的多组相应的DNA序列可提供唯一的个体识别，因为每个个体将由于等位差异而具有一组唯一的此类DNA序列。本发明的序列可用于从个体以及从组织获得此类识别序列。本发明的PD-L3OR VISTA核苷酸序列唯一地代表人基因组的部分。等位变异在这些序列的编码区一定程度上发生，而在非编码区的发生程度较高。据估计，各个人之间的等位变异以每500个碱基大约1次的频率发生。本文所述的序列的每一个可在一定程度上用作标准，而得自个体的DNA可与之比较以用于识别目的。由于在非编码区存在较大数量的多态性，因此需要较少的序列来区分个体。SEQ ID NO:1或4的非编码区可容易地通过一组可能为10至1,000个的引物来提供阳性个体识别，所述每个引物产生100个碱基的非编码扩增序列。若使用预测的编码序列，诸如SEQ ID NO:3或6中的那些，则对于阳性个体识别更合适的引物数量将为500-2000个。

[0283] 如果将得自本文所述的PD-L3OR VISTA核苷酸序列的一组试剂用于生成个体的唯

一识别数据库，则那些相同的试剂随后可用于识别该个体的组织。使用该唯一识别数据库，活或死亡个体的阳性识别可通过极小的组织样品量而实现。

[0284] 3.PD-L3OR VISTA序列在法医生物学中的应用基于DNA的鉴定技术还可用在法医生物学中。本发明的序列可用于提供靶向人基因组中特定基因座的多核苷酸试剂，如PCR引物，其可通过例如提供另一“鉴定标记”(即，对特定个体唯一的另一DNA序列)而提高基于DNA的法医学鉴定的可靠性。如上所述，实际的碱基序列信息可用于鉴定，作为限制性酶生成的片段所形成的模式的准确替代。靶向SEQ ID NO:1或3非编码区的序列尤其适合此用途，因为在非编码区存在较大数量的多态性，使得更易于使用此技术来区分个体。多核苷酸试剂的实例包括PD-L3OR VISTA核苷酸序列或其部分，例如，衍生自SEQ ID NO:1或3的非编码区的长度为至少20个碱基，优选至少30个碱基的片段。本文所述的PD-L3OR VISTA核苷酸序列可进一步用于提供多核苷酸试剂，例如可用于例如原位杂交技术的标记探针或可加标记探针，以鉴定特定的组织，如淋巴细胞。这在法医病理学家面临未知来源的组织时会非常有用。多组此类PD-L3ORVISTA探针可用于按物种和/或按器官类型鉴定组织。以类似的方式，这些试剂，如PD-L3OR VISTA引物或探针可用于筛选组织培养物的污染情况(即，筛选培养物中不同类型细胞的混合物的存在性)。

[0285] C.预测医学

[0286] 本发明还涉及预测医学领域，其中诊断检测分析、预后检测分析以及临床试验监测用于预后(预测)目的从而预防性地治疗个体。因此，本发明的一个方面涉及用于在生物样品(如血液、血清、细胞或组织)背景下测定PD-L3OR VISTA多肽和/或核酸表达以及PD-L3OR VISTA活性的诊断检测分析，从而确定个体是否受疾病或失调的困扰，或是否存在发展疾病的风险，所述疾病或失调与异常的或不需要的PD-L3OR VISTA表达或活性相关。本发明还提供预后(或预测)检测分析法以确定个体是否有发展与PD-L3OR VISTA多肽、核酸表达或活性相关的疾病的风险。例如，可测定生物样品中PD-L3ORVISTA基因的突变。此类检测分析法可用于预后或预测目的，从而在特征在于PD-L3OR VISTA多肽、核酸表达或活性或与之相关的疾病发生之前预防性地治疗个体。

[0287] 本发明的另一方面涉及在临床试验中监测试剂(如，药物、化合物)对PD-L3OR VISTA表达或活性的影响。这些试剂及其他试剂在下面的小节中将进一步详细描述。

[0288] 1.诊断检测分析

[0289] 检测生物样品中PD-L3OR VISTA多肽或核酸存在与否的示例性方法包括：从测试受试者中获得生物样品，将生物样品与能够检测PD-L3OR VISTA多肽或编码PD-L3OR VISTA多肽的核酸(如，mRNA或基因组DNA)的化合物或试剂接触，使得检测该生物样品中PD-L3OR VISTA多肽或核酸的存在性。检测PD-L3OR VISTAmRNA或基因组DNA的优选试剂为能够杂交到PD-L3OR VISTAmRNA或基因组DNA的标记的核酸探针。核酸探针可以为例如SEQID NO:1或3所示的PD-L3OR VISTA核酸或其部分，诸如长度为至少15、30、50、100、250或500个核苷酸并足以在严格条件下特异性杂交到PD-L3OR VISTA mRNA或基因组DNA的寡核苷酸。其他适用于本发明的诊断检测分析的探针在本文进行了描述。检测PD-L3OR VISTA多肽的优选试剂为能够结合到PD-L3OR VISTA多肽的抗体，优选地为带有可检测的标记的抗体。抗体可以是多克隆抗体，或更优选地为单克隆抗体。可以使用完整的抗体或其片段(如Fab或F(ab')2)。关于探针或抗体的术语“标记的”旨在涵盖通过将可检测的物质偶联(即，物理连接)到

探针或抗体而直接标记探针或抗体，以及通过与直接标记的另一试剂的反应性而间接标记探针或抗体。间接标记的实例包括使用荧光标记的二抗检测一抗以及用生物素末端标记DNA探针使得其可通过荧光标记的链霉亲和素检测。术语“生物样品”旨在包括从受试者中分离的组织、细胞和生物流体，以及存在于受试者内的组织、细胞和流体。也就是说，本发明的检测方法可用于在体外以及体内检测生物样品中的PD-L3OR VISTA mRNA、多肽或基因组DNA。例如，体外检测PD-L2 mRNA的技术包括Northern杂交和原位杂交。体外检测PD-L3OR VISTA多肽的技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、Western印迹、免疫沉淀和免疫荧光。体外检测PD-L3OR VISTA基因组DNA的技术包括Southern杂交。此外，体内检测PD-L3OR VISTA多肽的技术包括向受试者引入标记的抗PD-L3OR VISTA抗体。例如，抗体可用放射性标记物进行标记，其在受试者中的存在及位置可通过标准成像技术检测。在一个实施方案中，生物样品包含得自测试受试者的多肽分子。可选地，生物样品可包含得自测试受试者的mRNA分子或得自测试受试者的基因组DNA分子。优选的生物样品为通过常规方法从受试者中分离的血清样品。在另一个实施方案中，所述方法进一步涉及：从对照受试者获取对照生物样品，将对照样品与能够检测PD-L3OR VISTA多肽、mRNA或基因组DNA的化合物或试剂接触，使得检测生物样品中PD-L3ORVISTA多肽、mRNA或基因组DNA的存在性，以及将对照样品中PD-L3OR VISTA多肽、mRNA或基因组DNA的存在性与测试样品中PD-L3OR VISTA多肽、mRNA或基因组DNA的存在性进行比较。

[0290] 本发明还涵盖检测生物样品中PD-L3OR VISTA存在性的试剂盒。例如，该试剂盒可包含：能够检测生物样品中PD-L3OR VISTA多肽或mRNA的标记化合物或试剂；测定样品中PD-L3OR VISTA的量的装置；以及比较样品与标准品中PD-L3OR VISTA的量的装置。该化合物或试剂可包装在合适的容器中。试剂盒可进一步包含使用试剂盒来检测PD-L3OR VISTA多肽或核酸的说明。

[0291] 2.预后检测分析

[0292] 本文所述的诊断方法另外可用于鉴定这样的受试者，其患有与异常的或不需要的PD-L3OR VISTA表达或活性相关的疾病或失调或存在发展所述疾病或失调的风险。如本文所用，术语“异常的”包括偏离野生型PD-L3OR VISTA表达或活性的PD-L3OR VISTA表达或活性。异常的表达或活性包括升高或降低的表达或活性，以及不遵循表达的野生型发展模式或表达的亚细胞模式的表达或活性。例如，异常的PD-L3OR VISTA表达或活性旨在包括：其中PD-L3OR VISTA基因的突变导致PD-L3OR VISTA基因低表达或过表达的情况，以及其中此类突变导致非功能性PD-L3OR VISTA多肽或不以野生型方式发挥功能的多肽的情形，例如，不与PD-L3OR VISTA结合伴侣相互作用的多肽，或与非PD-L3OR VISTA结合伴侣相互作用的多肽。如本文所用，术语“不需要的”包括生物应答诸如免疫细胞活化中涉及到的不需要的现象。例如，术语“不需要的”包括受试者中不可取的PD-L3OR VISTA表达或活性。

[0293] 本文所述的检测分析法，诸如前述诊断检测分析法或以下检测分析法，可用于鉴定这样的受试者，其患有与PD-L3OR VISTA多肽活性或核酸表达误调节相关的疾病或存在发展所述疾病的风险，诸如自身免疫疾病、免疫缺乏症、免疫系统疾病诸如自身免疫、过敏或炎性疾病或癌症。因此，本发明提供鉴定与异常的或不需要的PD-L3ORVISTA表达或活性相关的疾病或失调的方法，其中从受试者获得试样，并检测PD-L3OR VISTA多肽或核酸(如mRNA或基因组DNA)，其中PD-L3OR VISTA多肽或核酸的存在对于受试者患有与异常的或不

需要的PD-L3OR VISTA表达或活性相关的疾病或失调或存在发展所述疾病或失调的风险具有诊断意义。如本文所用，“试样”是指从所关注的受试者获得的生物样品。例如，试样可以使生物流体(如，脑脊髓液或血清)、细胞样品或组织。

[0294] 此外，本文所述的预后检测分析法可用于确定是否可向受试者施用试剂(如，激动剂、拮抗剂、拟肽、多肽、肽、核酸、小分子或其他候选药物)以治疗与异常的或不需要的PD-L3OR VISTA表达或活性相关的疾病或失调。例如，此类方法可用于确定用试剂是否能有效治疗受试者的自身免疫疾病、免疫缺乏症、免疫系统癌症或过敏性或炎性疾病。因此，本发明提供确定用试剂是否能有效治疗受试者的与异常的或不需要的PD-L3OR VISTA表达或活性相关的疾病或失调的方法，其中获得试样，并检测PD-L3OR VISTA多肽或核酸表达或活性(例如，其中PD-L3OR VISTA多肽或核酸表达或活性的丰度对可向受试者施用试剂以治疗与异常的或不需要的PD-L3OR VISTA表达或活性相关的疾病具有诊断意义)。本发明的方法还可用于检测PD-L3OR VISTA基因中的遗传改变，从而确定具有改变的基因的受试者是否存在特征在于PD-L3OR VISTA多肽活性或核酸表达误调节的疾病的风险，诸如自身免疫疾病、免疫缺乏症、免疫系统癌症、过敏性疾病或炎性疾病。本文所述的方法可例如通过利用预先包装好的诊断试剂盒而进行，所述试剂盒包含本文所述的至少一种探针核酸或抗体试剂，其可例如在临床环境中便利地使用，以诊断表现出PD-L3OR VISTA基因相关疾病或病情的症状或家族史的患者。此外，其中表达PD-L3OR VISTA的任何细胞类型或组织均可用于本文所述的预后检测分析。

[0295] 3.监测效果在临床试验中，监测试剂(如药物)对PD-L3ORVISTA多肽表达或活性的影响(如，调节细胞增殖和/或迁移)不仅可适用于基本药物筛选，也适用于临床试验。例如，对于通过如本文所述的筛选检测分析法确定的试剂增强PD-L3OR VISTA基因表达、多肽水平或上调PD-L3OR VISTA活性的效果，可在表现出降低的PD-L3OR VISTA基因表达、多肽水平或下调的PD-L3OR VISTA活性的受试者的临床试验中进行监测。可选地，对于通过筛选检测分析法确定的试剂降低PD-L3OR VISTA基因表达、多肽水平或下调PD-L3ORVISTA活性的效果，可在表现出提高的PD-L3OR VISTA基因表达、多肽水平或PD-L3OR VISTA活性的受试者的临床试验中进行监测。如所述，PD-L3OR VISTA在许多造血细胞类型(包括APC(巨噬细胞和骨髓树突状细胞)以及CD4+T细胞)上表达，更具体地讲在$CD11c^{+}$DC、$CD4^{+}$T细胞(包括Foxp3效应T细胞以及$Foxp3^{+}$nTreg两者)、$CD8^{+}$T细胞和$Gr1^{+}$粒细胞上表达，以及在B细胞和NK细胞上低水平表达。在此类临床试验中，PD-L3OR VISTA基因，更优选地为在例如PD-L3OR VISTA相关疾病中牵涉的其他基因的表达或活性可用作特定细胞表型的“读出”(read out)或标志物。

[0296] 例如但非限制性地，可鉴定在细胞中通过用调节PD-L3ORVISTA活性(如，在本文所述的筛选检测分析中鉴定的)的试剂(如化合物、药物或小分子)治疗而调节的基因，包括PD-L3OR VISTA。因此，为了例如在临床试验中研究试剂对PD-L3OR VISTA相关疾病的作用，可分离细胞，制备RNA并分别分析PD-L3OR VISTA相关疾病中涉及的PD-L3OR VISTA以及其他基因的表达水平。基因表达水平(例如，基因表达模式)可通过如本文所述的Northern印迹分析或RT-PCR而定量，或者可选地，通过本文所述的方法之一测量所产生的多肽的量或通过测量PD-L3OR VISTA或其他基因的活性水平而定量。以此方式，基因表达模式可用作标志物，指示细胞对试剂的生理反应。因此，此反应状态可在用试剂治疗个体前以及在治疗中

的各个时间点进行确定。在一个优选的实施方案中，本发明提供监测用试剂(如，通过本文所述的筛选检测分析法鉴定的激动剂、拮抗剂、拟肽、多肽、肽、核酸、小分子或其他候选药物)治疗受试者的效果的方法，包括以下步骤：(i)在施用试剂前从受试者获得施用前样品；(ii)检测施用前样品中PD-L3OR VISTA多肽、mRNA或基因组DNA的表达水平；(iii)从受试者获得一个或多个施用后样品；(iv)检测施用后样品中PD-L3OR VISTA多肽、mRNA或基因组DNA的表达或活性水平；(v)将施用前样品中PD-L3OR VISTA多肽、mRNA或基因组DNA与施用后一个或多个样品中PD-L3OR VISTA多肽、mRNA或基因组DNA的表达或活性水平进行比较；以及(vi)相应地改变向受试者的试剂施用。例如，增加试剂施用可能是所需的，以将PD-L3OR VISTA的表达或活性提高到比所测水平更高的水平，即，增强试剂的效果。可选地，减少试剂施用可能是所需的，以将PD-L3ORVISTA的表达或活性降低到比所检测水平更低的水平，即减弱试剂的效果。根据这样的实施方案，PD-L3OR VISTA表达或活性可以用作试剂效果的指标，即使在不存在可观察的表型反应的情况下。

[0297] D.治疗方法

[0298] 本发明提供治疗下述受试者的预防性和诊断性方法，所述受试者存在(或疑似有)特征在于PD-L3OR VISTA蛋白的产生不足或过量或产生的PD-L3OR VISTA蛋白形式与PD-L3OR VISTA野生型相比具有降低或异常的活性的疾病的风险。此外，本发明的抗PD-L3ORVISTA抗体可用于检测和分离PD-L3OR VISTA蛋白，调节PD-L3OR VISTA蛋白的生物利用率以及调节PD-L3OR VISTA活性，例如通过调节PD-L3OR VISTA与其反受体之间的相互作用。

[0299] 1.预防方法

[0300] 在一个方面，本发明提供预防受试者与异常的或不需要的PD-L3OR VISTA表达或活性相关的疾病或病症的方法，方式是向受试者施用调节PD-L3OR VISTA表达或至少一种PD-L3OR VISTA活性的PD-L3OR VISTA多肽或试剂。存在由异常的或不需要的PD-L3ORVISTA表达或活性所致的或有助于所述表达或活性的疾病或病症风险的受试者可通过例如如本文所述的诊断或预后检测分析法的任何一种或组合而鉴定。施用预防剂可在PD-L3OR VISTA异常所特有的症状显现前进行，使得疾病或失调得到预防或可选地，延迟其进展。取决于PD-L3OR VISTA异常的类型，例如，PD-L3OR VISTA多肽、PD-L3OR VISTA激动剂或PD-L3OR VISTA拮抗剂(如抗PD-L3ORVISTA抗体)可用于治疗受试者。合适的试剂可基于本文所述的筛选检测分析法而确定。

[0301] 2.治疗方法

[0302] 本发明的一个重要方面涉及调节调节PD-L3OR VISTA表达或活性或与其天然结合伴侣的相互作用的方法。关于治疗，已证明PD-L3OR VISTA可抑制CD28协同刺激、抑制免疫细胞的TCR活化、抑制活化免疫细胞(CD4+和CD8+T细胞)的增殖、抑制T细胞产生细胞因子(IL-2，γ干扰素)以及向免疫细胞传递抑制信号。因此，可调节T细胞上PD-L3OR VISTA的活性和/或表达以及PD-L3OR VISTA与其天然结合伴侣之间的相互作用以调节免疫应答。由于PD-L3ORVISTA结合到抑制性受体(T细胞上)，因此上调PD-L3OR VISTA活性应导致免疫应答的下调，而下调PD-L3OR VISTA活性应导致免疫应答的上调。在一个优选的实施方案中，PD-L3OR VISTA结合到抑制性受体。如之前所述，申请人制备的在体外(在存在PD-L3ORVISTA-Ig的情况下)增强PD-L3OR VISTA-Ig融合蛋白抑制活性(即，这些抗体增强PD-L3OR VISTA

相关活性的抑制，诸如PD-L3ORVISTA对细胞因子产生、T细胞增殖、分化或活化以及之前所述的其他功能的影响)的PD-L3OR VISTA抗体与体内预计情况表现相反，即，已发现这些抗体在体内为免疫抑制性的。

[0303] 本发明的调节性方法涉及将细胞与PD-L3OR VISTA多肽或调节与细胞相关的PD-L3OR VISTA多肽活性中的一种或多种的试剂相接触，例如，调节PD-L3OR VISTA的表达或活性和/或调节PD-L3OR VISTA与其天然结合伴侣间的相互作用的试剂。调节PD-L3ORVISTA多肽活性的试剂可以是如本文所述的试剂，诸如核酸或多肽、PD-L3OR VISTA多肽的天然存在的结合伴侣、PD-L3OR VISTA抗体、PD-L3OR VISTA激动剂或拮抗剂、PD-L3OR VISTA激动剂或拮抗剂的拟肽、PD-L3OR VISTA拟肽、或其他小分子。PD-L3ORVISTA的可溶形式还可用于干扰PD-L3OR VISTA与其任何天然结合伴侣或配体任一者的结合。

[0304] 调节PD-L3OR VISTA表达的试剂为例如反义核酸分子、三链寡核苷酸、核酶或表达PD-L3OR VISTA多肽的重组载体。例如，可以合成与PD-L3OR VISTA多肽翻译起始位点周围的区域互补的寡核苷酸。可将一种或多种寡核苷酸加到细胞培养基中，通常为200μg/ml，或施用给受试者以防止PD-L3OR VISTA多肽的合成。反义寡核苷酸被细胞摄取并杂交到PD-L3OR VISTA mRNA以防止翻译。可选地，可以使用结合双链DNA以形成三链构建体从而防止DNA解旋和转录的寡核苷酸。作为任一种情况的结果，PD-L3OR VISTA多肽的合成均被阻断。当调节PD-L3OR VISTA表达时，优选地，这种调节通过敲除PD-L3OR VISTA基因之外的方法进行。

[0305] 基于控制细胞中PD-L3OR VISTA的量这一事实而调节表达的试剂也调节细胞中PD-L3OR VISTA活性的总量。在一个实施方案中，调节PD-L3OR VISTA的试剂刺激一种或多种PD-L3OR VISTA活性。此类刺激剂的实例包括活性PD-L3OR VISTA多肽以及已引入细胞中的编码PD-L3OR VISTA的核酸分子。在另一个实施方案中，该试剂抑制一种或多种PD-L3OR VISTA活性。此类抑制剂的实例包括反义PD-L3OR VISTA核酸分子、抗PD-L3OR VISTA抗体、PD-L3OR VISTA抑制剂以及在受试者筛选检测分析中鉴定的化合物。在一个进一步优选的实施方案中，抑制剂为抗PD-L3OR VISTA抗体以及抗PD-L1或抗PD-L2抗体的组合。这些调节性方法可在体外进行(例如，通过将细胞与试剂接触)，或者可选地，通过将试剂与细胞接触而在体内进行(例如，通过将试剂施用给受试者)。这样，本发明提供治疗将会受益于PD-L3OR VISTA多肽上调或下调的病症或疾病困扰的个体的方法，例如，特征在于不想要的、不足的或异常的PD-L3OR VISTA多肽或核酸分子表达或活性的疾病。在一个实施方案中，该方法涉及施用一种试剂(例如，通过本文所述的筛选检测分析鉴定的试剂)或调节(如，上调或下调)PD-L3OR VISTA表达或活性的试剂的组合。在另一个实施方案中，该方法涉及施用PD-L3OR VISTA多肽或核酸分子作为治疗方法以补偿降低的、异常的或不想要的PD-L3OR VISTA表达或活性。

[0306] 可用受试者PD-L3OR VISTA结合剂治疗的疾病在前文已有鉴定，并包括各种炎性、自身免疫、癌症、过敏性和感染性疾病。尤其优选的适应症为多发性硬化。

[0307] 刺激PD-L3OR VISTA活性在其中PD-L3OR VISTA异常下调和/或其中增强的PD-L3OR VISTA活性可能具有有益效果的情形中是所需的。类似地，抑制PD-L3OR VISTA活性在其中PD-L3OR VISTA异常上调和/或其中降低的PD-L3OR VISTA活性可能具有有益效果的情形中是所需的。用于下调PD-L3OR VISTA的示例性试剂(即，PD-L3OR VISTA拮抗剂)包括例

如反义核酸分子、识别和阻断PD-L3OR VISTA的抗体、识别和阻断PD-L3OR VISTA的抗体与识别和阻断PD-L3OR VISTA反受体的抗体的组合、以及阻断免疫细胞上PD-L3OR VISTA与其天然结合伴侣之间相互作用的化合物(如,可溶性、单价PD-L3OR VISTA分子;不结合抗原呈递细胞上Fc受体的可溶形式的PD-L3OR VISTA分子;可溶形式的PD-L3OR VISTA结合伴侣;以及受试者筛选检测分析中鉴定的化合物)。用于上调PD-L3OR VISTA的示例性试剂(即,PD-L3OR VISTA激动剂)包括例如编码PD-L3OR VISTA多肽的核酸分子、多价形式的PD-L3OR VISTA、增强PD-L3OR VISTA表达的化合物、增强PD-L3OR VISTA与其天然结合伴侣间的相互作用的化合物以及表达PD-L3OR VISTA的细胞。

[0308] 3.下调免疫应答

[0309] 本发明有多种实施方案上调PD-L3OR VISTA多肽的抑制性功能从而下调免疫应答。下调可以是抑制或阻断已在进行中的免疫应答的形式,或者可以涉及防止免疫应答的诱导。活化的免疫细胞的功能可通过下调免疫细胞应答或通过抑制免疫细胞中的特异性无能或这两者而抑制。例如,在其中PD-L3OR VISTA结合到抑制性受体的实施方案中,结合到抑制性受体的PD-L3OR VISTA形式,例如细胞表面上的多价PD-L3OR VISTA,可用于下调免疫应答。在本发明的一个实施方案中,用于刺激PD-L3OR VISTA活性的活化抗体为双特异性抗体。例如,这样的抗体可以包含PD-L3OR VISTA结合位点和靶向免疫细胞(如T细胞、B细胞或骨髓细胞)上的细胞表面受体的另一结合位点。在一个实施方案中,除了包含PD-L3OR VISTA结合位点外,这样的抗体可进一步包含结合到B细胞抗原受体、T细胞抗原受体或Fc受体的结合位点,以便将分子靶向特定的细胞群。选择双特异性抗体的该第二抗原可提供选择待靶向以进行抑制的细胞群的灵活性。促进PD-L3OR VISTA活性或增强PD-L3OR VISTA与其天然结合伴侣(如PD-L3OR VISTA活化抗体或PD-L3OR VISTA活化小分子)之间的相互作用的试剂可通过它们抑制免疫细胞增殖和/或效应子功能或加到体外检测分析中时诱导无能的能力而鉴定。例如,细胞可在刺激通过活化受体发生的信号转导的试剂存在下而培养。多种本领域公认的细胞活化“读出”可用于在活化剂存在下测量例如细胞增殖或效应子功能(例如,抗体产生、细胞因子产生、吞噬作用)。测试试剂阻断此活化的能力可容易地通过测量该试剂实现所测量的增殖或效应子功能降低的能力而测定。在一个实施方案中,在低抗原浓度下,PD-L3OR VISTA免疫细胞相互作用抑制强B7-CD28信号。在另一个实施方案中,在高抗原浓度下,PD-L3OR VISTA免疫细胞相互作用可减少细胞因子的产生但不抑制T细胞增殖。因此,测试化合物阻断活化的能力可通过在不同抗原浓度下测量细胞因子产生和/或增殖而测定。

[0310] 在本发明的一个实施方案中,通过与PD-L3OR VISTA激动剂共施用抗原而诱导对特异性抗原的耐受性。例如,可诱导对特异性多肽的耐受。在一个实施方案中,若对过敏原或外源性多肽的免疫应答是不可取的,则可抑制对该过敏原或外源性多肽的免疫应答。例如,接受Ⅷ因子的患者经常产生针对此凝血因子的抗体。与重组因子Ⅷ共施用刺激PD-L3OR VISTA活性或与其天然结合伴侣间的相互作用的试剂(或将PD-L3OR VISTA物理连接到Ⅷ因子,如通过交联)可导致免疫应答下调。

[0311] 在一个实施方案中,PD-L3OR VISTA激动剂和可阻断免疫细胞上协同刺激受体活性的另一种试剂可用于下调免疫应答。示例性分子包括:激动剂形式的其他PD配体、可溶形式的CTLA-4、抗B7-1抗体、抗B7-2抗体或它们的组合。可选地,两种单独的肽(例如,PD-L3OR

VISTA多肽与阻断形式的B7-2和/或B7-1多肽)或抗体的组合(例如,针对PD-L3OR VISTA多肽的活化抗体与阻断性抗B7-2和/或抗B7-1单克隆抗体)可联合用作单一组合物或单独施用(同时地或顺序地)以下调受试者中免疫细胞介导的免疫应答。此外,治疗有效量的具有PD-L3OR VISTA多肽活性的一种或多种肽与具有B7-1和/或B7-1活性的一种或多种多肽一起可联合其他下调试剂用于影响免疫应答。其他免疫调节试剂的实例包括阻断协同刺激信号(如,针对CD28或ICOS)的抗体、通过CTLA4活化抑制性信号的抗体和/或针对其他免疫细胞标志物(如,针对CD40、CD40配体或细胞因子)的抗体、融合蛋白(如CTLA4-Fc或PD-1-Fc)以及免疫抑制药物(如雷帕霉素、环孢霉素A或FK506)。PD-L3OR VISTA多肽也可用于构造通过破坏细胞而阻断免疫细胞功能的治疗剂。例如,PD-L3OR VISTA多肽的一些部分可连接到毒素,以制备能够触发其结合的细胞发生破坏的细胞毒性剂。

[0312] 对于制备细胞毒性剂,本发明的多肽可使用本领域已知的技术连接到或有效连接到毒素。可偶联到本发明多肽或抗体的多种毒素是已知的。实例包括:多种有用的植物、真菌或甚至细菌源毒素,其以举例的方式包括:各种A链毒素,尤其是蓖麻A链;核糖体失活蛋白,诸如肥皂草素或多花白树毒蛋白;α帚曲毒蛋白;曲霉素;局限曲菌素;以及核糖核酸酶诸如胎盘核糖核酸酶、血管形成、白喉毒素或假单胞菌外毒素。与本发明结合使用的优选毒素部分为已经过处理以修饰或移除碳水化合物残基的毒素A链,即去糖基化A链(美国专利No.5,776,427)。

[0313] 此类细胞毒素剂(例如,PD-L3OR VISTA蓖麻毒素(单独地或与PD-L1蓖麻毒素相结合))之一或组合融合进患者可导致免疫细胞死亡,尤其是鉴于表达较高PD-L3OR VISTA结合伴侣量的活化免疫细胞这一事实。例如,由于PD-1在活化的淋巴细胞表面上诱导,因此PD-L3OR VISTA多肽可用于通过Fc-R依赖性机制或通过将细胞毒性药物(如蓖麻毒素、肥皂草素或卡奇霉素)偶联到PD-L3OR VISTA多肽的消融(ablation)而靶向这些特定细胞的去除。在另一个实施方案中,可将毒素偶联到抗PD-L3OR VISTA抗体以便靶向表达PD-L3OR VISTA的抗原呈递细胞死亡。在又一个实施方案中,PD-L3ORVISTA抗体-毒素可以是双特异性抗体。此类双特异性抗体可用于靶向特定细胞群,例如,使用只存在于某些类型细胞上的标志物,例如B淋巴细胞、单核细胞、树突状细胞或朗格汉斯细胞。通过活化PD-L3OR VISTA活性或PD-L3OR VISTA与免疫细胞的相互作用(并因而刺激PD-L3OR VISTA的负信号传导功能)来下调免疫应答可用于下调例如组织、皮肤和器官移植情形中、移植物抗宿主病(GVHD)或过敏症中或诸如系统性红斑狼疮和多发性硬化的自身免疫疾病中的免疫应答。例如,阻断免疫细胞功能导致组织移植中减少的组织破坏。通常,在组织移植物中,移植物的排斥通过免疫细胞将其识别为外源物而引发,然后发生破坏移植物的免疫反应。在移植前或移植时单独地或结合另一种下调剂而施用促进免疫细胞上的PD-L3OR VISTA活性或者PD-L3OR VISTA与其天然结合伴侣间的相互作用的分子(诸如,可溶性、多聚物形式的PD-L3OR VISTA多肽)可抑制协同刺激信号的产生。此外,促进PD-L3OR VISTA活性还可足以使免疫细胞无能,从而诱导受试者中的耐受性。

[0314] 为了在受试者中实现足够的免疫抑制或耐受性,还可能所需的是阻断其他分子的协同刺激功能。例如,可能所需的是阻断B7-1和B7-2的功能,方式是在移植前或移植时施用可溶形式的具有这些抗原每一者的活性的肽的组合或针对这些抗原的阻断性抗体(单独地或合在单一组合物中)。可选地,可能所需的是促进PD-L3OR VISTA的抑制活性并抑制B7-1

和/或B7-2的协同刺激活性。可结合本发明的下调方法使用的其他下调剂包括例如:通过CTLA4传递抑制信号的试剂、可溶形式的CTLA4、通过CTLA4活化抑制信号的抗体、针对其他免疫细胞标志物的阻断性抗体、或可溶形式的其他受体配体对(例如,破坏CD40与CD40配体之间相互作用的试剂(例如,抗CD40配体抗体))、针对细胞因子的抗体或免疫抑制药物。例如,活化PD-L3ORVISTA活性或者PD-L3OR VISTA与其天然结合伴侣间的相互作用可用于治疗自身免疫疾病。许多自身免疫疾病是不当的免疫细胞活化的结果,这些免疫细胞对自体组织具有反应性,并促进疾病病理学中涉及到的细胞因子和自身抗体的产生。防止自体反应性免疫细胞的活化可减轻或消除疾病症状。施用促进PD-L3OR VISTA的活性或PD-L3ORVISTA与其天然结合伴侣间的相互作用的试剂可诱导能导致疾病长期缓解的自体反应性免疫细胞的抗原特异性耐受性。另外,共施用通过破坏B7分子与协同刺激受体的受体-配体相互作用而阻断免疫细胞协同刺激的试剂可用于抑制免疫细胞活化,从而防止疾病过程中可能涉及到的自身抗体或细胞因子的产生。试剂在预防或缓解自身免疫疾病方面的疗效可使用人自身免疫疾病的多种研究透彻的动物模型来测定。实例包括鼠实验性自身免疫性脑炎、MRL/lpr/lpr小鼠或NZB杂交小鼠中的系统性红斑狼疮、鼠自身免疫胶原性关节炎、NOD小鼠和BB大鼠中的糖尿病以及鼠实验性重症肌无力(参见Paul编著,Fundamental Immunology,Raven Press,New York,1989,第840-856页)。

[0315] 抑制免疫细胞活化可用于在治疗学上治疗过敏症和过敏反应,例如通过抑制IgE的产生。促进PD-L3OR VISTA活性或者PD-L3ORVISTA与其天然结合伴侣间的相互作用的试剂可施用给过敏受试者,以抑制受试者中免疫细胞介导的过敏反应。刺激PD-L3OR VISTA活性或与其天然结合伴侣间的相互作用可伴随暴露于联合合适的MHC分子的过敏原。过敏反应在本质上可以是全身性的或局部的,具体取决于过敏原的进入途径以及IgE在肥大细胞或嗜碱性粒细胞上的沉积模式。因此,免疫细胞介导的过敏反应可通过施用促进PD-L3ORVISTA活性或者PD-L3OR VISTA与免疫细胞相互作用的试剂而局部地或全身性地抑制。

[0316] 通过刺激PD-L3OR VISTA活性或者PD-L3OR VISTA与其天然结合伴侣间的相互作用而抑制免疫细胞活化在免疫细胞的病原性感染(如,通过病毒或细菌)中也可具有重要的治疗学意义。例如,在获得性免疫缺陷综合征(AIDS)中,病毒复制由免疫细胞活化刺激。刺激PD-L3OR VISTA活性可导致病毒复制受到抑制并因而延缓AIDS病程。

[0317] 通过刺激PD-L3OR VISTA活性或者PD-L3OR VISTA与其天然结合伴侣间的相互作用来下调免疫应答还可用于治疗对自体组织的自身免疫攻击。因此,因自身免疫攻击而导致的或加重的病症(例如,心脏病、心肌梗塞或动脉粥样硬化)可通过增强PD-L3OR VISTA活性或者PD-L3OR VISTA与其天然结合伴侣的结合而缓解或改善。因此,通过刺激PD-L3OR VISTA活性或者PD-L3OR VISTA与其反受体间的相互作用而调节自身免疫攻击所加重的病症,诸如自身免疫疾病(以及诸如心脏病、心肌梗塞和动脉粥样硬化的病症),也在本发明的范围内。

[0318] 4.上调免疫应答

[0319] 抑制PD-L3OR VISTA活性或者PD-L3OR VISTA与其天然结合伴侣间的相互作用作为上调免疫应答的手段也可用于治疗。上调免疫应答可以是增强现有免疫应答或引发初始免疫应答的形式。例如,通过抑制PD-L3OR VISTA活性而增强免疫应答可用于微生物(如,细菌、病毒或寄生虫)感染的情况或用于免疫抑制的情况。例如,在一个实施方案中,抑制PD-

L3OR VISTA活性的试剂，例如针对PD-L3OR VISTA的非活化抗体(即，阻断性抗体)或可溶形式的PD-L3ORVISTA，可在治疗学上用于其中下调抗体和细胞介导的应答(从而导致更快的或彻底的病毒、细菌或寄生虫清除)将是有益的情形。这些病症包括病毒性皮肤疾病，诸如疱疹或带状疱疹，在这种情况下，这样的试剂可在皮肤上外用。此外，全身性病毒疾病，诸如流感、感冒和脑炎可通过全身性施用此类试剂而得到缓解。在某些情况下，可能所需的是进一步使用上调免疫应答的其他试剂，例如通过协同刺激受体转导信号的B7家族成员的形式，以便进一步增强免疫应答。

[0320] 可选地，可在受感染的患者中通过以下方式增强免疫应答：从患者体内取出免疫细胞，将免疫细胞在体外与抑制PD-L3OR VISTA活性或者PD-L3OR VISTA与其天然结合伴侣间的相互作用的试剂接触，以及将体外刺激的免疫细胞重新引入患者体内。在另一个实施方案中，增强免疫应答的方法涉及：从患者体内分离受感染的细胞(例如病毒感染的细胞)，将它们用编码无法结合其天然结合伴侣的PD-L3OR VISTA形式的核酸分子转染使得细胞在其表面表达PD-L3OR VISTA分子的全部或一部分，以及将转染后的细胞重新引入患者体内。转染的细胞可能在体内能防止向免疫细胞传递抑制信号，从而活化免疫细胞。

[0321] 抑制PD-L3OR VISTA活性或者PD-L3OR VISTA与其天然结合伴侣间的相互作用的试剂可在预防学上用于针对各种多肽(例如，衍生自病原体的多肽)的疫苗。针对病原体(例如病毒)的免疫力可通过用合适佐剂中的病毒多肽连同抑制PD-L3OR VISTA活性的试剂进行疫苗接种而诱导。可选地，包含下述基因的载体可用于疫苗接种，所述基因编码病原性抗原以及阻断PD-L3OR VISTA与免疫细胞间相互作用的PD-L3OR VISTA形式这两者。核酸疫苗可通过多种方式施用，例如通过注射(如肌内注射、皮内注射，或通过使用粒子加速器或压缩气体将粒子注入皮肤的基因枪将DNA包被的金微粒生物弹射(biolistic)进表皮(Haynes等(1996)J.Biotechnol.44:37))。可选地，核酸疫苗可通过非侵入性方式施用。例如，可将纯的或脂质配制的DNA递送到呼吸系统或靶向别的地方，例如，经口递送DNA到派伊尔结(Schubbert(1997)Proc Natl.Acad.Sci.USA 94:961)。减毒微生物可用于递送到粘膜表面(Sizemore等(1995)Science 270:29)。

[0322] 在另一个实施方案中，疫苗中的抗原为自体抗原。这样的疫苗可用于调节生物体中的耐受性。用自体抗原和阻断PD-L3OR VISTA活性或者PD-L3OR VISTA与其天然结合伴侣间的相互作用的试剂进行免疫会破坏耐受性(即，干扰自体抗原的耐受性)。这样的疫苗还可以包含佐剂，诸如明矾或细胞因子(如GM-CSF、IL-12、B7-1或B7-2)。在一个实施方案中，抑制PD-L3OR VISTA活性或者PD-L3ORVISTA与其天然结合伴侣间的相互作用的试剂可与I类MHC多肽一起施用，例如通过经转染以共表达PD-L3OR VISTA多肽或阻断性抗体的细胞以及MHC I类α链多肽和β2微球蛋白，从而导致T细胞活化并提供对感染的免疫。例如，疫苗可用的病毒性病原体包括：乙肝、丙肝、EB病毒、巨细胞病毒、HIV-1、HIV-2、结核、疟疾和血吸虫病。

[0323] 在另一种应用中，抑制PD-L3OR VISTA活性或者PD-L3ORVISTA与其结合伴侣间的相互作用可用于治疗肿瘤免疫。肿瘤细胞(如肉瘤、黑素瘤、淋巴瘤、白血病、成神经细胞瘤或淋巴瘤)可用抑制PD-L3OR VISTA活性的核酸分子转染。这些分子可以为例如PD-L3OR VISTA的反义核酸分子或可编码非活化抗PD-L3ORVISTA抗体。这些分子还可以为抗PD-L3OR VISTA抗体的可变区。如果需要，肿瘤细胞也可用活化协同刺激的其他多肽(如B7-1或B7-2)

转染。将转化的肿瘤细胞返回患者，其导致PD-L3OR VISTA活性受到抑制(例如，局部抑制)。可选地，基因治疗技术可用于靶向用于体内转染的肿瘤细胞。

[0324] 刺激对肿瘤细胞的免疫应答还可通过以下方式实现：通过用抑制PD-L3OR VISTA活性或者PD-L3OR VISTA与其天然结合伴侣间的相互作用的试剂治疗受试者，从而抑制PD-L3OR VISTA活性或者PD-L3OR VISTA与其天然结合伴侣间的相互作用。此类试剂的优选实例包括例如反义核酸分子、识别并阻断PD-L3OR VISTA的抗体、以及阻断免疫细胞上PD-L3OR VISTA与其天然存在的结合伴侣间的相互作用的化合物(例如，可溶性、单价PD-L3OR VISTA分子；不结合到抗原呈递细胞上Fc受体的可溶形式的PD-L3OR VISTA分子；可溶形式的PD-L3OR VISTA结合伴侣；以及受试者筛选检测分析中鉴定的化合物)。此外，不含MHC Ⅰ类或MHC Ⅱ类分子的或不能表达足量MHC Ⅰ类或MHC Ⅱ类分子的肿瘤细胞可用编码MHCⅠ类α链多肽和β2微球蛋白多肽或MHC Ⅱ类α链多肽和MHC Ⅱ类β链多肽的全部或一部分(例如，胞质结构域截短部分)的核酸转染，从而在细胞表面上表达MHC Ⅰ类或MHC Ⅱ类多肽。结合PD-L3OR VISTA抑制性多肽或反义核酸而表达合适的Ⅰ类或Ⅱ类MHC可诱导针对转染肿瘤细胞的T细胞介导的免疫应答。任选地，编码阻断MHC Ⅱ类相关多肽(诸如恒定链)表达的反义构建体的基因，也可用编码PD-L3OR VISTA抑制性多肽或反义核酸的DNA共转染，以促进肿瘤相关抗原呈递并诱导肿瘤特异性免疫。已表明，通过B7阴性鼠肿瘤细胞表达B7-1可诱导T细胞介导的特异性免疫，其伴随肿瘤排斥以及对小鼠肿瘤挑战的延长保护(Chen,L.等(1992)Cell71:1093-1102;Townsend,S.E.和Allison,J.P.(1993)Science259:368-370;Baskar,S.等(1993)Proc Natl.Acad.Sci.90:5687-5690)。因此，诱导人体受试者中免疫细胞介导的免疫应答可足以克服受试者中的肿瘤特异性耐受性。在另一个实施方案中，免疫应答可通过抑制PD-L3OR VISTA活性或者PD-L3OR VISTA与其天然结合伴侣间的相互作用而刺激，使得克服预先存在的耐受性。例如，针对受试者无法对其发生显著免疫应答的抗原(例如，肿瘤特异性抗原)的免疫应答可通过以下方式诱导：施用抑制PD-L3OR VISTA的活性或者PD-L3OR VISTA结合到其天然结合伴侣的能力的试剂，可用作佐剂以在主动免疫过程中提升对外源性抗原的应答。

[0325] 在一个实施方案中，从受试者获取免疫细胞，并在存在抑制PD-L3OR VISTA活性或者PD-L3OR VISTA与其天然结合伴侣间的相互作用的试剂下进行体外培养，以扩大免疫细胞群。在一个进一步的实施方案中，然后将免疫细胞施用给受试者。可通过例如为免疫细胞提供初级活化信号和协同刺激信号而刺激免疫细胞体外增殖，如本领域所已知。各种形式的抑制PD-L3OR VISTA活性的PD-L3ORVISTA多肽或试剂均可用于协同刺激免疫细胞增殖。在一个实施方案中，将免疫细胞根据PCT申请No.WO 94/29436中所述的方法体外培养。协同刺激分子可以为可溶性的，连接到细胞膜或连接到固体表面，诸如微珠。

[0326] 在一个另外的实施方案中，在执行本文所述的任何方法时，通过施用一种或多种另外的试剂而上调免疫应答也在本发明的范围内。例如，使用已知可刺激免疫应答的其他试剂，诸如细胞因子、佐剂或刺激性形式的协同刺激分子或其配体可联合抑制PD-L3OR VISTA活性或者PD-L3OR VISTA与其天然结合伴侣间的相互作用的试剂使用。

[0327] E.因T细胞上PD-L3ORVISTA活性或者PD-L3OR VISTA与其反受体间相互作用的调节而受到调节的细胞因子的鉴定

[0328] 本文所述的PD-L3OR VISTA分子可用于鉴定下述细胞因子，其通过免疫细胞产生

或其产生情况在免疫细胞响应PD-L3OR VISTA活性或者PD-L3OR VISTA与其天然结合伴侣间的相互作用的调节中得到增强或受到抑制。免疫细胞可在体外通过初级活化信号非最优地刺激，例如，T细胞可通过佛波酯、抗CD3抗体或优选地抗原与MHCⅡ类分子联合进行刺激，以及给予协同刺激信号，例如通过刺激形式的B7家族抗原，例如通过用编码B7多肽的核酸分子转染并在其表面上表达肽的细胞，或通过可溶性、刺激形式的肽。然后，可将细胞与表达PD-L3OR VISTA的细胞接触(如，针对PD-L3ORVISTA的抗体)。已知的释放进培养基的细胞因子可通过ELISA或通过阻断细胞因子而抑制免疫细胞增殖或抑制细胞因子诱导的其他细胞类型增殖的抗体的能力而鉴定。例如，IL-4ELISA试剂盒可作为IL-7阻断性抗体得自Genzyme(Cambridge,Mass.)。针对IL-9和IL-12的阻断性抗体可得自Genetics Institute(Cambridge,Mass.)然后可确定刺激或阻断PD-L3OR VISTA活性或者PD-L3OR VISTA与其结合伴侣间的相互作用对细胞因子谱的作用。如上文所述并如实施例中所示，PD-L3OR VISTA明显抑制免疫细胞的IL-2和γ干扰素表达。

[0329] 如上所述的体外免疫细胞协同刺激检测分析法还可用在鉴定新型细胞因子的方法中，所述新型细胞因子可通过调节PD-L3ORVISTA活性而受到调节。例如，其中CD28/CTLA4途径的刺激似乎增强IL-2分泌，ICOS途径的刺激似乎增强IL-10分泌(Hutloff等(1999)Nature 397:263)。如果在协同刺激时诱导的特定活性(例如，免疫细胞增殖)无法通过添加已知细胞因子的阻断性抗体而得到抑制，则活性可能由未知细胞因子的作用而产生。在协同刺激后，此细胞因子可通过常规方法从培养基中纯化，以及其活性可通过其诱导免疫细胞增殖的能力而测量。

[0330] 要鉴定可能在耐受性的诱导中发挥作用的细胞因子，可使用如上所述的体外T细胞协同刺激检测分析。在此情况下，将向T细胞给予初级活化信号，并将其与所选的细胞因子接触，但不给予协同刺激信号。在洗涤并静息免疫细胞后，将细胞用初级活化信号和协同刺激信号这两者进行再次挑战。如果免疫细胞不响应(例如，增殖或产生细胞因子)，则它们已变得耐受，细胞因子未阻止耐受性的诱导。然而，如果免疫细胞作出响应，则细胞因子阻止了耐受性的诱导。可使那些能够阻止耐受性诱导的细胞因子在体内联合阻断B淋巴细胞抗原的试剂而靶向阻断，以之作为更有效的手段诱导移植受体或自身免疫疾病受试者中的耐受性。例如，可以与促进PD-L3OR VISTA活性或者PD-L3OR VISTA与其结合伴侣间的相互作用的试剂一起向受试者施用细胞因子阻断性抗体。

[0331] 因此，总而言之，现在已鉴定了通过Treg细胞表达的程序性死亡配体(PDL)家族的新成员。此新型蛋白已被命名为PD-L3ORVISTA。此PD-1家族的受体为包含单个IgV结构域的I型跨膜蛋白，而配体为表达IgV和IgC胞外域两者的I型跨膜蛋白。像其他PDL家族成员一样，PD-L3OR VISTA也在体外协同刺激T细胞的αCD3增殖。此外，PD-L3OR VISTA的表达在αCD3活化的Treg中升高，在存在αGITR的情况下降低。

[0332] 也已鉴定了在αCD3/αGITR刺激时发生上调的第二种TNF样蛋白。此蛋白已被命名为Treg-sTNF。这些蛋白可能牵涉在免疫的接触依赖性和旁分泌抑制中，因而可用于调节(例如，抑制或刺激)免疫应答以及治疗涉及Treg信号传导的疾病和病症。例如，PD-L3OR VISTA蛋白可用作协同刺激信号以刺激或增强免疫细胞活化。PD-L3ORVISTA蛋白和PD-L3OR VISTA结合剂和PD-L3OR VISTA激动剂及拮抗剂特别可用于治疗免疫病症，其中T细胞免疫的调节是所需的，例如，调节T细胞活化、分化和增殖，尤其是调节CD4+和CD8+T细胞增殖、细

胞因子产生以及在T细胞与骨髓源性APC之间的同种相互作用期间的T细胞应答。

[0333] 本发明进一步用以下实施例进行说明，这些实施例不应理解为是对本发明的限制。本申请中引用的所有参考文献、专利和公布的专利申请的内容以及附图和序列表均以引用方式并入本文。

[0334] 实施例

[0335] 以下材料和方法用在下面的实施例中。材料和方法

[0336] 表达谱分析

[0337] 为了方便与既定的Treg细胞表达谱进行比较，采用了标准生长和活化条件(McHugh,等(2002)同上)。简而言之，将新分离的Treg细胞(～96%阳性)以106个/mL接种到24孔板中补充了10%胎牛血清和100单位IL-2的完整RPMI培养基中，所述平板用含或不含抗GITR(DTA-1)的抗CD3预包被(Shimizu,等(2002)同上)。将细胞在37℃培养0和12小时，纯化RNA，随后使用Affymetrix®小鼠基因组A430寡核苷酸芯片进行了分析。

[0338] 通过比较得自静息或活化CD4+CD25+T细胞组的数据，发现基因表达模式与本领域中既定的那些相似(Gavin,等(2002)同上;McHugh,等(2002)同上)。为了鉴定通过GIRT信号传导调节的基因，在具有或不具有抗GITR处理的不同细胞群之间行了比较。编辑了已知以及未知基因的列表，包括以前未表征的PD-L3OR VISTA和Treg-sTNF。

[0339] 小鼠

[0340] C57BL/6小鼠和OTⅡ CD4转基因小鼠购自Jackson Laboratory。FoxP3-GFP报告小鼠如之前所述(Fontenot,J.D.,Rasmussen,J.P.,Williams,L.M.,Dooley,J.L.,Farr,A.G.,和Rudensky,A.Y.(2005).Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcriptionfactor foxp3.Immunity 22,329-341)，并由Alexander Rudensky(University of Washington School of Medicine,Seattle,WA)慷慨提供。PD-1敲除小鼠由Tasuku Honjo博士(Kyoto University,Japan)慷慨提供(Nishimura,H.,Nose,M.,Hiai,H.,Minato,N.,和Honjo,T.(1999).Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of thePD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunorecepto r.Immunity11,141-151;Nishimura,H.,Okazaki,T.,Tanaka,Y.,Nakatani,K.,Hara,M.,Matsumori,A.,Sasayama,S.,Mizoguchi,A.,Hiai,H.,Minato,N.,和Honjo,T.(2001).Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice.Science 291,319-322)。所有动物都养在DartmouthMedical School无病原体的笼舍中。

[0341] Abs、细胞系和试剂：

[0342] 抗体αCD3(2C11)、αCD28(PV-1)、αCD4(GK1.5)、αCD8(53-6.7)、αCD11b(M1/70)、αF4/80(BM8)、αCD11c(N418)、αNK1.1(PK136)、αGr1(RB6-8C5)、αPD-L 1(MIN5)、αPD-L2(TY25)、αB7-H3(M3.2D7)、αB7-H4(188)购自Ebioscience。LPS(Sigma)、重组鼠IFN□(Peprotech)、人IL-2(Peprotech)、可溶性PD-L1-Ig融合蛋白(R&D systems)以指定的浓度使用。完全弗氏佐剂(CFA)和鸡卵清蛋白(OVA)购自Sigma。表达MHCⅡ分子I-Ad和协同刺激分子B7-2的CHO细胞系由ArleneSharpe博士(Harvard Medical School)友情提供。

[0343] PD-L3OR VISTA的分子克隆、逆转录病毒的产生以及细胞的逆转录病毒转导

[0344] 从纯化的鼠CD4+T细胞克隆全长PD-L3OR VISTA。使用Qiagen微量RNA提取试剂盒

从CD4+T细胞中分离总RNA。使用Bio-RadiScriptTM cDNA合成试剂盒生成cDNA。扩增全长PD-L3OR VISTA并克隆进逆转录病毒载体pMSCV-IRES-GFP的ECorl-Xhol位点(Zhang,X.,和Ren,R.(1998).Bcr-Abl efficiently induces amyeloproliferative disease and production of excess interleukin-3andgranulocyte-macrophage colony-stimulating factor in mice:a novelmodel for chronic myelogenous leukemia.Blood 92,3829-3840),其中将IRES-GFP片段用RFP替换,从而产生融合到RFP的N端的PD-L3ORVISTA的融合蛋白。在HEK293T细胞中通过PD-L3OR VISTA-RFP逆转录病毒载体与亲嗜性包装载体pCL-Eco(IMGENEX corp.)一起的瞬时转染生成无辅助因子的逆转录病毒。通过在8μg/ml的凝聚胺(Sigma)存在下在室温以2000rpm离心感染(spin infection)45分钟,而进行鼠T细胞系EL4细胞或骨髓原性DC的逆转录病毒转导。

[0345] PD-L3OR VISTA-Ig融合蛋白的产生

[0346] 扩增PD-L3OR VISTA的胞外域(第32-190位氨基酸)并克隆进亲本载体CDM7B的Spel-BamHI位点(Hollenbaugh,D.,Douthwright,J.,McDonald,V.,和Aruffo,A.(1995).J Immunol Methods 188,1-7)。此载体包含人IgG1的恒定区和铰链区的突变形式,其与Fc受体的结合大大降低。将所得的载体CDM7B-PD-L3OR VISTA用DHFR表达载体pSV-dhfr(Mclvor,R.S.,和Simonsen,C.C.(1990).Nucleic AcidsRes 18,7025-7032)共转染进CHO(dhfr-)细胞系(ATCC#CRL-9096)。在无核苷酸的MEM-α培养基(Invitrogen)中选择稳定的表达PD-L3OR VISTA-Ig的CHO细胞克隆。用0.5-1μM甲氨蝶呤(Sigma M9929)进一步扩增产生了表达高水平的可溶性PD-L3OR VISTA-Ig融合蛋白的克隆。将融合蛋白从培养物上清液中用标准蛋白G柱亲和层析进一步纯化。

[0347] PD-L3OR VISTA单克隆抗体的产生

[0348] 将亚美尼亚仓鼠用过表达PD-L3OR VISTA-RFP的EL4细胞每周免疫4次,然后用在CFA中乳化的PD-L3OR VISTA-Ig融合蛋白加强。加强后四周,将仓鼠再次用可溶性PD-L3OR VISTA-Ig融合蛋白加强。最后一次加强后四天,收获仓鼠脾细胞,并使用标准杂交瘤融合技术融合到骨髓瘤细胞系SP2/0-Ag14(ATCC#CRL-1581)(Shulman,M.,Wilde,C.D.,和Kohler,G.(1978).A better cell line formaking hybridomas secreting specific antibodies.Nature 276,269-270)。在有限稀释后选择分泌PD-L3OR VISTA特异性抗体的杂交瘤克隆,并通过ELISA和流式细胞术两种方法进行筛选。

[0349] RNA和RT-PCR

[0350] 通过使用TrizolTM(Invitrogen)方法根据厂商说明采集各种小鼠组织样品或纯化的造血细胞类型中的总RNA。cDNA通过使用iScriptTM cDNA合成试剂盒(Bio-Rad)而制备。使用等量的组织cDNA(10ng)进行RT-PCR反应以扩增全长PD-L3OR VISTA。跑1%琼脂糖凝胶后观察PCR产物。

[0351] 流式细胞术

[0352] 在使用CellQuest软件的FACSCAN(BD Bioscience)上进行了流式细胞分析。使用FlowJo软件(Treestar)分析了数据。

[0353] 细胞制备

[0354] 使用总CD4+T细胞分离试剂盒(Miltenyi)从首次接触试验的小鼠中分离了总CD4+T细胞。当指定时,将富集的CD4+T细胞流式分选成首次接触试验的(CD44low CD25-

CD62Lhi)和记忆(CD44hiCD25-CD62Llow)细胞群。对于体外增殖检测分析,将CD4+T细胞用5μM CFSE(Molecular Probes)在37℃标记10分钟,在刺激前洗涤两次。

[0355] 体外结合平板的T细胞活化检测分析

[0356] 在指定的浓度比率下,在存在抗CD3(克隆2C11)以及PD-L3ORVISTA-Ig或者对照Ig时将纯化的CD4+T细胞(100,000个细胞/孔)在平底96孔板中培养。例如,对于全程滴定,将96孔板用在PBS中与1.25μg/ml(比率2:1)、2.5μg/ml(比率1:1)、5μg/ml(比率1:2)或10μg/ml(比率1:4)PD-L3OR VISTA-Ig或者对照Ig蛋白一起混合的2.5μg/ml的αCD3在4℃过夜包被。将孔用PBS洗涤3次,再添加CD4+T细胞。在补充了10%FBS、10mM HEPES、50μM β-ME、青霉素/链霉素/L-谷氨酰胺的完全RPMI 1640培养基中平行培养。当指定时,将100U/ml的人IL-2(PeproTech)或滴定量的□CD28(克隆PV-1,Bio X细胞)与□CD3一起包被,以补救PD-L3OR VISTA-Ig的抑制性作用。在第3天时分析培养物的CFSE谱,或根据指定的时间过程进行。

[0357] 骨髓源性DC的培养、逆转录病毒转导以及转基因CD4+T细胞的刺激

[0358] 如所述生成了骨髓源性DC(Lutz,M.B.,Kukutsch,N.,Ogilvie,A.L.,Rossner,S.,Koch,F.,Romani,N.,和Schuler,G.(1999).An advancedculture method for generating large quantities of highly pure dendriticcells from mouse bone marrow.J Immunol Methods 223,77-92;Son,Y.I.,Egawa,S.,Tatsumi,T.,Redlinger,R.E.,Jr.,Kalinski,P.,和Kanto,T.(2002).A novel bulk-culture method for generating mature dendriticcells from mouse bone marrow cells J Immunol Methods 262,145-157),但作了一些改进。简而言之,在第0天,通过用27号针头冲洗从胫骨和股骨分离了骨髓细胞。红细胞裂解后,在6孔细胞培养板(Nunc,Inc.)中将1-2x 106个骨髓细胞重悬在1ml含20ng/ml GM-CSF(Peprotech Inc)的完全RPMI 1640培养基中。将含有RFP或者PD-L3OR VISTA-RFP逆转录病毒的2ml上清液加到骨髓细胞中。还以8μg/ml的最终浓度加入了凝聚胺(Sigma)。通过在室温下将平板以2000rpm离心45分钟进行感染。然后,将细胞再培养2小时,之后加入新鲜培养基。在第+1天、第+3天、第+5天以及第+7天重复类似的感染操作。在第+10天收集松散贴壁细胞(90%为CD11c+),分选CD11c+RFP+双阳性细胞并用于刺激转基因OT-Ⅱ CD4+T细胞。对于OT-Ⅱ T细胞增殖检测分析,在存在滴定量的合成OVA323-339肽(Anaspec)的情况下,将100,000个CFSE标记的OT-Ⅱ CD4+T细胞在具有30,000个分选的RFP+或者PD-L3OR VISTA-RFP+BMDC的96孔圆底板中培养。通过检查CFSE谱在72小时时分析了OT-Ⅱ T细胞的增殖。

[0359] PD-L3OR VISTA响应免疫的表达研究

[0360] 为了免疫转基因小鼠DO11.10,将300μg OVA(Sigma)在CFA(200μl)中乳化,皮下注射进小鼠侧腹。在指定的时间点收获引流区和非引流区腹股沟淋巴结。制备单细胞悬液,并通过流式细胞术分析了PD-L3OR VISTA以及其他表面标志物的表达。

[0361] PD-L3OR VISTA的抑制性活性。

[0362] 通过使用体外过表达PD-L1的抗原呈递细胞与CD4+和CD8+T细胞抗原受体转基因T细胞和抗原刺激揭露了PD-L1的抑制活性(Carter,等(2002)Eur.J.Immunol.32:634-43)。相似地,将本文公开的表达全长PD-L3OR VISTA的慢病毒载体转导进表达Ⅱ类主要组织相容性复合体(MHC)和I类MHC的细胞系。根据既定的方法测定TEaTg或2C转基因T细胞对空白载体转导的或PD-L3OR VISTA转导的抗原呈递细胞所呈递的抗原的应答。

[0363] 蛋白表达。淋巴细胞、单核细胞和树突状细胞亚群以及非造血组织中的表达模式通过RT-PCR和western印迹分析使用标准方案结合本文所公开的αPD-L3OR VISTA抗体进行测定。

[0364] 单克隆抗体的产生。PD-L3OR VISTA在鼠B细胞系A20中过表达，并将重组细胞系用于免疫亚美尼亚仓鼠。在5次细胞免疫后，用在CFA中乳化的纯化PD-L3OR VISTA-Ig融合蛋白对仓鼠进行加强。四周后，用可溶性PD-L3OR VISTA-Ig提供最终加强。之后，在第4天，进行仓鼠脾细胞与SP2/0细胞的融合。通过ELISA鉴定了识别PD-L3OR VISTA-Ig融合蛋白的十六个不同的克隆，以及染色在鼠T细胞系EL4上过表达的PD-L3OR VISTA但非PD-L1。其中十一个克隆被成功亚克隆和制备，用于评价它们染色细胞和组织上内源性PD-L3OR VISTA以及阻断PD-L3OR VISTA功能的能力。

[0365] 增殖检测分析：

[0366] 设计了体外CD4T细胞增殖检测分析法以筛选PD-L3OR VISTAmAb活性。在此检测分析中，通过微板孔中的固定化抗CD3(其与T细胞受体交联)刺激T细胞。使用PD-L3OR VISTA-Ig融合蛋白(由融合到人IgG的Fc部分的PD-L3OR VISTA胞外域构成)，以两种不同的配置检测了PD-L3OR VISTA mAb的活性。首先，当将mAb与αCD3共固定时，只在添加的可溶性PD-L3OR VISTA-Ig融合蛋白的存在下，其才强效抑制了T细胞增殖。此活性取决于PD-L3ORVISTA-Ig结合到孔中的固定化mAb的能力。使用这种形式的检测分析法，鉴定了具有高、中或低抑制活性的克隆。第二，当将mAb作为可溶性试剂加到检测分析中时，其通过固定的PD-L3OR VISTA-Ig融合蛋白的协同增效对T细胞增殖产生了强效的抑制活性。在这种形式的检测分析法中，鉴定了具有各种抑制活性的克隆。

[0367] 实施例1:PD-L3OR VISTA的克隆和序列分析。

[0368] 通过静息Treg、αCD3活化的Treg以及αCD3/αGITR活化的Treg的整体转录谱分析鉴定了PD-L3OR VISTA和Treg-sTNF。选择了αGITR用于此分析，因为Treg上GITR的触发已表明可压制它们的接触依赖性抑制活性(Shimizu,等(2002)同上)。在AFFIMETRIX®DNA阵列上基于PD-L3OR VISTA和Treg-sTNF的独特表达模式对它们进行了鉴定(表1)。PD-L3OR VISTA在αCD3活化的Treg中表现出表达增强，在存在αGITR时表达降低;以及Treg-sTNF表现出表达的αCD3/αGITR依赖性增强。

[0369] 通过无、αCD3或αCD3/αGITR在过夜培养中刺激了纯化的CD4+CD25+T细胞，并分离了RNA用于实时PCR分析。列出的表达以肌动蛋白为比较。

[0370] 表1

[0371]

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

[0372] 活化的与静息的CD25+CD4+nTreg的Affymetrix分析表明，基因产物(RIKEN cDNA 4632428N05或4632428N05Rik)的表达具有未知的功能，但与Ig超家族具有序列同源性。

[0373] 更具体地讲，从CD4+T细胞cDNA文库克隆了930bp基因产物，其与预测的大小和序列相符。电子延伸序列和结构分析预测成熟时309个氨基酸的跨膜蛋白，其具有159个氨基酸的胞外域、22个氨基酸的跨膜域以及95个氨基酸的胞质域(图1A)。氨基酸序列比对揭露了与B7家族配体诸如PD-L1、PD-L2、B7-H3和B7-H4以及B7家族受体(即，PD-1、CTLA-4、CD28、BTLA、ICOS)同源的胞外免疫球蛋白(Ig)-V样结构域(图1B-C)。虽然B7家族配体与受体之间Ig-V结构域的序列同一性通常不是非常高(<40%)，但是4632428N05Rik的Ig-V结构域具有与B7家族配体PD-L1和PD-L2的最高同源性。序列比对还揭露出若干高度保守的半胱氨酸(图1B)，它们对于链内二硫键的形成具有重要意义，而链内二硫键形成为B7家族配体所特有(Sica等，(2003).Immunity 18,849-861)。

[0374] 4632428N05Rik的胞外域只含Ig-V结构域而无Ig-C结构域(图1B-C)。此独特特征为B7家族受体所特有，并将4632428N05Rik与所有其他B7家族配体区分开来，后者既包含Ig-V也包含Ig-C结构域(Freeman,G.J.(2008).Proc Natl Acad Sci USA 105,10275-10276;Lazar-Molnar等，(2008).Proc Natl Acad Sci USA 105,10483-10488;Lin等，(2008),Proc Natl Acad Sci USA 105,3011-3016;Schwartz等，(2001),Nature 410,604-608;Stamper等，(2001),Nature 410,608-61)。一致地，使用PhyML算法(系统发育最大可能性)的系统发生分析将4632428N05Rik放在了与B7家族受体、尤其是与PD-1比与B7家族配体更近的进化距离(图2)(Guindon,S.,和Gascuel,O.(2003).A simple,fast,and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximumlikelihood.Syst Biol 52,696-704)。然而，PD-L3OR VISTA的胞质尾部不含任何信号传导结构域(如ITIM、ITAM或ITSM)，其为B7家族受体的身份结构域(signature domain)(Sharpe,A.H.,和Freeman,G.J.(2002).The B7-CD28superfamily.Nat Rev Immunol 2,116-126)。因此假设不管其与抑制性受体PD-1的亲密进化关系，4632428N05Rik代表了B7配体家族的新成员。基于这些结构及系统发生特性，将此分子命名为PD-1-eXpressed as Ligand(PD-L3OR VISTA)。PD-L3ORVISTA在小鼠与人直系同源体之间也高度保守，共有77%的序列同一性(图1D)。

[0375] 编码小鼠PD-L3OR VISTA的核酸序列在本文如SEQ ID NO:1所示，小鼠PD-L3OR VISTA蛋白序列如SEQ ID NO:2所示。

[0376] PD-L3OR VISTA的人同源物位于10号染色体上(72.9Mb)，并由6个外显子构成，从而产生编码311个残基蛋白的长度为4689个碱基的转录物。人同源物mRNA编码序列以GENBANK登录号NM 022153提供，蛋白序列作为NP 071436给出。编码人PD-L3ORVISTA的核酸序列在本文如SEQ ID NO:3所示，人PD-L3OR VISTA蛋白序列如SEQ ID NO:4所示。小鼠和人基因共有74%的同源性并且在蛋白水平上68%相同。还在褐家鼠第20号染色体(27.7Mb;GENBANK登录号BC098723)以及红鳍东方豚和斑马鱼中鉴定了同源物。在特定的实施方案中，本发明的PD-L3OR VISTA蛋白共有如SEQ ID NO:5所示的共同氨基酸序列。

[0377] 实施例2:通过RT-PCR分析和流式细胞术进行的PD-L3ORVISTA表达研究

[0378] 如图3中的实验所示，RT-PCR分析用于确定小鼠组织中PD-L3OR VISTA的mRNA表达模式(图3A)。PD-L3OR VISTA主要在造血组织(脾脏、胸腺、骨髓)或具有丰富淋巴细胞浸润的组织(即，肺)上表达。在非造血组织(即，心脏、肾脏、脑和卵巢)中也检测到了弱表达。若干造血细胞类型的分析揭露了PD-L3OR VISTA在腹腔巨噬细胞、脾CD11b+单核细胞、CD11c+DC、CD4+T细胞和CD8+T细胞上表达，但在B细胞上表达水平较低(图3B)。此表达模式还与GNF

(Genomics Institute of Novartis Research Foundation)基因阵列数据库(Su等,(2002),Proc Natl Acad Sci USA 99,4465-4470)以及NCBIGEO(gene expression omnibus)数据库高度一致(图4A-D)。

[0379] 为了研究蛋白表达,产生了PD-L3OR VISTA特异性仓鼠8D8和6E7单克隆抗体。通过过表达的PD-L3OR VISTA的鼠EL4T细胞上的阳性染色但在PD-L1过表达EL4的细胞上的负性染色证实了特异性(图5)。

[0380] 针对PD-L3OR VISTA的多克隆和单克隆抗体均得到提高。使用兔抗PD-L3OR VISTA抗体,PD-L3OR VISTA蛋白定位到淋巴器官并显著存在于脑组织中。在这些鉴定的单克隆抗体中,进一步评价了αPD-L3OR VISTA克隆8D8的特异性。在此分析中,测试了克隆8D8针对一组PD-L样Ig融合蛋白分子(包括CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、B7-1、B7-2、PD-L3OR VISTA和hlg)的结合。此分析的结果表明,8D8αPDL-3对PD-L3OR VISTA具有高度特异性。

[0381] 具体地讲,使用抗PD-L3OR VISTA mAb克隆8D8,通过流式细胞术分析了造血细胞上的PD-L3OR VISTA表达。Foxp3GFP敲入报告小鼠用于区分CD4+nTreg(34)。在外周淋巴器官(脾脏和淋巴结)中,在所有CD4+T细胞亚群中均观察到了显著的表达(参见总CD4+T细胞、或Foxp3首次接触试验的T细胞和Foxp3+nTreg细胞,以及记忆CD4+T细胞),而CD8+T细胞表达明显低的表面PD-L3ORVISTA量(图3C)。在胸腺中,PD-L3OR VISTA表达在CD4+CD8+双阳性胸腺细胞上为阴性,在CD4单阳性细胞上较低,在CD8单阳性细胞上可检测。接下来,对于脾和腹膜细胞(包括F4/80巨噬细胞和骨髓CD11c+DC两者)均可观察到高PD-L3OR VISTA表达与CD11b标志物的强关联(图3D-E)。在另一方面,B细胞和NK细胞对PD-L3OR VISTA表达主要为阴性。小百分比的Gr-1+粒细胞也表达PD-L3OR VISTA(图3F)。

[0382] 在来自不同淋巴器官的相同细胞谱系上显示出差异表达模式(图3G)。对于CD4+T细胞和CD11b中间单核细胞,表达水平遵循肠系膜淋巴结>外周淋巴结和脾脏>腹腔和血液的模式。此模式对于CD11bhi细胞不太明显。该数据表明,某些细胞上PD-L3OR VISTA表达可能受细胞成熟度和/或组织微环境的调节。

[0383] 除了新分离的细胞外,还在进行活化以及无活化的体外培养后分析了脾CD4+T细胞、CD11bhi单核细胞和CD11c+DC细胞上的PD-L3OR VISTA表达(图6)。将脾细胞用培养基或用抗CD3(用于活化T细胞)或用IFN□和LPS(用于活化单核细胞和DC)培养24小时后,分析PD-L3OR VISTA以及其他B7家族配体(如PD-L1、PD-L2、B7-H3和B7-H4)的表达。此比较揭露了这些分子之间差别性的表达模式。PD-L3OR VISTA表达在体外培养时在所有细胞上均迅速丧失,而无论活化状态如何。相比之下,PD-L1表达在刺激时在CD4+T细胞上、在仅培养基中培养时在CD11bhi单核细胞和CD11c+DC上上调,并在面对刺激时进一步增强。PD-L2、B7-H3和B7-H4的表达在所用培养条件下不突出。PD-L3OR VISTA表达在体外的丧失与其他B7家族配体相比是独有的,但可能反映了未能模拟组织微环境的非最佳培养条件。

[0384] 为了弄清可如何在体内调节PD-L3OR VISTA表达,将CD4TCR转基因小鼠DO11.10用在完全弗氏佐剂(CFA)中乳化的同种抗原鸡卵清蛋白(OVA)免疫。免疫后24小时时,分析引流淋巴结中的细胞的PD-L3OR VISTA表达(图7A)。仅用抗原(CFA/OVA)而无佐剂免疫显著增加了CD11b+PD-L3OR VISTA+骨髓细胞群,其包含F4/80+巨噬细胞与CD11c+DC的混合细胞群。与PD-L1和PD-L2的进一步比较揭露出,虽然PD-L1具有最高的组成型表达水平,但PD-L3OR VISTA在这样的炎症免疫应答期间受到了最高的上调(图7B)。总而言之,这些数据强

烈表明，骨髓APC上PD-L3OR VISTA的表达由免疫系统严格调节，其可能有助于在控制免疫应答和调节T细胞免疫中的作用。

[0385] 与其在APC升高的表达相比，PD-L3OR VISTA表达在活化的DO11.10CD4+T细胞上在免疫后较晚的时间点降低(即，在48小时而非24小时时)(图8)。此结果表明，体内CD4T细胞上的PD-L3ORVISTA表达可由其活化状态以及活性免疫应答期间的细胞因子微环境而调节。

[0386] 实施例3:PD-L3OR VISTA信号传导对CD4+和CD8+T细胞应答的功能性影响

[0387] 产生了PD-L3OR VISTA-Ig融合蛋白以研究PD-L3OR VISTA对CD4+T细胞应答的调节作用。PD-L3OR VISTA-Ig融合蛋白包含融合到人IgG1Fc区的PD-L3OR VISTA的胞外域。当固定在微板上时，PD-L3OR VISTA-Ig而非对照Ig抑制了粗纯化CD4+和CD8+T细胞响应结合平板的抗CD3刺激而发生的增殖，如通过受抑制的细胞分裂而确定(图9A-B)。PD-L3OR VISTA Ig融合蛋白不影响抗CD3抗体吸收到塑料孔，如通过ELISA确定(未显示数据)，从而排除了非特异性抑制作用的可能性。PD-1KO CD4+T细胞也受到抑制(图9C)，从而表明PD-1不是PD-L3OR VISTA的受体。还直接比较了PD-L1-Ig和PD-L3OR VISTA-Ig的抑制作用(图10)。当使滴定量的Ig融合蛋白与□CD3一起吸收到微板以刺激CD4+T细胞时，PD-L3ORVISTA-Ig表现出与PD-L1-Ig融合蛋白相似的抑制效果。

[0388] 由于粗纯化的CD4+T细胞包含各种亚群，因此评价了PD-L3ORVISTA-Ig对分选的首次接触试验的(CD25-CD44lowCD62Lhi)以及记忆(CD25-CD44hiCD62Llow)CD4+T细胞亚群的影响(图11)。据显示，PD-L3OR VISTA可抑制两种亚群的增殖，虽然对记忆细胞的效果要弱得多。

[0389] 为了进一步理解PD-L3OR VISTA介导的抑制的机制，在存在或不存在PD-L3OR VISTA-Ig的情况下在T细胞活化后测量了早期TCR活化标志物的表达以及细胞凋亡。与对细胞增殖的负影响一致，存在对早期活化标志物CD69、CD44和CD62L表达的全局性抑制(补充图12A)。在另一方面，PD-L3OR VISTA-Ig融合蛋白未诱导细胞凋亡。相反，在存在PD-L3OR VISTA或者VISTA-Ig的情况下，在TCR活化的早期(24小时)和晚期(48小时)均观察到了比对照Ig低的细胞凋亡(通过膜联蛋白V+7AAD-细胞的百分比确定)(图12B)。例如，在24小时时间点，在总“非分类”细胞群中，约27%的细胞在存在PD-L3OR VISTA或者VISTA-Ig下凋亡，而对照细胞则有约39%的凋亡。当在活细胞R1分类中研究细胞时，明显的是，PD-L3ORVISTA或者VISTA-Ig强烈抑制了活化诱导的细胞死亡(ACID)，因为当用PD-L3OR VISTA或者VISTA-Ig处理时约72.6%的对照细胞变为凋亡，而试验细胞只有43.5%凋亡。对于48小时时间点也观察到了相似的结果。因此，看来PD-L3OR VISTA或者VISTA通过抑制早期TCR活化以及抑制细胞分裂而负调节CD4+T细胞应答，但对细胞凋亡的直接影响极低。此抑制机制与B7-H4的类似(Sica,G.L.,Choi,I.H.,Zhu,G.,Tamada,K.,Wang,S.D.,Tamura,H.,Chapoval,A.I.,Flies,D.B.,Bajorath,J.,和Chen,L.(2003).B7-H4,a molecule of theB7 family,negatively regulates T cell immunity.Immunity 18,849-861)。

[0390] 开发了两步检测分析法，以确定PD-L3OR VISTA或者VISTA-Ig能否抑制预活化的CD4T细胞以及其抑制作用的持久性如何。据显示，PD-L3OR VISTA或者VISTA-Ig融合蛋白的抑制作用持续到其撤去后24小时后活化(图9D)。此外，首次接触试验的和预活化CD4+T细胞均能被PD-L3OR VISTA或者VISTA-Ig抑制(图9Di、9Diii和9Div)。

[0391] 接下来，分析了PD-L3OR VISTA或者VISTA-Ig对CD4+T细胞细胞因子产生情况的影

响。PD-L3OR VISTA或者VISTA-Ig抑制了从粗纯化的CD4+T细胞培养物产生Th1细胞因子IL-2以及IFNα(图13A-B)。PD-L3OR VISTA或者VISTA的影响在单独的首次接触试验的(CD25-CD44lowCD62Lhi)和记忆(CD25-CD44hiCD62Llow)CD4+T细胞群中进行了进一步测试。据显示,记忆CD4+T细胞是CD4+T细胞小室内细胞因子产生的主要来源,而PD-L3OR VISTA或者VISTA可抑制这种产生(图13C-D)。还显示了PD-L3OR VISTA或者VISTA对CD8+T细胞中IFNα产生情况具有类似的抑制作用(图13E)。PD-L3OR VISTA或者VISTA对CD4+和CD8+T细胞产生细胞因子的这种抑制作用与PD-L3ORVISTA或者VISTA是下调免疫应答的抑制性配体的假设抑制。

[0392] 接下来,设计了多项研究以确定能够克服PD-L3OR VISTA或者VISTA的抑制作用的因子。鉴于PD-L3OR VISTA或者VISTA抑制了IL-2产生,并且IL-2对T细胞存活和增殖至关重要,我们假设IL-2可能避开PD-L3OR VISTA或者VISTA的抑制活性。如在图14A中所示,外源性IL-2但非IL-15、IL-7或IL-23部分逆转了PD-L3ORVISTA或者VISTA-Ig对细胞增殖的抑制作用。通过高水平IL-2的不完全补救表明,PD-L3OR VISTA或者VISTA信号传导比单纯的IL-2产生靶向了更宽的T细胞活化途径。在另一方面,通过抗CD28激动性抗体提供的强效协同刺激完全逆转了PD-L3OR VISTA或者VISTA-Ig介导的抑制(图14B),而中等水平的协同刺激仍受到PD-L3OR VISTA或者VISTA信号传导的抑制(图14C)。此结果表明,PD-L3OR VISTA或者VISTA介导的免疫抑制将在较弱的炎症条件下更有效,但必然会被强烈的正协同刺激信号推翻。就这一点而言,PD-L3OR VISTA或者VISTA与其他抑制性B7家族配体诸如PD-L1和B7-H4都具有这一特征(Sica等,(2003),Immunity 18,849-861;Carter等,(2002),Eur J Immunol 32,634-643)。

[0393] 除了PD-L3OR VISTA或者VISTA-Ig融合蛋白外,还有必要确认在APC上表达的PD-L3OR VISTA或者VISTA能否抑制APC与T细胞同种相互作用期间的抗原特异性T细胞活化。为此,通过在稳定表达MHC Ⅱ和B7-2分子的人工抗原呈递细胞系(CHO-APC)中的逆转录病毒转导过表达了PD-L3OR VISTA或者VISTA-RFP或RFP对照蛋白(Latchman等,(2001),Nat Immunol 2,261-268)。在CHO中表达PD-L3OR VISTA或VISTA的一个问题在于,大部分PD-L3ORVISTA或VISTA未能定位到细胞表面,这可能是由于对PD-L3ORVISTA或VISTA表面定位缺乏支持的陌生环境所致(未显示数据)。虽然在PD-L3OR VISTA或VISTA的胞质尾部上不存在表明调节模式的明确基序,但我们推测该尾部可能在其细胞内定位中发挥作用。因此,设计了无尾的PD-L3OR VISTA或VISTA突变体,并发现其成功定位到CHO细胞表面(未显示数据)。

[0394] 为了刺激T细胞应答,将CHO-PD-L3OR VISTA或者VISTA或CHO-RFP细胞与DO11.10CD4+T细胞在存在抗原性OVA肽的情况下一起温育。如图15A-C所示,CHO-PD-L3OR VISTA或者VISTA比CHO-RFP细胞诱导了较少的DO11.10细胞增殖。此抑制作用在较低的肽浓度下更加显著,与较强的刺激信号将会克服PD-L3ORVISTA或VISTA的抑制影响的想法一致。

[0395] 此外,确认了全长PD-L3ORVISTA或VISTA对天然APC的抑制作用。体外培养的骨髓源性树突状细胞(BMDC)不表达高水平的PD-L3OR VISTA或VISTA(图16)。通过在10天培养期中的逆转录病毒转导在BMDC中表达了PD-L3OR VISTA或者VISTA-RFP或RFP。将转导的细胞基于RFP表达分选均匀。PD-L3OR VISTA或VISTA在转导DC上的表达水平通过用抗PD-L3OR VISTA或者VISTA mab染色而进行了估计,并发现与新分离的腹腔巨噬细胞上的水平相似,

因此在生理表达范围内(图16)。然后将分选的BMDC在存在OVA肽的情况下用于刺激OVA特异性转基因CD4+T细胞(OTⅡ)(图15D)。其中显示,PD-L3OR VISTA或VISTA对BMDC的表达抑制了同种CD4+T细胞增殖应答。此结果与之前使用PD-L3ORVISTA或者VISTA-Ig融合蛋白以及CHO-APC细胞的结果一致,从而表明PD-L3OR VISTA或VISTA可抑制T细胞介导的免疫应答。

[0396] 实施例4:在多发性硬化动物模型(EAE)中评价抗PD-L3ORVISTA或VISTA抗体

[0397] 由于□PD-L3OR VISTA或者VISTA mAb在体内似乎会抑制T细胞应答,因此测试了□PD-L3OR VISTA或VISTA以评价其是否能抑制T细胞介导的自身免疫疾病。使用实验性过敏性脑脊髓炎(EAE)模型,确定了□PDL-L3mAb对炎性疾病的功能影响。EAE是广泛使用的人自身免疫疾病多发性硬化的鼠模型。EAE可通过佐剂中的髓鞘抗原免疫或通过髓鞘特异性T细胞过继转移而诱导,其导致各种效应T细胞和B细胞以及巨噬细胞的炎性浸润以及中枢神经系统的髓鞘脱失。

[0398] αPDL-L3mAb在被动EAE模型中进行了测试以避免诱导因注射大量作为外源抗原的mAb的过敏反应。在此过继转移EAE模型中,将供体SJL小鼠用CFA和PLP肽免疫。在第10天,分离了引流淋巴结中的总淋巴细胞,并用PLP肽、IL-23(20ng/ml)和抗IFNg(10ng/ml)体外培养4天。然后纯化扩增后的CD4T细胞,过继转移至首次接触试验的受体小鼠。此分析表明,αPDL-L3mAb延迟了疾病发作,以及减轻了疾病严重性,从而大大偏移了疾病进展曲线(图17)。此外,其在大百分比的小鼠中降低了严重性,并大大提高了存活率,从约22%至超过75%。这证实了αPDL-L3mAb在EAE中的活性与体外数据一致,并证实了使用此试剂作为各种炎症疾病中的新型免疫调节试剂。

[0399] 实施例5:VISTA在CNS中的表达

[0400] 还实现了VISTA在CNS中的表达。这些检测分析揭露了,在患病小鼠中,VISTA表达在CD11b+细胞(图23)上显著降低(从76%至33%),与VISTA丧失可能会增强炎症的假设一致。当我们将本文中的炎症骨髓细胞与表达极高水平VISTA的肿瘤中的MDSC进行对比时,这一现象引人关注并可能在功能上具有重要意义。据报道,EAE小鼠在脾脏中具有提高数量的髓源性抑制细胞(CD11b+Ly-6ChighMDSC),其对T细胞活化具有强抑制性并可缓和疾病32。我们的数据强烈支持VISTA可在EAE的骨髓介导的抑制中发挥作用。

[0401] 实施例6:VISTA在EAE中对T细胞命运和功能的影响。

[0402] 我们还进行了实验,分析VISTA在EAE中对T细胞命运和功能的作用。我们想评价VISTA是否会改变病原性致脑炎T细胞的发育、克隆性T细胞扩增、T细胞极性、寿命以及Teff向Treg的转化。我们研究了VISTA阻断在EAE中对T细胞命运的影响。与较高的疾病评分一致,在病程结束时对CNS的分析确认了在13F3(□VISTA)处理组中明显更多的产IL17A的CD4+T细胞浸润(从0.66%至11%)(图24)。

[0403] 实施例7:PD-L3OR VISTA或VISTA转基因和敲除小鼠

[0404] 使用胚胎的慢病毒感染,产生了四只泛表达PD-L3OR VISTA或VISTA的转基因小鼠。这些小鼠在人延伸因子1启动子的控制下表达全长PD-L3OR VISTA或VISTA。这些小鼠使用慢病毒载体pWPT而产生。与其他PD-L1家族成员相似(Appay,等(2002)J.Immunol.168:5954-8),预期PD-L3OR VISTA或VISTA在体内将作为负调控因子发挥作用而在体外则起到协同刺激αCD3T细胞增殖的功能。在这一方面,预计这些小鼠会自然发生自身免疫,并评价了在PD-L3ORVISTA或VISTA转基因小鼠中的体内免疫应答(即,体液免疫应答、T细胞启动

等)以评估系统性自身免疫疾病发展。

[0405] 对于敲除小鼠,将PD-L3OR VISTA或VISTA通过同源重组而灭活。含全长PD-L3OR VISTA或VISTA序列的BAC克隆购自INVITROGEN™(Carlsbad,CA)。PD-L3OR VISTA或VISTA靶向载体通过将位于PD-L3OR VISTA或VISTA基因的第二外显子5'侧的1.6kb片段插入新霉素基因上游,以及将位于PD-L3OR VISTA或VISTA基因的第三外显子3'侧的5kb片段插入新霉素基因下游而生成。将B6源性胚胎干(ES)细胞用PD-L3OR VISTA或VISTA靶向载体进行电穿孔,并选择重组克隆。然后将所选的克隆注射进C57BL/6胚泡,将所得的嵌合雄性子代与FLP剔除小鼠交配以移除新霉素盒。通过基因组DNA的PCR确定靶向的等位基因在子代中的传递。第二和第三外显子包含PD-L3OR VISTA或VISTA结构域,因此,所得的小鼠只具有灭活形式的PD-L3OR VISTA或VISTA分子。

[0406] PD-L3OR VISTA或VISTA缺陷小鼠的总体免疫能力像其他PD-L-/-小鼠一样进行确定,包括评价T细胞对抗原的应答、体液免疫原应答、明显的自身免疫(如系统性红斑狼疮、炎性肠病)以及对诱导的自身免疫疾病(实验性自身免疫性脑脊髓炎)增加的易感性(Chen(2004)同上)。

[0407] 实施例8:PD-L3OR VISTA或VISTA特异性抗体在胶原诱导型关节炎动物模型中测试

[0408] 如图18中的实验所示,将雄性DBA/1J小鼠用100μl在CFA中含100μg鸡Ⅱ型胶原(CⅡ)的乳液(结核分枝杆菌3.5mg/ml)在尾根部进行免疫,并在免疫后21天用100μg水性C-Ⅱ经腹腔注射进行加强。各治疗组的小鼠(n=6)如所示分别为未处理(NT-黑色圆形)、注射300μg仓鼠IgG(Ham Ig-黑色方形)或注射300μg单克隆抗体"7c9"(红色三角形)或"13F3"(绿色三角形)注射。每2天进行一次注射。在指定的天数以0-4的量表对每只小鼠各爪子的关节肿胀情况进行评分。所示的关节评分为各处理组中小鼠所有爪子的总分除以该组中的小鼠只数。

[0409] 实施例9:特异性VISTA单克隆抗体阻断VISTA在体外增强T细胞应答。

[0410] 鉴定了中和VISTA介导的抑制的VISTA特异性mab(13F3)(图19)。从首次接触试验的小鼠中纯化了$CD11b^{hi}$骨髓APC以在存在或不存在13F3的情况下刺激OT-Ⅱ转基因$CD4^{+}$T细胞。与其中和作用一致,13F3增强了$CD11b^{hi}$骨髓细胞刺激的T细胞增殖,所述骨髓细胞显示出表达高水平的VISTA。

[0411] 实施例10:抗VISTA增强抗肿瘤免疫。

[0412] 由于抗VIST增强T细胞活化的能力,我们评估了抗VISTA是否会增强对免疫原性肿瘤的保护性免疫应答。我们具有丰富经验的模型为膀胱肿瘤MB49。MB49表达雄性抗原,因此其在雌性小鼠中的免疫原性温和,然而,如果无免疫干预其将生长并杀死雌性小鼠。为了测试□VISTA治疗的疗效,向雌性小鼠皮下施用MB49肿瘤细胞并用□VISTA处理。在之后的数天内,测量肿瘤大小直到必须对小鼠实施安乐死。在图20中可以容易地观察到,抗VISTA治疗大大减慢了肿瘤生长。我们相信,这是由于抗VISTA增强细胞介导的免疫(CMI)应答的能力所致。

[0413] 实施例11:在4个小鼠肿瘤模型中□VISTA对肿瘤退缩的影响。

[0414] 在免疫原性膀胱癌MB49中的实验已表明使用mab 13F3中和VISTA可避免宿主的肿瘤生长。数据表明,VISTA在肿瘤微环境中具有相当强的负免疫调节作用,因为其极高的

MDSC表达。调查抗小鼠VISTA对免疫原性(MB49)以及高非免疫原性(B16)肿瘤模型生长的影响的研究将进一步确认αVISTA治疗的疗效、阐明作用机制以及提供选择最佳剂量和时间的基础。每个肿瘤模型的基本原理在下面详述。

[0415] 雌性小鼠中的MB49:我们已经在该鼠模型中展示了功效。此模型中的MDSC还表达提高水平的VISTA(未示出)。在此模型中,由于存在H-Y抗原,MB49肿瘤的免疫原性温和。由于我们知道抗VISTA治疗是有效的,因此我们将使用此模型作为"阳性"对照以确定抗VISTA治疗的治疗性干预的剂量(1-100μg/小鼠)和时间(肿瘤接种的天数,或肿瘤后4、7、10天)。

[0416]

肿瘤名称	肿瘤类型	宿主	试验组	检测分析
MB49	膀胱癌	B6雌性	□VISTA 对照Ig	肿瘤生长 存活率 免疫/自身免疫检测分析
MB49	膀胱癌	B6雄性		
B16.F10	黑素瘤	B6雄性或雌性		
ID8	卵巢癌	B6雌性		

[0417] 雄性小鼠中的MB49:使用在雌性小鼠中有效的剂量和时间,确定雄性小鼠(其中肿瘤的免疫原性较弱)中抗VISTA治疗的疗效。

[0418] B16黑素瘤:抗CTLA-4mab在此模型中显示出高度有效,并代表非免疫原性肿瘤,其中小鼠模型可用于预测在人体中的成功。剂量方案和时间将类似于在MB49模型中表现得有效的那些。

[0419] ID8卵巢癌:在此模型中,已表明VISTA表达在MDSC上极高。将具有ID8肿瘤的小鼠用αVISTA在肿瘤接种开始时或在接种后第5、15、25天时进行处理。

[0420] 方法。将B6WT小鼠用于确定抗VISTA治疗以缓解所述的所有鼠肿瘤模型的最佳剂量和时间。将使用的模型列在上表中。

[0421] 此剂量和时间检测分析的读出为肿瘤生长动力学。对于MB49和B16研究,通过皮内接种完成了所有肿瘤研究,并因此可容易地测量肿瘤大小。使用游标卡尺每2-3天获取肿瘤测量值。在这些模型的每一个中,将测试抗VISTA或对照抗体对其减缓肿瘤生长或利于肿瘤退缩的能力的影响。使用荧光素酶转导的ID8以及采用IVIS工作站的全身成像监测了ID8的生长。此外,还将确定宿主存活。

[0422] 将关于肿瘤生长的数据表示为平均肿瘤体积±SEM,将通过双尾ANOVA分析组间差异。低于0.05的概率(p)值被视为具有统计意义上的显著性。使用Kaplan-Meier方法分析存活数据,并将Wilcoxon秩检验和对数秩检验用于确认组间存活差异的显著性。在B16模型中,确定发展白癜风的小鼠的频率。

[0423] 使用这些方法,在多个非免疫原性肿瘤模型中,与用对照ab处理的小鼠相比,在用抗VISTA mAb处理的小鼠中获得了减缓的肿瘤生长和/或肿瘤退缩。已表明,抗VISTA治疗在免疫原性肿瘤模型中延迟了肿瘤生长。由于这些肿瘤模型的每一个都具有其自身特定的生长动力学,以及在使肿瘤生长及抑制免疫方面对VISTA的预期依赖性,将在肿瘤接种开始时或之后的多个时间向小鼠施用mab。另外,测试至少3种不同浓度的um VISTA mab以确定对

治疗有益的最佳剂量。

[0424] 如图21A-E中所述，VISTA mab治疗在所有这4种肿瘤模型中都减缓了肿瘤生长，其中将小鼠用A.MB49、B.MCA 105或C.EG7肿瘤细胞皮下接种或D.用ID8荧光素酶肿瘤细胞经腹腔接种，并从第+1天开始每隔一天用VISTA mab 13F3治疗(300μg)。监测了皮下肿瘤生长。对于ID8荧光素酶肿瘤，在第30天用Xenogen IVIS对小鼠成像。E.还测定了具有肿瘤的小鼠中骨髓白细胞上的VISTA表达。分析了引流淋巴结和肿瘤组织(腹水)的VISTA表达。这些发现表明在MDSC上的表达是干扰保护性抗肿瘤免疫发展的主要抑制分子，并且□VISTA可减弱此抑制活性，从而允许免疫干预以及减缓肿瘤生长。这些发现还支持自身免疫疾病中骨髓细胞上的VISTA在调节炎症程度方面发挥着关键功能的结论。

[0425] 实施例12:可用于治疗自身免疫的寡聚VISTA和VISTA融合蛋白的合成。

[0426] 可溶性VISTA-Ig在体外不具抑制性，其与细胞的结合也不能容易地检测。相比之下，结合到塑料的该分子具有强抑制性。此外，使用VISTA-Ig的体内研究未表现出明显的活性(未显示数据)。对于这些研究，创建的VISTA-Ig在CH2-CH3结构域具有突变从而阻止FcR结合，并因此在体内不嗜细胞。最近的研究已表明，四聚PD-L1的结合力是单体D-L126至PD-1的100倍(Kd 6x10-8M)，以及表明可容易地检测与细胞的结合。未对四聚PD-L1进行体内测试，但体外测试表明其通过天然PD-L1阻断功能性抑制。使用相似的方法，制备了将靶向VISTA途径并在体外和体内引起强效免疫抑制活性的寡聚物。

[0427] 使用VISTA的单体胞外域或其片段(例如，长度为至少50、75、100、125、150、175或200个氨基酸)构建了此类寡聚物，将其胞外域或片段用作寡聚物的基本成分。在这些方法中，发明人利用研究成熟的MHC四聚体技术。在这些方法中，将VISTA胞外域构建体或片段连接到多种寡聚结构域(上文所鉴定)的N端，以便生成一系列价态从二价到七价的VISTA复合物。

[0428] 因此，基于指导二聚、三聚、四聚、五聚和七聚组装分子的稳定形成的高亲和力卷曲螺旋结构域，创建了一系列非共价的寡聚物。这些寡聚物构建体在宿主细胞如大肠杆菌中表达。当在大肠杆菌中实现表达时，然后使用标准实验室方案将表达的寡聚物再折叠以及从包涵体中纯化。此方法已常规地产生了用于生物学和结构分析的高质量材料，包括MHC肽复合物以及三聚GITRL66。分离的寡聚蛋白然后通过SDS-PAGE、分析型凝胶过滤、分析型超速离心以及质谱技术进行评价。这些质量控制措施确保获得均匀的研究透测的材料，以用于体外和体内研究。这些构建体的平行组织产生价态等于寡聚状态的分子，因为每个单独的VISTA复合物都被定为有成效地与结合细胞表面的VISTA受体相互作用。上述构建体具有极高的稳定性和寡聚状态的同质性。(非共价卷曲螺旋寡聚化结构域通常表现出超过100℃的熔融温度，表现出95℃熔融温度的七聚体序列除外。

[0429] 此外，将嗜细胞或不嗜细胞的二聚VISTA-Ig四聚化。将框内VISTA与IgG1Fc(野生型IgG1以及现有的非FcR结合型IgG1两者)的Fc融合构建体用N端BirA位点修饰以用于酶生物素化，并克隆进pIRES2-EGFP载体。酶生物素化将允许特定的单残基修饰以及在生物素多聚化时取向。此方法已用于生成多种Ig融合蛋白，包括B7-1、PD-L1、PD-L2和TIM-3。然后将表达的蛋白在体外酶生物素化、通过体积排阻HPLC纯化并使用PE-亲和素四聚化。在体内评估嗜细胞或不嗜细胞的所得四聚体。

[0430] 这些工程化多聚体VISTA肽可用于治疗自身免疫和其他病症，其中在治疗学上保

证对VISTA途径和免疫抑制的干预。

[0431] 实施例13:用于诱导免疫抑制的VISTA腺病毒载体。

[0432] 使用重组腺相关病毒(AAV)的基因转移在基因疗法领域取得了巨大的技术进展。具体地讲,PD-L1基因或者CTLA4-Ig和CD40-Ig的AAV介导的基因送递已在狼疮和心脏移植自身免疫疾病模型中取得了疗效。这些模型将用于递送全长VISTA或寡聚VISTA胞外域,并在EAE模型中评价它们的疗效。使用Adeno-XTM表达系统(Clontech)根据厂商说明创建表达全长鼠VISTA或寡聚VISTA胞外域的重组腺病毒载体。简而言之,在人巨细胞病毒(CMV)启动子的控制下将VISTA克隆到删除E1和E3的、基于pAdDEST的表达载体。表达VISTA和对照lacZ的腺病毒然后从细胞裂解物中纯化。对于VISTA的全身性过表达,在通过免疫诱导疾病前或诱导后短时间内或在疾病发作后,将腺病毒通过尾静脉注射(1x 109个噬斑形成单位[Pfu])而施用给小鼠。对照小鼠将接受100μl PBS。在SJL小鼠和C57BL/6小鼠两者中监测疾病发展和变化,其表现出不同的疾病进展模式,并且其代表了两种不同形式的人MS患者的临床表现。

[0433] 实施例14:使用工程化蛋白和腺病毒载体的功能性研究

[0434] 还向小鼠施用(5-100μg蛋白/小鼠x每周3次)工程化VISTA和/或腺病毒载体。施用后,确定T细胞扩增、分化以及EAE发展。

[0435] 实施例15:对VISTA的结构研究以及确定VISTA功能的分子决定子

[0436] 组织化信号传导复合体的亲和力、特异性、寡聚状态以及形成和定位是促进免疫功能的关键因素。所有这些特征都将影响信号传导和免疫调节,因为受体-配体胞外域的组织化直接控制非共价相关胞质信号传导和支架分子的募集、组织和功能。使用包括细菌、昆虫和哺乳动物表达系统的技术以及高通量结晶和结构测定方法测定VISTA的高分辨率晶体结构。为了验证晶体学观察到的二硫键模式,我们将采用高分辨率质谱,其使用的方法已成功支持我们已公开的TIM-3和人DcR359研究。基于这些结构结果,设计了一系列具有改变的寡聚物特性的突变体,以及在VISTA IgV结构域的任何扰动区附近的突变体。这些突变体蛋白将提供研究VISTA功能的另外直接机制,并且应当可用于治疗学,其中免疫抑制是所需的,诸如本文确定的自身免疫、过敏和炎性疾病。这些突变体,尤其是寡聚物在体外系统中进行测试,并在动物自身免疫和炎性疾病模型中进行评估,以评价对疾病进展、疾病缓解或在避免动物发展自身免疫或炎性病症中的免疫抑制作用。

[0437] 这些寡聚VISTA蛋白将活化VISTA途径并用作自身免疫中免疫干预的靶标。此干预将抑制免疫,并对自身免疫疾病以及需要自身免疫抑制的其他病症发挥治疗有益效果。这通过在不同的自身免疫和炎症模型中施用寡聚化VISTA蛋白而实现,诸如EAE和胶原诱导型关节炎动物模型。此外,如上所述,构建了过表达全长VISTA或VISTA寡聚物的腺病毒载体,并在体内进行了测试。这些研究将确认VISTA寡聚物的免疫抑制作用。

[0438] 实施例16:使用条件性过表达VISTA转基因小鼠品系(VISTA转基因小鼠品系:R26StopFL VISTA(VISTA))的实验

[0439] 已使在loxP侧翼STOP盒之后包含VISTA的全长cDNA的靶向构建体靶向了泛表达的ROSA26基因座。生出多只被正确靶向的R26StopFL/-VISTA幼崽,并繁殖为CMV-Cre剔除品系60。VISTA xCMV-cre中的初步数据确认了GFP和提高的VISTA表达。关于这些小鼠免疫状态(T细胞对抗原的应答、抗体滴度等)的研究将确认受抑制的表型。将VISTA品系与CD4-cre、

CD11c-cre和Lys-Cre杂交以确定VISTA表达的谱系位置是否会影响抑制。还确定了T细胞的表型和功能，以及确定VISTA的过表达是否会导致Treg的生成。在这些研究中，将得自OVA免疫cre x VISTA品系的Treg过继转移到WT宿主，以确定在存在过表达的VISTA时抗原免疫是否诱导抗原特异性Treg。这应当确认VISTA是否影响Treg分化。

[0440] 此外，在EAE模型中进行了研究，借此评价在疾病发展方面VISTA蛋白对不同谱系(通过与CD4-、CD11c-、Lys-cre杂交)的影响。假设疾病可通过VISTA突变体的谱系限制性表达而抑制，或在CMVx VISTA突变体中，疾病发展的暂时控制还使用Cre-ERT2x VISTA□。通过施用他莫昔芬，我们可在疾病开始前、疾病开始时或疾病最严重时诱导VISTA的表达，以确定VISTA是否会影响免疫的诱导和/或效应期。使用BM嵌合体小鼠，可将VISTA的临时限制性过表达限制到造血室。为了认识对过表达VISTA的时间窗口的控制，从遗传学上打开VISTA，然后通过施用抗VISTA mab从血清学上关闭。这些研究将确定VISTA必须发挥控制自身免疫疾病发展和进展之作用的位置和时间。

[0441] 实施例17：抗VISTA抗体对CD40/TLR激动剂疫苗的作用

[0442] 如图22中所示，进行了实验，测定抗VISTA抗体对疫苗疗效的作用。这些结果表明抗VISTA增强了CD40/TLR疫苗的疗效。将C57BL/6小鼠1X105个转移性B16.F10黑素瘤细胞皮下攻击。四天后，将小鼠用100μg的肿瘤相关抗原ΔV、100μgαCD40FGK45(CD40激动性抗体)以及100μg S-27609(TLR7激动剂)在有或无抗VISTA(200μg x 3/周)的情况下进行疫苗接种。通过游标卡尺测量而监测肿瘤生长。

[0443] 已经对本发明进行了描述，以下将提供权利要求。这些权利要求旨在涵盖本文所述的所有一般性和特定性特征，通过语言对范围的所有说明可包括其中的范围。

序列表

<110> Trustees of Dartmouth College
Noelle, Randolph J.
Lu, Li-Fan
Sergio, Quezada
David, Gondek

<120> 调节性T细胞介体蛋白及其用途

<130> 76799.000106

<140> PCT/US2011/030087
<141> 2011-03-25

<150> 60/674,567
<151> 2005-04-25

<160> 10

<170> PatentIn 3.3版

<210> 1
<211> 4795
<212> DNA
<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 1

[0001]

gagcattcac tctagcgagc gagcggcgtg tacagccggc tccctgggct cctggagtcc 60

cgcttgctcc aagcgcactc cagcagtctc tttctgctct tgcccggctc gacggcgaca 120

tgggtgtccc cgcggtccca gaggccagca gcccgcgctg gggaacccctg ctccttgcta 180

ttttcctggc tgcatccaga ggtctggtag cagccttcaa ggtcaccact ccatattctc 240

tctatgtgtg tcccgaggga cagaatgcca ccctcacctg caggattctg ggccccgtgt 300

ccaaagggca cgatgtgacc atctacaaga cgtggtacct cagctcacga ggcgaggtcc 360

agatgtgcaa agaacaccgg cccatacgca acttcacatt gcagcacctt cagcaccacg 420

gaagccacct gaaagccaac gccagccatg accagcccca gaagcatggg ctagagctag 480

cttctgacca ccacggtaac ttctctatca ccctgcgcaa tgtgacccca agggacagcg 540

gcctctactg ctgtctagtg atagaattaa aaaaccacca cccagaacaa cggtctacg 600

ggtccatgga gctacaggta caggcaggca aaggctcggg gtccacatgc atggcgtcta 660

atgagcagga cagtgacagc atcacggctg cggccctggc caccggcgcc tgcatcgtgg 720

gaatcctctg cctccccctt atcctgctgc tggtctataa gcagagacag gtggcctctc 780

acccgccgtgc ccaggagttg gtgaggatgg acagcagcaa cacccaagga atcgaaaacc 840

caggcttcga gaccactcca ccctttcagg ggatgcctga ggccaagacc aggccgccac 900

tgtcctatgt ggccccagcgg caaccttcgg agtcaggacg gtacctgctc tctgacccca 960

gcacacctct gtcgcctcca ggccctgggg acgtcttttt cccatcccta gatccagtcc 1020

ctgactcccc taactctgaa gccatctaaa ccagctgggg aaccatgaac catggtacct 1080

gggtcaggga tatgtgcact tgatctatgg ctggcccttg gacagtcttt taggcactga 1140

ctccagcttc cttgctcctg ctctgagcct agactctgct tttacaagat gcacagaccc 1200

tccctatct ctttcagacg ctacttgggg ggcagggaga agatgttgga ttgctcatgg 1260

ctgttctcaa gatcttggga tgctgagttc tccctagaga cttgacttcg acagcccacag 1320

atgtcagatg acctgcatcc tatgaacgtc cggcttggca agagcctttc ttcatggaaa 1380

ccagtagccc ggaggggatg aggtaggcac cttgcccccc tcccgggaga gagacacaag 1440

atgtgagaga ctcctgctca ctgtgggggt gtggctggcc tgcttgtttg cctgaggatg 1500
ctcctctgtt ggactgactc tatccccctg gattctggag cttggctggc ctatgtccca 1560
ccagaggagc atctcagcag ccttccacca gcaacctgag ggcctgccag cttcgtggct 1620
ctgggctctc attacctgta tggccgtcca cagagctcag tggccagagg ctttgaaaca 1680
ggaagtacat gtcaggttca ggaaccactg tgagctcatt agtgtcttga gcaatgtgag 1740
gcctggacca gtggacacgg agggagggtg gcgagaggat gatggggatg atgaggggaa 1800
cacgctccct tcctgtcctt gtcatccacc actaccacta ttcagtgtgg agcagtggca 1860
aaggtgaccg acctccacaa tgtcctagtg atgctggacc atttctaagt gtgaaagaga 1920
tgctattaaa aacagtatgt ggcaatggct gccaacagct gagtggactg gaggcactgg 1980
ctttaaggcc ctggaggtgc agggcccggt atggggatag ggatgggagt ttcagtgagg 2040
gcctagggat cactccgctt ctgaccactc ttcttctgag cctcacctca gggtgacctt 2100
caggcacaca gaagagcttg cccctggtcc gatactactc ttggctctca tctccagggt 2160
ttggcatgac ctgggcacac agggggagtc ttcagaaagg attttaaagc atgaaaagaa 2220
agggtagttc ttgtgaggta gggatgggca gctgatgttt gagagtgagg agggatacgg 2280
ctgggcagat cactctccag tctctagagg gaaagtagct ctaagtctgg gagagcagca 2340
gccccagtggt accatatgtc ttcttgcagc ttccactggc tgggctgaac tgggcatggg 2400
taggaaagct cctgttctgg gcctgcagcc agggagaacc ccattcattc cctgaggaca 2460
gatgggtggg gagagaagag agagtttcag gccgggaagc agcaataagc tatctgctgg 2520
ggacccagac aagtigictg aigaggicca agaigtggga igccagtiat accigggget 2580
tggggatcct tagaggcttt gtatcatcat cataggagtg tcggggtggc cagggcatca 2640
aagccatgac ccctgtttta tcctcagggt ccactcttct gcaccatcca ttgctctaga 2700
tctatgcagt tactatagac agaatgtgtt gttctgtttg gctttgggga taatggcctg 2760
gcgaactgcc agctgttcag tggcagggct gtgaggccag tcaaagacta gaacccacag 2820
accagctgaa cgatgagtat agcctgtccc ctgggggagc ctgacctgtc tccagcccta 2880
agcttcagac ctcaccactc agatgacttc taagaatttg cctgtgggga cccctgcatg 2940
gctgcagctc cgtggaaagg agaggaggcc cccagcagaa gaaccactcg cttcctgccc 3000
agcttcctcc tgtagggctc taagtctctt cttcttggga ccctgcaagc aaaggcatgt 3060
cagcttggtg gtttcctgtt ttgggtgaag ttttgtgtgg tccgggttct gtctacatcc 3120
atgaacttgg ggtgctacca ccttgctgct gctgtagaga cagctgcagg atcttagggt 3180
ggaaaatgga ggtgccctga ggtgctagcc cttggggcaa aagatggggt ggcaatgaga 3240
cacagtgggg aactgagttc cccaagagga gggaggagcc ctgtagcctc aagggccata 3300
ttgggttcct ggtaccagca aaagcctaga gagcgaagtc tgtattttga ggaggtaatt 3360
gatccttacg gaatccatca gaaatttgga gcgggtgctt tatctatctc tggagggtct 3420
ctacctatct ccgatgaagc tctccctggg cctgggatgg gagaaaccag gaggaaaggt 3480
gtctgataaa gcaggggctt cttgacaagc caaagggcca ctggtagctg ttgtggaccg 3540
agctgaccct gctgaagtat tgtagtgtgc cttggaccaa cttctcaaaa gagcaacccc 3600
ggggctaccc tacttctgcc aggaagaggc ggagaagggg ctgagaggcc tggaaggggc 3660
tagctccttc tttgagaact gctccccgga ggacttggag gaggcggcta ggctacgggc 3720

[0002]

tgctgagggc cctttgtctt tcctaacctg ggcactgtta ggatgctccc tcctggaaaa 3780

ggctttcctg ggtgtgagct agagcagtgt ccatgccagc gctgaacctg ccatggtggg 3840

agctgaacta aaaatttctc agggaactaa aataggcaaa agaggaactg ggggaggagg 3900

gtgccaggca ggatgggggg aagggagggc agtgcaaaag tctcttgaaa cacagacagc 3960

ccagctgagt gccagtccca gatcacagag aatacggctc atctggctca tgttctgcat 4020

gcttgctgct ttaccctggc actttccttc tccaccatga gtgcgagtcc tgggagtcct 4080

gggagggtga ggattaatgc cagcctgggg agcagatagc tgacagagtc cttgggtaac 4140

tggcttgaac caggacctca ggattccact ctggggatct agctttgtct gggccagtga 4200

agatctctat aatggcatta ttgccagggg ataaacattt cactgggttc tgatctgttg 4260

ggtgtggctt cctggaaaat atggtgagag gaattctgct aaggatacag ttgataagaa 4320

agttctgaga ttgattagta atgcctgcct tggactcagg aagggaagtg gcagtatgaa 4380

tgccatgtct taatcatttt ggttaaaata tgcttcccaa aagatttcca cgtgtgttct 4440

tgtttatttg acatctgtct ccatatcagt cttgaaagcc tttctgtgtg tatatatatg 4500

atgtttgcgt gtatatatgt ttttgtgtgt gcatatggaa gtcagaaatc actgggtgtc 4560

ttcctccatt cctttgcaat gtatgttttt ttttttttta cgatttattt actatatgaa 4620

tgttttgcct gaatacatgc ataggtgtca cgtacatgcc tgctggaacg cttggaactg 4680

gagttacagg tggctatgag ctacagtgtg agcactggga atcaaacctg ggtcttctgc 4740

aagagcaaca aattaaaagt cagctcttaa ctacttgagc tatttttcca actcc 4795

[0003] <210> 2
<211> 309
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 2

Met Gly Val Pro Ala Val Pro Glu Ala Ser Ser Pro Arg Trp Gly Thr
1 5 10 15

Leu Leu Leu Ala Ile Phe Leu Ala Ala Ser Arg Gly Leu Val Ala Ala
20 25 30

Phe Lys Val Thr Thr Pro Tyr Ser Leu Tyr Val Cys Pro Glu Gly Gln
35 40 45

Asn Ala Thr Leu Thr Cys Arg Ile Leu Gly Pro Val Ser Lys Gly His
50 55 60

Asp Val Thr Ile Tyr Lys Thr Trp Tyr Leu Ser Ser Arg Gly Glu Val
65 70 75 80

Gln Met Cys Lys Glu His Arg Pro Ile Arg Asn Phe Thr Leu Gln His
85 90 95

Leu Gln His His Gly Ser His Leu Lys Ala Asn Ala Ser His Asp Gln
100 105 110

Pro Gln Lys His Gly Leu Glu Leu Ala Ser Asp His His Gly Asn Phe
115 120 125

Ser Ile Thr Leu Arg Asn Val Thr Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Cys
130 135 140

Cys Leu Val Ile Glu Leu Lys Asn His His Pro Glu Gln Arg Phe Tyr
145 150 155 160

Gly Ser Met Glu Leu Gln Val Gln Ala Gly Lys Gly Ser Gly Ser Ths

165 170 175

Cys Met Ala Ser Asn Glu Gln Asp Ser Asp Ser Ile Thr Ala Ala Ala
180 185 190

Leu Ala Thr Gly Ala Cys Ile Val Gly Ile Leu Cys Leu Pro Leu Ile
195 200 205

Leu Leu Leu Val Tyr Lys Gln Arg Gln Val Ala Ser His Arg Arg Ala
210 215 220

Gln Glu Leu Val Arg Met Asp Ser Ser Asn Thr Gln Gly Ile Glu Asn
225 230 235 240

Pro Gly Phe Glu Thr Thr Pro Pro Phe Gln Gly Met Pro Glu Ala Lys
245 250 255

Thr Arg Pro Pro Leu Ser Tyr Val Ala Gln Arg Gln Pro Ser Glu Ser
260 265 270

Gly Arg Tyr Leu Leu Ser Asp Pro Ser Thr Pro Leu Ser Pro Pro Gly
275 280 285

Pro Gly Asp Val Phe Phe Pro Ser Leu Asp Pro Val Pro Asp Ser Pro
290 295 300

Asn Ser Glu Ala Ile
305

<210> 3
<211> 4774
<212> DNA
<213> 智人

<400> 3

[0004]

ggggggcggt gcctggagca cggcgctggg gccgcccgca gcgctcactc gctcgcactc 60

agtcgcggga ggcttccccg cgccggccgc gtcccgcccg ctccccggca ccagaagttc 120

ctctgcgcgt ccgacggcga catgggcgtc cccacggccc tggaggccgg cagctggcgc 180

tggggatccc tgctcttcgc tctcttcctg gctgcgtccc taggtccggt ggcagccttc 240

aaggtcgcca cgccgtattc cctgtatgtc tgtcccgagg ggcagaacgt caccctcacc 300

tgcaggctct tgggccctgt ggacaaaggg cacgatgtga ccttctacaa gacgtggtac 360

cgcagctcga ggggcgaggt gcagacctgc tcagagcgcc ggcccatccg caacctcacg 420

ttccaggacc ttcacctgca ccatggaggc caccaggctg ccaacaccag ccacgacctg 480

gctcagcgcc acgggctgga gtcggcctcc gaccaccatg gcaacttctc catcaccatg 540

cgcaacctga ccctgctgga tagcggcctc tactgctgcc tggtggtgga gatcaggcac 600

caccactcgg agcacagggt ccatggtgcc atgagctgtca ggtgcagac aggcaaagat 660

gcaccatcca actgtgtggt gtacccatcc tcctcccagg atagtgaaaa catcacggct 720

gcagccctgg ctacgggtgc ctgcatcgta ggaatcctct gcctcccctt catcctgctc 780

ctggtctaca agcaaaggca ggcagcctcc aacgccgtg cccaggagct ggtgcggatg 840

gacagcaaca ttcaagggat tgaaaacccc ggctttgaag cctcaccacc tgcccagggg 900

ataccgagg ccaaagtcag gcacccctg tcctatgtgg cccagcggca gccttctgag 960

tctgggcggc atctgctttc ggagcccagc acccccctgt ctcctccagg ccccggagac 1020

gtcttcttcc catccctgga ccctgtccct gactctccaa actttgaggt catctagccc 1080

agctggggga cagtgggctg ttgtggctgg gtctggggca ggtgcatttg agccagggct 1140

ggctctgtga gtggcctcct tggcctcggc cctggttccc tccctcctgc tctgggctca 1200

[0005]

gatactgtga catcccagaa gcccagcccc tcaacccctc tggatgctac atggggatgc 1260

tggacggctc agccccctgtt ccaaggattt tggggtgctg agattctccc ctagagacct 1320

gaaattcacc agctacagat gccaaatgac ttacatctta agaagtctca gaacgtccag 1380

ccettcagca gctctcgttc tgagacatga gccttgggat gtggcagcat cagtgggaca 1440

agatggacac tgggccaccc tcccaggcac cagacacagg gcacggtgga gagacttctc 1500

ccccgtggcc gccttggctc cccctttttg ccccgaggcig ctcttctgtc agacttcctc 1560

tttgtaccac agtggctctg gggccaggcc tgcctgccca ctggccatcg ccacctcccc 1620

cagctgcctc ctaccagcag tttctctgaa gatctgtcaa caggttaagt caatctgggg 1680

cttccactgc ctgcatttcca gtcccccagag cttggtggtc ccgaaacggg aagtacatat 1740

tggggcatgg tggcctccgt gagcaaatgg tgtcttgggc aatctgaggc caggacagat 1800

gttgccccac ccactggaga tggtgctgag ggaggtgggt ggggccttct gggaaggtga 1860

gtggagaggg gcacctgccc cccgccctcc ccatcccctа ctcccactgc tcagcgcggg 1920

ccattgcaag ggtgcccacac aatgtcttgt ccacccctggg acacttctga gtatgaagcg 1980

ggatgctatt aaaaactaca tggggaaaca ggtgcaaacc ctggagatgg attgtaagag 2040

ccagtttaaa tctgcactct gctgctcctc ccccaccccc accttccact ccatacaatc 2100

tgggcctggt ggagtcttcg cttcagagcc attcggccag gtgcgggtga tgttcccatc 2160

tcctgcttgt gggcatgccc tggctttgtt tttatacaca taggcaaggt gagtcctctg 2220

tggaattgtg attgaaggat tttaaagcag gggaggagag taggggggcat ctctgtacac 2280

tctgggggta aaacagggaa ggcagtgcct gagcatgggg acaggtgagg tggggctggg 2340

cagacccccc gtagcgttta gcaggatggg ggccccaggt actgtggaga gcatagtcca 2400

gcctgggcat ttgtctccta gcagcctaca ctggctctgc tgagctgggc ctgggtgctg 2460

aaagccagga tttggggcta ggcgggaaga tgttcgccca attgcttggg gggttggggg 2520

gatggaaaag gggagcacct ctaggctgcc tggcagcagt gagccctggg cctgtggcta 2580

cagccaggga accccacctg gacacatggc cctgcttcta agccccccag ttaggccaa 2640

aggaatggtc cactgagggc ctcctgctct gcctgggctg ggccaggggc tttgaggaga 2700

gggtaaacat aggccccgag atgggggctga cacctcgagt ggccagaata tgcccaaacc 2760

ccggcttctc ccttgtccct aggcagaggg gggtcccttc ttttgttccc tctggtcacc 2820

acaatgcttg atgccagctg ccataggaag agggtgctgg ctggccatgg tggcacacac 2880

ctgtcctccc agcacttttgc agggctgagg tggaaggacc gcttaagccc aggtgttcaa 2940

ggctgctgtg agctgtgttc gagccactac actccagcct ggggacggag caaaactttg 3000

cctcaaaaca aattttaaaa agaaagaaag aaggaaagag ggtatgtttt tcacaattca 3060

tgggggcctg catggcagga gtggggacag gacacctgct gttcctggag tcgaaggaca 3120

agcccacagc ccagattccg gttctcccaa ctcaggaaga gcatgccctg ccctctgggg 3180

aggctggcct ggccccagcc ctcagctgct gaccttgagg cagagacaac ttctaagaat 3240

ttggctgcca gaccccaggc ctggctgctg ctgtgtggag agggaggcgg ccccgcagcag 3300

aacagccacc gcacttcctc ctcagcttcc tctggtgcgg ccctgccctc tcttctctgg 3360

acccttttac aactgaacgc atctgggctt cgtggtttcc tgttttcagc gaaatttact 3420

ctgagctccc agttccatct tcatccatgg ccacaggccc tgcctacaac gcactaggga 3480

[0006]

cgtcectccc tgctgctgct ggggaggggc aggctgctgg agccgccctc tgagttgccc 3540

tgggtgcgag aacatggcgc ctccaggggg cgggaggagc actagggcct ggggcaggag 3660

gctcctggag cgctggattc ctggcacagt ctgaggccct gagagggaaa tccatgcttt 3720

taagaactaa ttcattgtta ggagatcaat caggaattag gggccatctt acctatctcc 3780

tgacattcac agttaatag agacttcctg ccttiattcc ctcccaggga gaggctgaag 3840

gaatggaatt gaaagcacca tttggagggt tttgctgaca cagcggggac tgctcagcac 3900

tccctaaaaa cacaccatgg aggccactgg tgactgctgg tgggcaggct ggccctgcct 3960

gggggagtcc gtggcgatgg gcgctggggt ggaggtgcag gagccccagg acctgctttt 4020

caaaagactt ctgcctgacc agagctccca ctacatgcag tggccccaggg cagaggggct 4080

gatacatggc cttttcagg gggtgctcct cgcggggtgg actgggagt gtgcagtggg 4140

acaggggct gcaggggtcc tgccaccacc gagcaccaac ttggcccctg gggtcctgcc 4200

tcatgaatga ggccttcccc agggctggcc tgactgtgct gggggctggg ttaacgtttt 4260

ctcagggaac cacaatgcac gaaagaggaa ctggggttgc taaccaggat gctgggaaca 4320

aaggcctctt gaagccccagc cacagcccag ctgagcatga ggcccagccc atagacggca 4380

caggccacct ggcccattcc ctgggcattc cctgctttgc attgctgctt ctcttcaccc 4440

catggaggct atgtcaccct aactatcctg gaatgtgttg agagggattc tgaatgatca 4500

atatagcttg gtgagacagt gccgagatag atagccatgt ctgccttggg cacgggagag 4560

ggaagtggca gcatgcatgc tgtttcttgg ccttttctgt tagaatactt ggtgctttcc 4620

aacacacttt cacatgtgtt gtaacttgtt tgatccaccc ccttccctga aaatcctggg 4680

aggttttatt gctgccattt aacacagagg gcaatagagg ttcigaaagg tctgtgtctt 4740

gtcaaaacaa gtaaacggtg gaactacgac taaa 4774

<210> 4
<211> 311
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

Met Gly Val Pro Thr Ala Leu Glu Ala Gly Ser Trp Arg Trp Gly Ser
1 5 10 15

Leu Leu Phe Ala Leu Phe Leu Ala Ala Ser Leu Gly Pro Val Ala Ala
20 25 33

Phe Lys Val Ala Thr Pro Tyr Ser Leu Tyr Val Cys Pro Glu Gly Gln
35 40 45

Asn Val Thr Leu Thr Cys Arg Leu Leu Gly Pro Val Asp Lys Gly His
50 55 60

Asp Val Thr Phe Tyr Lys Thr Trp Tyr Arg Ser Ser Arg Gly Glu Val
65 70 75 80

Gln Thr Cys Ser Glu Arg Arg Pro Ile Arg Asn Leu Thr Phe Gln Asp
85 90 95

Leu His Leu His His Gly Gly His Gln Ala Ala Asn Thr Ser His Asp
100 105 110

Leu Ala Gln Arg His Gly Leu Glu Ser Ala Ser Asp His His Gly Asn
115 120 125

Phe Ser Ile Thr Met Arg Asn Leu Thr Leu Leu Asp Ser Gly Leu Tyr
130 135 140

Cys Cys Leu Val Val Glu Ile Arg His His His Ser Glu His Arg Val
145 150 155 160

His Gly Ala Met Glu Leu Gln Val Gln Thr Gly Lys Asp Ala Pro Ser
165 170 175

Asn Cys Val Val Tyr Pro Ser Ser Ser Gln Asp Ser Glu Asn Ile Thr
180 185 190

Ala Ala Ala Leu Ala Thr Gly Ala Cys Ile Val Gly Ile Leu Cys Leu
195 200 205

Pro Leu Il e Leu Leu Leu Val Tyr Lys Gln Arg Gln Ala Ala Ser Asn
210 215 220

Arg Arg Ala Gln Glu Leu Val Arg Met Asp Ser Asn Ile Gln Gly Ile
225 230 235 240

Glu Asn Pro Gly Phe Glu Ala Ser Pro Pro Ala Gln Gly Ile Pro Glu
245 250 255

Ala Lys Val Arg His Pro Leu Ser Tyr Val Ala Gln Arg Gln Pro Ser
260 265 270

Glu Ser Gly Arg His Leu Leu Ser Glu Pro Ser Thr Pro Leu Ser Pro
275 280 285

Pro Gly Pro Gly Asp Val Phe Phe Pro Ser Leu Asp Pro Val Pro Asp
290 295 300

Ser Pro Asn Phe Glu Val Ile
305 310

[0007]

<210> 5
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L3的共有序列

<400> 5

Ile Thr Ala Ala Ala Leu Ala Thr Gly Ala Cys Ile Val Gly Ile Leu
1 5 10 15

Cys Leu Pro Leu Ile Leu Leu Leu Val Tyr Lys Gln Arg Gln
20 25 30

<210> 6
<211> 1316
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 6
ggagtcctcc ccttggagcc tgggaggcct agggagaaag tagttctctt tcggtggcag 60

ggttgctgtc gagggcaccg agcaggagga taggtcgaca gagacgagga gttctggctc 120

ctcctgcaga catgcaccag cggctgctgg gctcgtcccc gggrctcgcc cccgcgcggg 180

ggctctgaat gcctgccgcc gccccccatga gagcaccggc ctgggctccc gccccctaagc 240

ctctgctcgc ggagactgag ccatgtgggc ctggggctgg gccgctgcag cgctcctctg 300

gctacagact gcaggagccg gggcccggca ggagctcaag aagtctcggc agctgtttgc 360

gcgtgtggat tccccaata ttaccacgtc caaccgtgag ggattcccag gctccgtcaa 420

gccccccggaa gcctctggac ctgagctctc agatgcccac atgacgtggt tgaactttgt 480

ccgacggcca gatgatgggt cctctagaaa acggtgtcgt ggccgggaca agaagtcgcg 540

aggcctctca ggtctcccag ggccccccagg acctcctggc cctcctggtc ccccctggctc 600

ccctggtgtg ggcgttaccc cagaggcctt actgcaggaa tttcaggaga tactgaaaga 660

ggccacagaa cttcgattcc cagggctacc agacacattg ttaccccagg aacccagcca 720

acggctggtg gttgaggcct tctactgccg tttgaaaggc cctgtgctgg tggacaagaa 780

gactctggtg gaactgcaag gattccaagc tcctactact cagggcgcct tcctgcgggg 840

atctggcctg agcctgtcct tgggccgatt cacagccccca gtctctgcca tcttccagtt 900

ttctgccagc ctgcacgtgg accacagtga actgcagggc agaggccggt tgcgtacccg 960

ggatatggtc cgtgttctca tctgtattga gtccttgtgt catcgtcata cgtccctgga 1020

ggctgtatca ggtctggaga gcaacagcag ggtcttcaca gtgcaggttc aggggctgct 1080

gcatctacag tctggacagt atgtctctgt gttcgtggac aacagttctg gggcagtcct 1140

caccatccag aacacttcca gcttctcggg aatgcttttg ggtacctagc ggagctgaag 1200

aaacgattgt ggattgagga accaacacct tgcttcttag aggagctgaa aaggactact 1260

cactcccctt ttaatagttt tcatagcaat aaagaactcc aaacttcttc atcgct 1316

<210> 7
<211> 308
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 7

Met Trp Ala Trp Gly Trp Ala Ala Ala Ala Leu Leu Trp Leu Gln Thr
1 5 10 15

[0008] Ala Gly Ala Gly Ala Arg Gln Glu Leu Lys Lys Ser Arg Gln Leu Phe
20 25 30

Ala Arg Val Asp Ser Pro Asn Ile Thr Thr Ser Asn Arg Glu Gly Phe
35 40 45

Pro Gly Ser Val Lys Pro Pro Glu Ala Ser Gly Pro Glu Leu Ser Asp
50 55 60

Ala His Met Thr Trp Leu Asn Phe Val Arg Arg Pro Asp Asp Gly Ser
65 70 75 80

Ser Arg Lys Arg Cys Arg Gly Arg Asp Lys Lys Ser Arg Gly Leu Ser
85 90 95

Gly Leu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly
100 105 110

Ser Pro Gly Val Gly Val Thr Pro Glu Ala Leu Leu Gln Glu Phe Gln
115 120 125

Glu Ile Leu Lys Glu Ala Thr Glu Leu Arg Phe Ser Gly Leu Pro Asp
130 135 140

Thr Leu Leu Pro Gln Glu Pro Ser Gln Arg Leu Val Val Glu Ala Phe
145 150 155 160

Tyr Cys Arg Leu Lys Gly Pro Val Leu Val Asp Lys Lys Thr Leu Val
165 170 175

Glu Leu Gln Gly Phe Gln Ala Pro Thr Thr Gln Gly Ala Phe Leu Arg
180 185 190

Gly Ser Gly Leu Ser Leu Ser Leu Gly Arg Phe Thr Ala Pro Val Ser
195 200 205

Ala Ile Phe Gln Phe Ser Ala Ser Leu His Val Asp His Ser Glu Leu
210 215 220

Gln Gly Arg Gly Arg Leu Arg Thr Arg Asp Met Val Arg Val Leu Ile
225 230 235 240

Cys Ile Glu Ser Leu Cys His Arg His Thr Ser Leu Glu Ala Val Ser
245 250 255

Gly Leu Glu Ser Asn Ser Arg Val Phe Thr Val Gln Val Gln Gly Leu
260 265 270

Leu His Leu Gln Ser Gly Gln Tyr Val Ser Val Phe Val Asp Asn Ser
275 280 285

Ser Gly Ala Val Leu Thr Ile Gln Asn Thr Ser Ser Phe Ser Gly Met
290 295 300

Leu Leu Gly Thr
305

<210> 8
<211> 1055
<212> DNA
<213> 智人

<400> 8

[0009]

ctcgccgcgc tgagccgcct cgggacggag ccatgcggcg ctgggcctgg gccgcggtcg 60

tggtcccccc cgggccgcag ctcgtgctcc tcgggggcgt cggggcccgg cgggaggcac 120

agaggacgca gcagcctggc cagcgcgcag atccccccaa cgcccaccgcc agcgcgtcct 180

cccgcgaggg gctgcccgag gccccaagc catcccaggc ctcaggacct gagttctccg 240

acgcccacat gacatggctg aactttgtcc ggcggccgga cgacggcgcc ttaaggaagc 300

ggtgcggaag cagggacaag aagccgcggg atctcttcgg tccccagga cctccaggtg 360

cagaagtgac cgcggagact ctgcttcacg agtttcagga gctgctgaaa gaggccacgg 420

agcgccggtt ctcagggctt ctggacccgc tgctgcccca gggggcgggc ctgcggctgg 480

tgggcgaggc ctttcactgc cggctgcagg gtccccgccg ggtggacaag cggacgctgg 540

tggagctgca tggtttccag gctcctgctg cccaaggtgc ctttctgcga ggctccggtc 600

tgagcctggc ctcgggtcgg ttcacggccc ccgtgtccgg catcttccag ttctctgcca 660

gtctgcacgt ggaccacagt gagctgcagg gcaaggcccg gctgcgggcc cgggacgtgg 720

tgtgtgttct catctgtatt gagtccctgt gccagcgcca cacgtgcctg gaggccgtct 780

caggcctgga gagcaacagc agggtcttca cgctacaggt gcagggctg ctgcagctgc 840

aggctggaca gtacgcttct gtgtttgtgg acaatggctc cggggccgtc ctcaccatcc 900

aggcgggctc cagcttctcc gggctgctcc tgggcacgtg agggcgccca gggggctgg 960

cgaggagctg ccgccggatc ccgggggacc tcctactgat gcccgtggtc accacaataa 1020

agagccctcc accctcaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1055

<210> 9
<211> 302
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9

Met Arg Arg Trp Ala Trp Ala Ala Val Val Val Leu Leu Gly Pro Gln
1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Gly Gly Val Gly Ala Arg Arg Glu Ala Gln Arg Thr
20 25 30

Gln Gln Pro Gly Gln Arg Ala Asp Pro Pro Asn Ala Thr Ala Ser Ala

35 40 45

Ser Ser Arg Glu Gly Leu Pro Glu Ala Pro Lys Pro Ser Gln Ala Ser
50 55 60

Gly Pro Glu Phe Ser Asp Ala His Met Thr Trp Leu Asn Phe Val Arg
65 70 75 80

Arg Pro Asp Asp Gly Ala Leu Arg Lys Arg Cys Gly Ser Arg Asp Lys
85 90 95

Lys Pro Arg Asp Leu Phe Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Ala Glu Val
100 105 110

Thr Ala Glu Thr Leu Leu His Glu Phe Gln Glu Leu Leu Lys Glu Ala
115 120 125

Thr Glu Arg Arg Phe Ser Gly Leu Leu Asp Pro Leu Leu Pro Gln Gly
130 135 140

Ala Gly Leu Arg Leu Val Gly Glu Ala Phe His Cys Arg Leu Gln Gly
145 150 155 160

Pro Arg Arg Val Asp Lys Arg Thr Leu Val Glu Leu His Gly Phe Gln
165 170 175

Ala Pro Ala Ala Gln Gly Ala Phe Leu Arg Gly Ser Gly Leu Ser Leu
180 185 190

Ala Ser Gly Arg Phe Thr Ala Pro Val Ser Gly Ile Phe Gln Phe Ser
195 200 205

[0010] Ala Ser Leu His Val Asp His Ser Glu Leu Gln Gly Lys Ala Arg Leu
210 215 220

Arg Ala Arg Asp Val Val Cys Val Leu Ile Cys Ile Glu Ser Leu Cys
225 230 235 240

Gln Arg His Thr Cys Leu Glu Ala Val Ser Gly Leu Glu Ser Asn Ser
245 250 255

Arg Val Phe Thr Leu Gln Val Gln Gly Leu Leu Gln Leu Gln Ala Gly
260 265 270

Gln Tyr Ala Ser Val Phe Val Asp Asn Gly Ser Gly Ala Val Leu Thr
275 280 285

Ile Gln Ala Gly Ser Ser Phe Ser Gly Leu Leu Leu Gly Thr
290 295 300

<210> 10
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Treg-sTNF的共有序列

<400> 10

Ile Phe Gln Phe Ser Ala Ser Leu His Val Asp His Ser Glu Leu Gln
1 5 10 15

Gly

鼠PD-XL的全长序列

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

图1A

鼠PD-XL与B7-H1(PD-L1),B7-DC (PD-L2),
B7-H3,和B7S1的胞外域比对。

```
PD-XL          ----FKVTTPYSLYVC-------PEGQNATLTCRILGPVSKGHDVTIYKTWYLSSRGEVQM
B7-H1_(PD-L1)  ----FTITAPKDLYVV------EYGSNVTMECRF--PVERELDLLALVVYWEKE-DEQ--
B7-DC_(PD-L2)  L---FTVTAPKEVYTV------DVGSSVSLECDF---------------------DRRE
B7-H3_(CD276)  ----VLVQVSEDPVVA------LVDTDATLRCSF--SPEPGFSLAQLNLIWQLT-DTKQL
B7-H4_(B7S1)   LIIGTLSGKHFITVTTFTSAGNIGEDGTLSCTF----EPDIKLNGIVIQWLKE-GIKGL

PD-XL          CKEHRPIRN-FTLQHLQHHGSHLKANASHEQPQKHGLELASDHHGNFSITLRNVTPRDSG
B7-H1_(PD-L1)  VIQFVAGEEDLKPQHSNFRG---RASLPKDQLLK---------GNAALQITDVKLQDAG
B7-DC_(PD-L2)  CTELEGIRASLQKVENDTSLQSEYATLLHEQLPL---------GQALFHITPSVQVRDSG
B7-H3_(CD276)  VEFTTEGRD----QGSAYSN---RTALFPELLVQ---------GNASLRLQRVRVTDEG
B7-H4_(B7S1)   VHFPKEGKDDLSQQMEMFAG---HTAVFAQNVV---------GNASLRLKNIQLTDAG

PD-XL          LYCCLN----------IELHNHHPEQRF-------------YGSMELQVQAGKG-----
B7-H1_(PD-L1)  VYCQLLSYGGA-DYKRITLKVNAPYRKINQRISVDPA-----TSEHELICQA-EGYPEAE
B7-DC_(PD-L2)  QYRGLAICGAAMDYKYLTVKVKASYMRIDTRILEVPG-----TGEVQLTCQA-RGYPLAE
B7-H3_(CD276)  SYTCTVSIQDF-DSAAVSLQVAAPYSK--PSMTLEPNKDLRPGDMVTITCSSYQGYPEAE
B7-H4_(B7S1)   THTGIYRTSKGKGNANLEYMTGAFSM---PEIHVDYN-----ASSESLRCEAPRWFPQPT

PD-XL          -------------SGST-----------------------------GVASNEQDSDSITA
B7-H1_(PD-L1)  VIWTN--SDHQPVSGKRSVTTSRTEGMLLNVTSSLRVNATANDVFYCTFWRSQPGQNHTA
B7-DC_(PD-L2)  VSWQN-------VSVPANTSHIRTPEGLYQVTSVLRLKPQPSRNFSCMFWNAHMKELTSA
B7-H3_(CD276)  VFWKD--GQGVPLTGNVTTSQMANERGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHG
B7-H4_(B7S1)   VAWASQVDQGANPGEVSNTSFELNSENVTMKVVSVLYNVTINNTYSCMIENDIAK--ATG

PD-XL          A-------------------
B7-H1_(PD-L1)  ELIIPELPATHPPQNRTH---
B7-DC_(PD-L2)  IIDPLSRMEPKVPRTW-----
B7-H3_(CD276)  SVTITGQPLTFPPEA------
B7-H4_(B7S1)   DIKVTDSEVKRRSQLQLLNSG
```

图1B

鼠PD-XL与PD-1，CTLA-4，CD28，BTLA，和ICOS的胞外域比对。

```
                 ********************************************************************
PD-XL    ---FKVTTPY----------SLIVCPEGQNATMTCRILGPVSKGHDVTIYKTWYLSSRGE
PD-1     -SGWLLEVPNGPWRSLTFYPANLTVSEGANATFTCSLS--------------NWSEDLM
CTLA-4   -EAIQVTQPS----------VVLASSHG-VASFPCEYS--------------PSHNTDE
CD28     -------------------------RSNAEFMCD----------------------
BTLA     EKATKRNDEECPVQLTITRNSKQSARTGELFKIQCPVK---------------YCVHRPN
ICOS     --EINGSADH----------RMFSFHNG-GVQISCKYP--------------ETVQQLK
                 ********************************************************************
PD-XL    VQMCKEHRPIR---NFTLQHLQHHGSHLKANASHDQPQKHGELASDHHGNFSITLRNVT
PD-1     LNWNRLSPSNQ------TEKQAAFCNGLSQPVQDARFQIIQLPN----RHDFHMNILDTR
CTLA-4   VRVTVLRQTND---QMTEVCATTFTEKNTVGFLDYPFCSGTFNE-----SRVNLTIQGLR
CD28     ------------------------------------GDFDN-----ETVTERLNNLH
BTLA     VTWCKHNGTICVPLEVSPQLYTSWEENQSVPVFVLHFKPIHSDNGSYSCSTNFNSQVIN
ICOS     MRLFREREVLC---ELT----KTKGSGNAVSIKNPMLCLYMLSN-----NSVSFFLNNPD
                 ***********************************
PD-XL    PRDSGLYCCLVIELKNHHPEQRFYGSMELQVQAGKCSGSTCMASNEQDSDSITAA-----
PD-1     RNDSGIYLC---GAISLHPKAKIEES----------PGAELVVTERILETSTRYPSPSPK
CTLA-4   AVDTGLYLC---KVELMYPPPYFVGM---------GNGTQIYVIDPEPCPDSD-------
CD28     VNHTDIYFC---KIEFMYPPPYLDNE--------RSNGTIIHIKEKHLCHTQSSPKL---
BTLA     SHSVTIHVRERTQNSSEHPLITVSDI---------PDATNASGPSTMEERPGRTWLLY--
ICOS     SSQGSYYFC---SLSIFDPPPFQERN---------LSGGYLHIYESQLCCQLKLWL----
PD-XL    --------
PD-1     PEERFQGM
CTLA-4   --------
CD28     --------
BTLA     --------
ICOS     --------
```

图1C

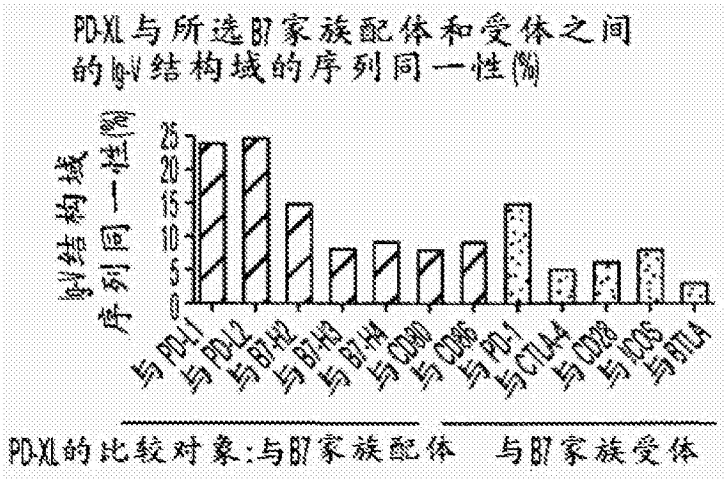

PD-XL与所选B7家族配体和受体之间
的IgV结构域的序列同一性(%)
序列同一性(%)
25
20
15
10
5
0
与PD-L1
与PD-L2
与B7-H2
与B7-H3
与B7-H4
与CD80
与CD86
与PD-1
与CTLA-4
与CD28
与ICOS
与BTLA
PD-XL的比较对象:与B7家族配体
与B7家族受体

图1D

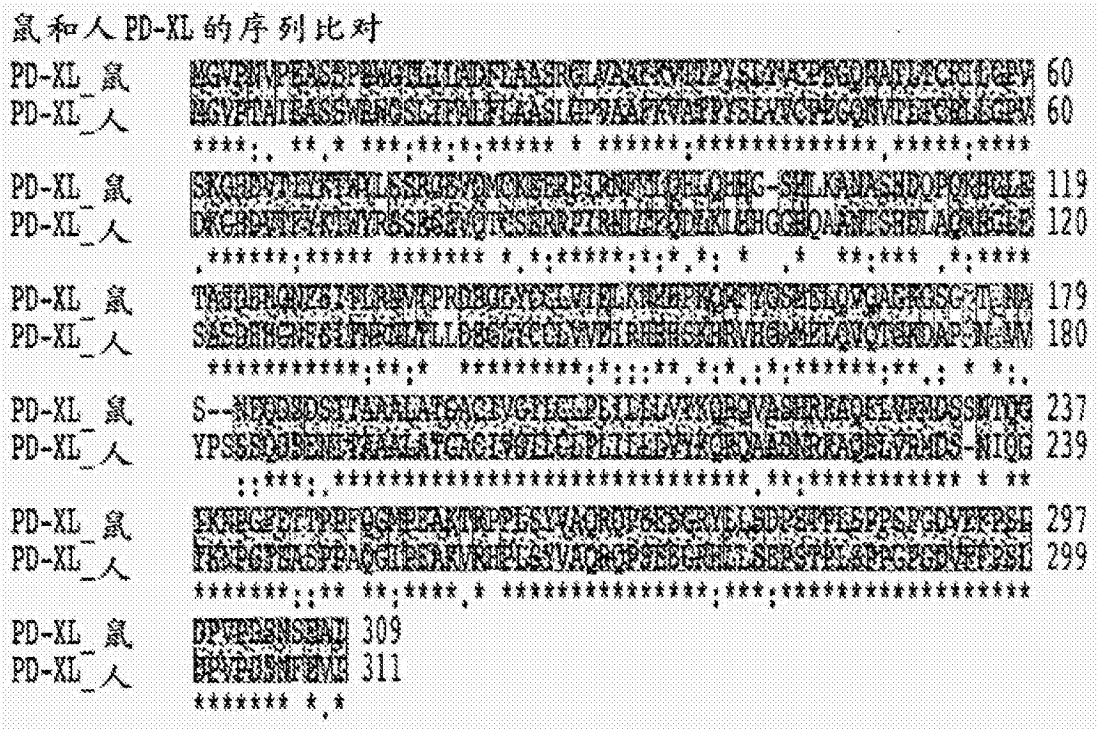

鼠和人PD-XL的序列比对
PD-XL_鼠
PD-XL_人
60
60
119
120
179
180
237
239
297
299
309
311

图1E

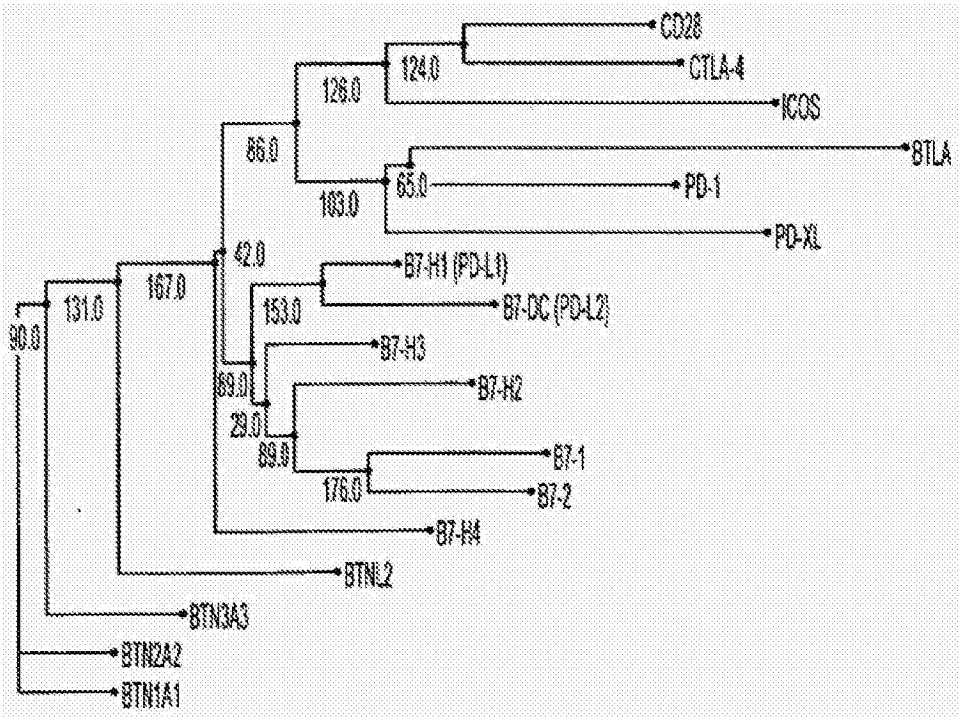

CD28
CTLA-4
ICOS
BTLA
PD-1
PD-XL
B7-H1 (PD-L1)
B7-DC (PD-L2)
B7-H3
B7-H2
B7-1
B7-2
B7-H4
BTNL2
BTN3A3
BTN2A2
BTN1A1
124.0
126.0
66.0
65.0
163.0
42.0
153.0
89.0
29.0
89.0
176.0
167.0
131.0
90.0

图2

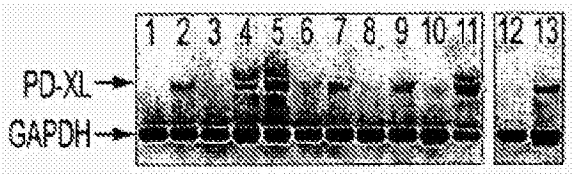

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
PD-XL
GAPDH

图3A

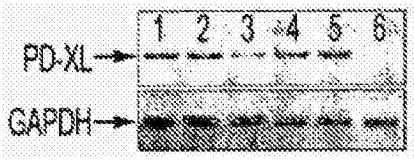

1 2 3 4 5 6
PD-XL
GAPDH

图3B

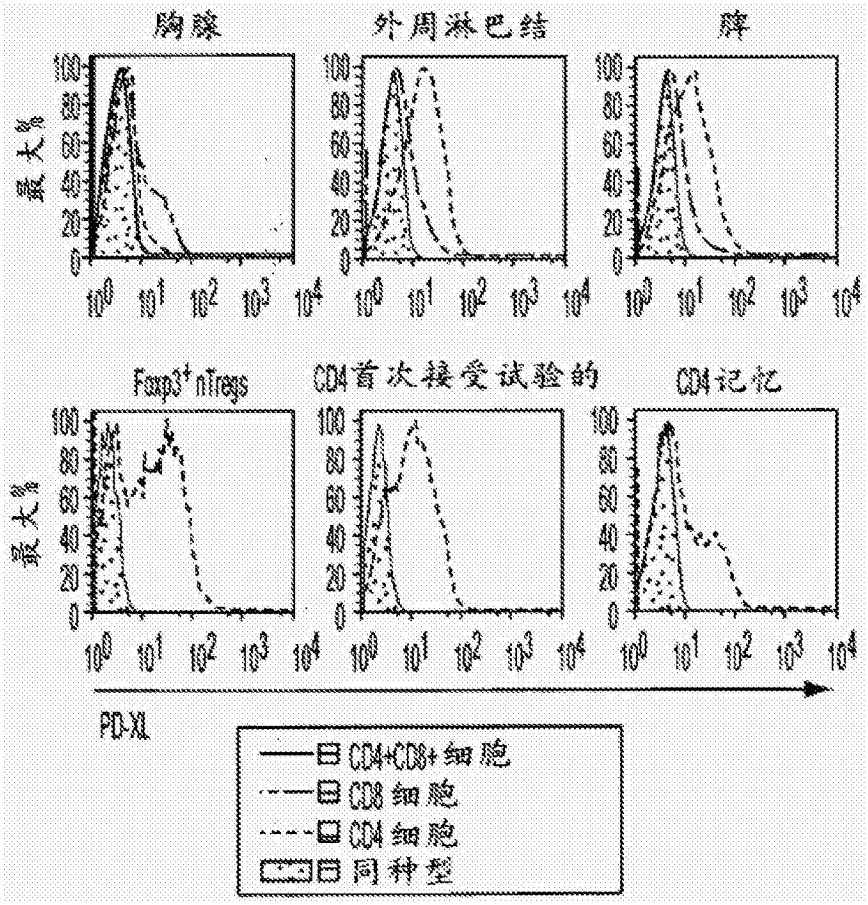

胸腺
外周淋巴结
脾
Foxp3+ nTregs
CD4首次接受试验的
CD4记忆
最大%
PD-XL
CD4+CD8+细胞
CD8细胞
CD4细胞
同种型

图3C

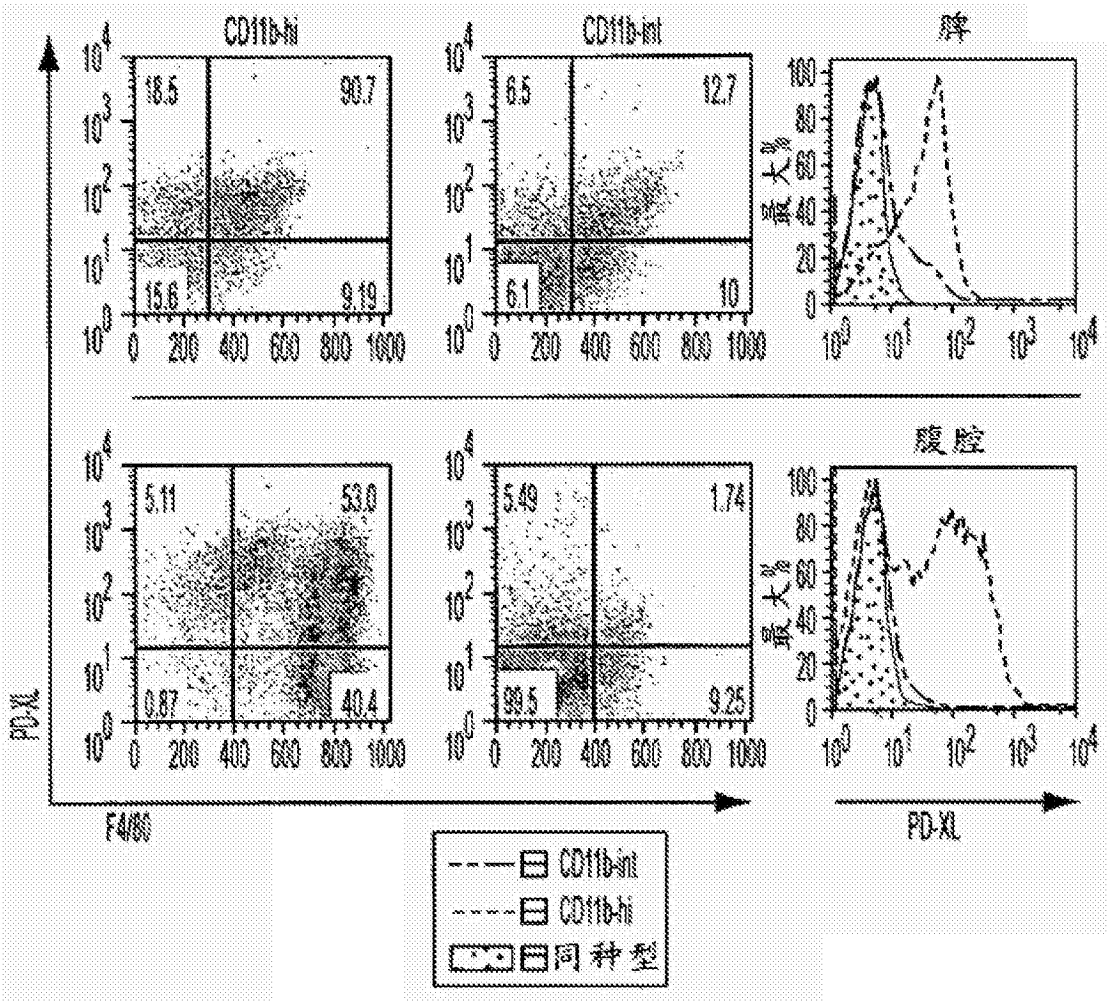

CD11b-hi
CD11b-int
脾
腹腔
18.5
90.7
15.6
9.19
6.5
12.7
6.1
10
5.11
53.0
0.87
40.4
5.49
1.74
89.5
9.25
PD-XL
F4/80
PD-XL
CD11b-int
CD11b-hi
同种型

图3D

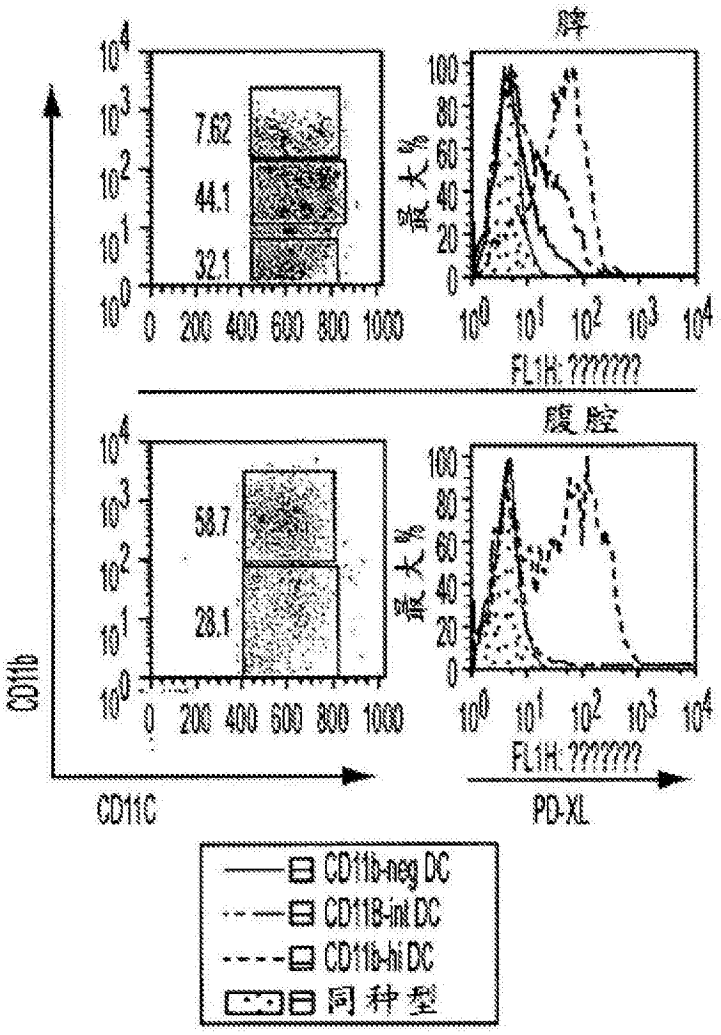

脾
7.62
44.1
32.1
FL1H: ???????
腹腔
53.7
28.1
FL1H: ???????
CD11b
CD11C
PD-XL
CD11b-neg DC
CD11B-int DC
CD11b-hi DC
同种型

图3E

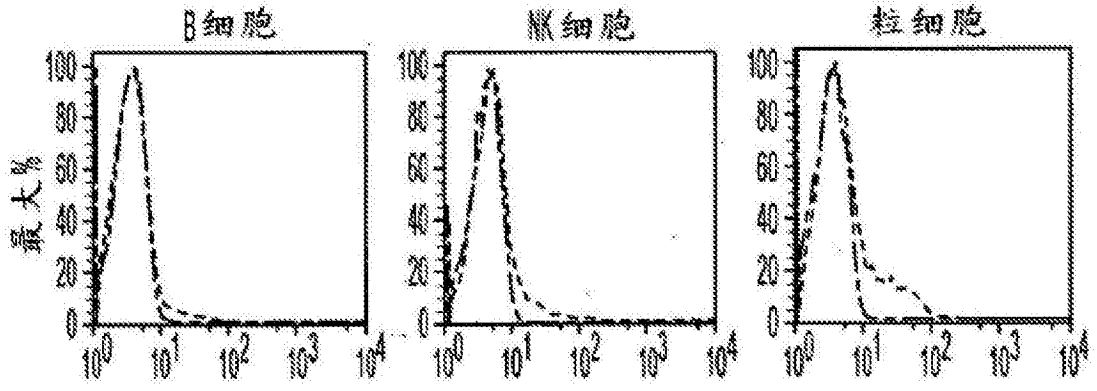

B细胞
NK细胞
粒细胞

图3F

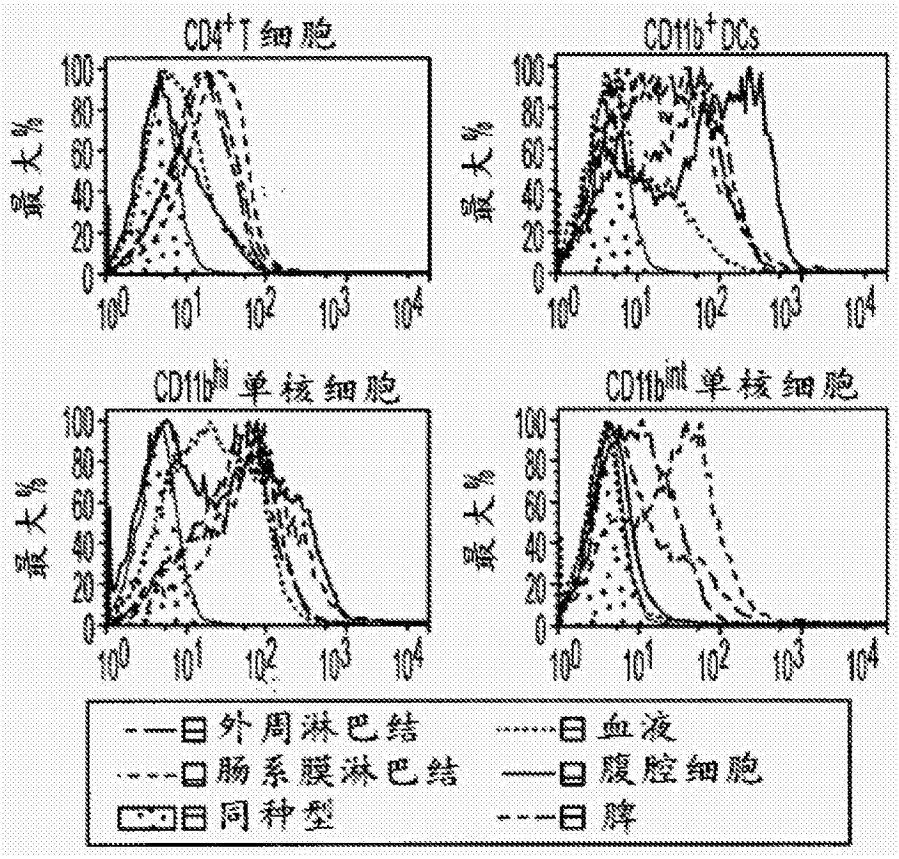
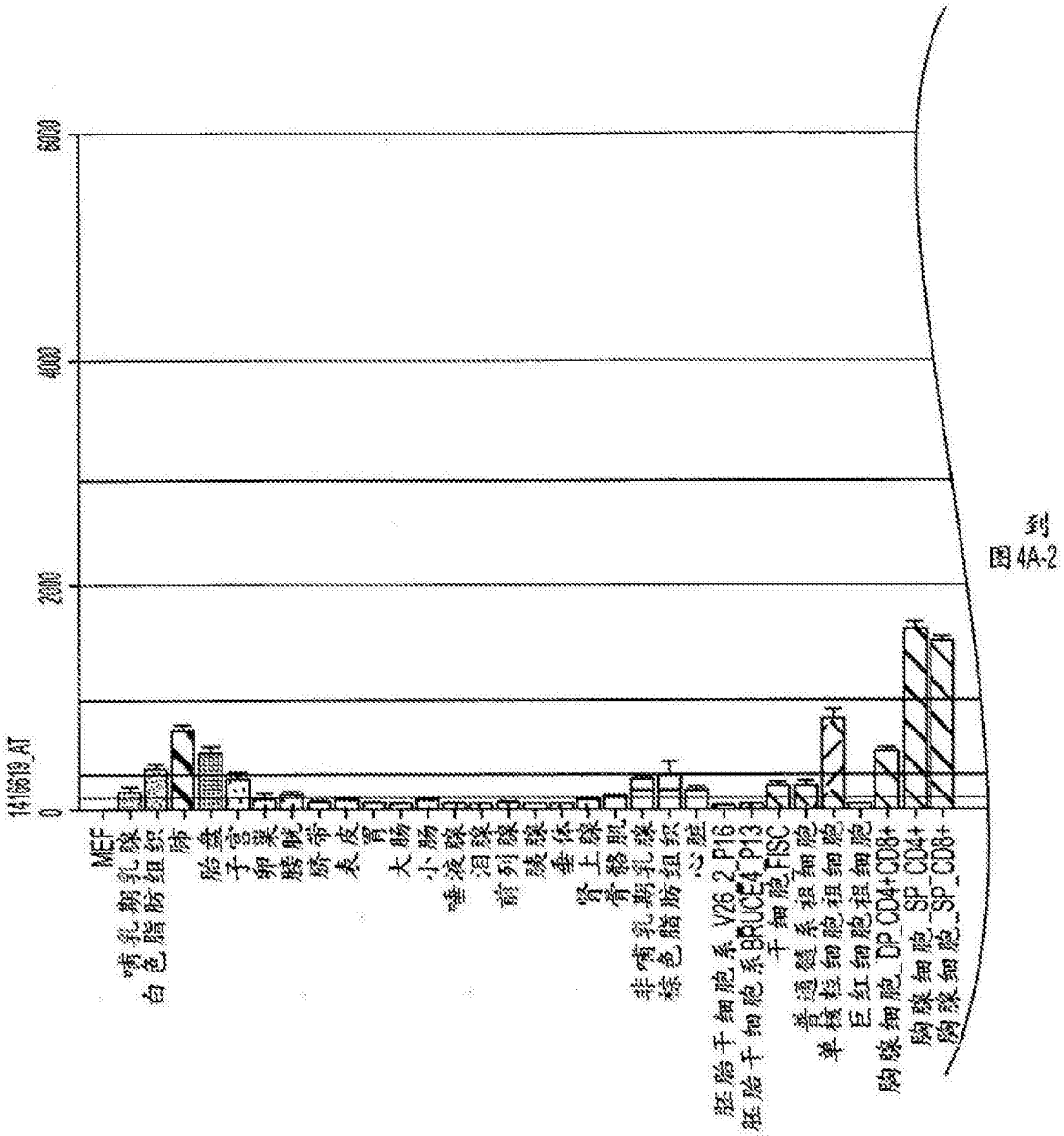

CD4+T细胞
CD11b+DCs
CD11bhi单核细胞
CD11bint单核细胞
最大%
外周淋巴结
肠系膜淋巴结
同种型
血液
腹腔细胞
脾

图3G


8000
4000
2000
0
141668_AT
MEF
哺乳期乳腺
白色脂肪组织
肺
胎盘
子宫
卵巢
膀胱
肠
皮肤
大肠
小肠
唾液腺
泪腺
前列腺
睾丸
肾上腺
骨骼肌
非哺乳期乳腺
棕色脂肪组织
心脏
胚胎干细胞系_V26.2_P16
胚胎干细胞系BRUCE4_P13
干细胞_FISC
普通髓系祖细胞
单核祖细胞祖细胞
巨红细胞祖细胞
胸腺细胞_DP_CD4+CD8+
胸腺细胞_SP_CD4+
胸腺细胞_SP_CD8+

续
图4A-2

图4A-1

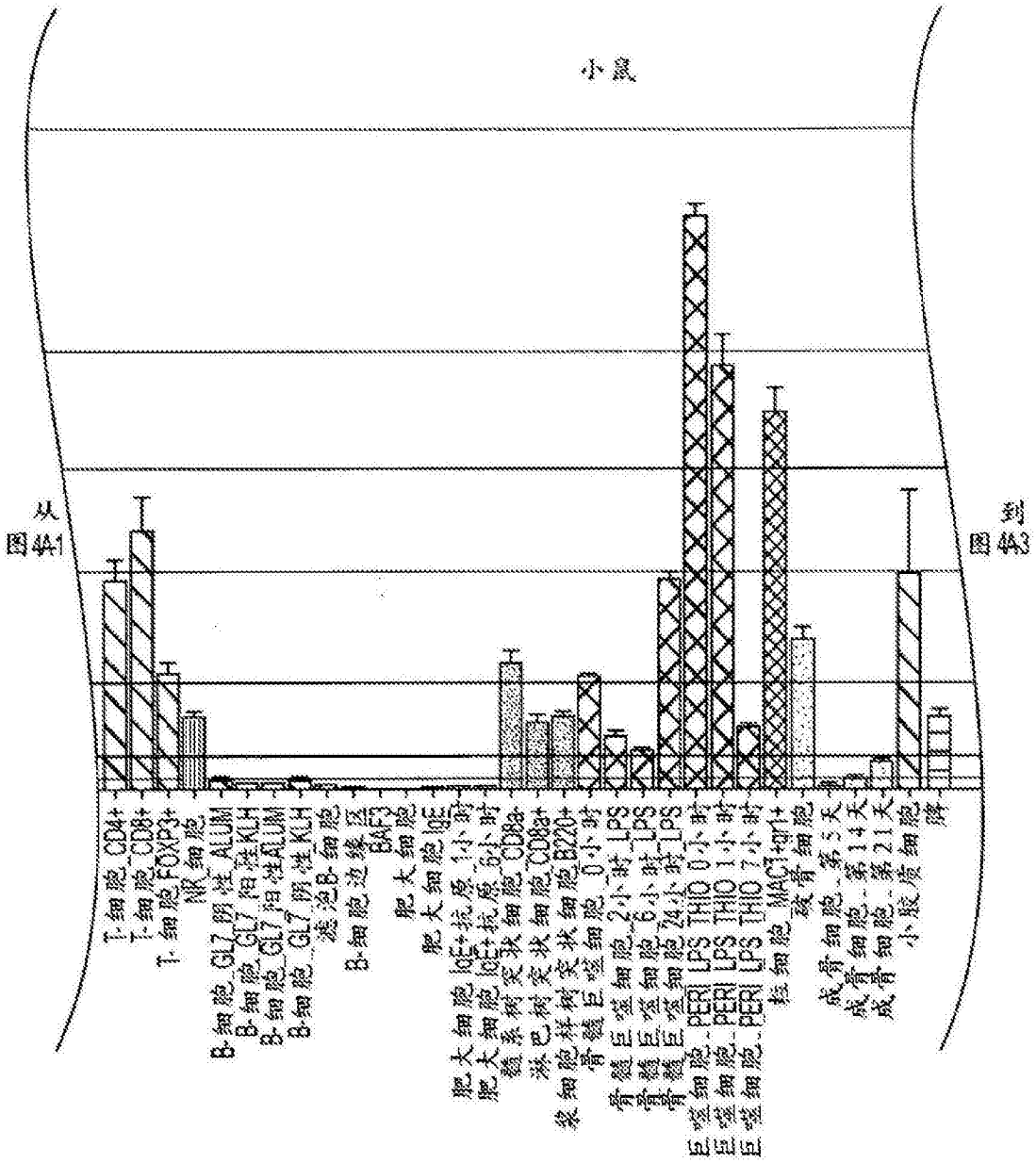

小鼠
从
图4A1
到
图4A3
T-细胞_CD4+
T-细胞_CD8+
T-细胞FOXP3+
NK细胞
B-细胞_GL7阴性_ALUM
B-细胞_GL7阳性KLH
B-细胞_GL7阳性ALUM
B-细胞_GL7阴性KLH
滤泡B-细胞
B-细胞边缘区
BAFF
肥大细胞
肥大细胞IgE
IgE+抗原_6小时
肥大细胞_IgE+抗原_6小时
髓系树突状细胞_CD8a-
浆细胞样树突状细胞_CD8a+
浆细胞样树突状细胞_B220+
骨髓巨噬细胞_0小时
骨髓巨噬细胞_2小时_LPS
骨髓巨噬细胞_6小时_LPS
骨髓巨噬细胞_24小时_LPS
巨噬细胞_PERI LPS THIO 0小时
巨噬细胞_PERI LPS THIO 1小时
巨噬细胞_PERI LPS THIO 7小时
粒细胞_MAC1+GR1+
成骨细胞
成骨细胞_第3天
成骨细胞_第14天
成骨细胞_第21天
小鼠皮肤细胞
脾

图4A-2

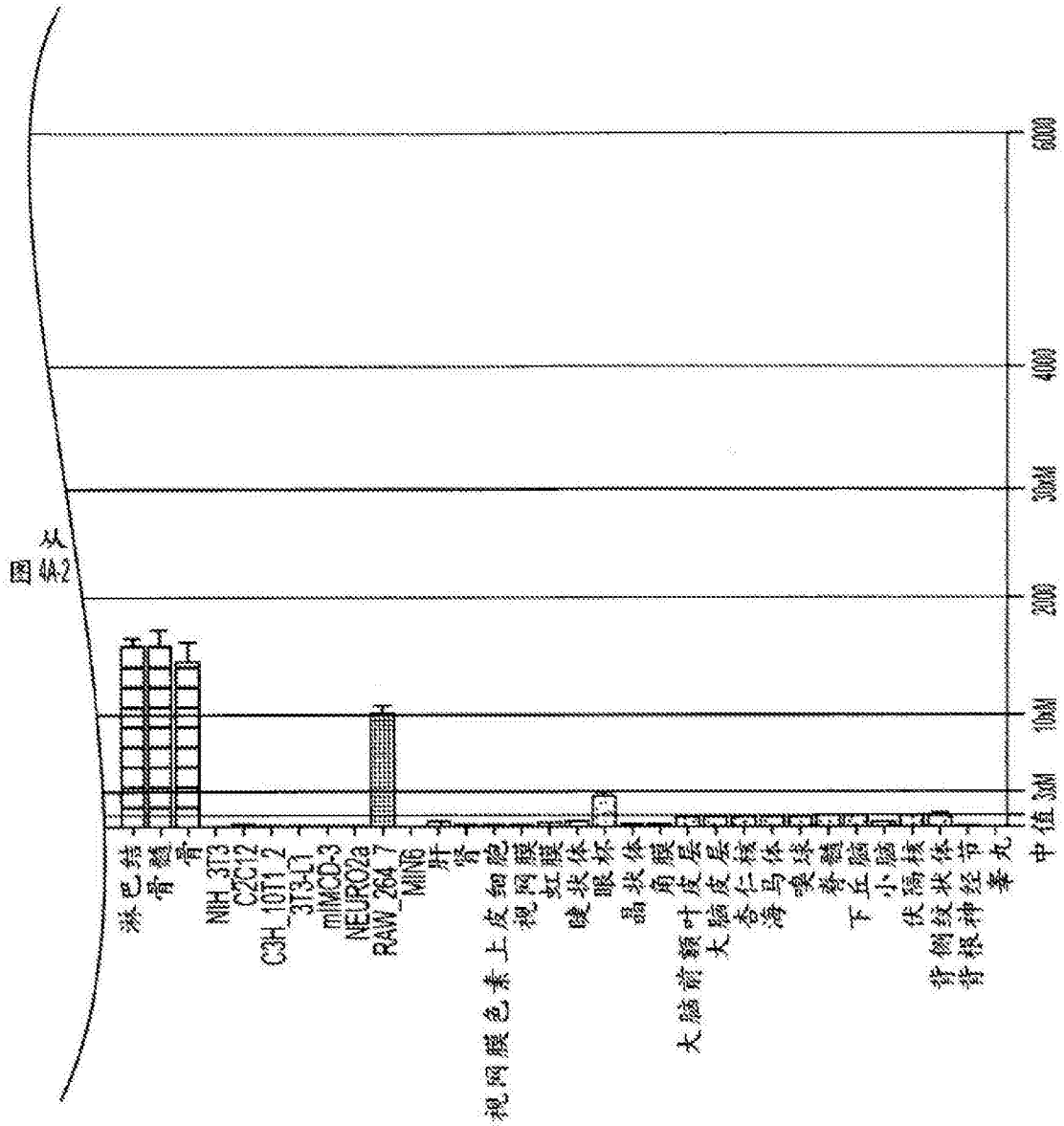

从
图4A-2
6000
4000
3000
2000
1000
300
100
中值
淋巴结
胃癌
骨
NIH_3T3
C2C12
C3H_10T1/2
3T3-L1
mMCD-3
MEURO2a
RAW_264.7
MMM6
肝
管
视网膜色素上皮细胞
视网膜
虹膜
睫状体
眼球
晶状体
角膜
大脑前额叶皮质
大脑皮质
杏仁体
海马
丘脑
下丘脑
小脑核
纹状体
背侧纹状体
脊髓神经节
睾丸

图4A-3

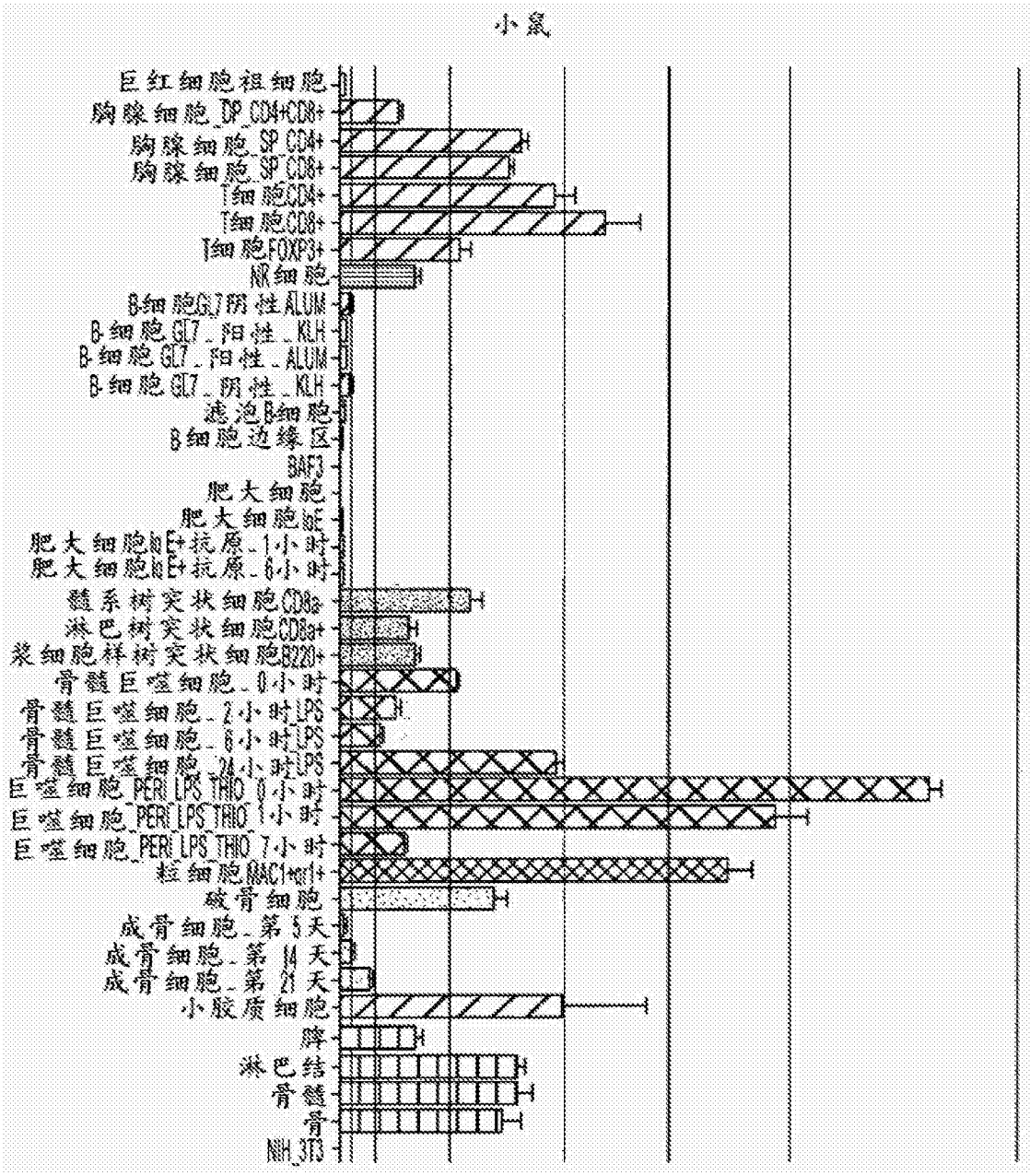

小鼠
巨红细胞祖细胞
胸腺细胞_DP_CD4+CD8+
胸腺细胞_SP_CD4+
胸腺细胞_SP_CD8+
T细胞CD4+
T细胞CD8+
T细胞FOXP3+
NK细胞
B细胞GL7阴性ALUM
B细胞_GL7_阳性_KLH
B细胞_GL7_阳性_ALUM
B细胞_GL7_阴性_KLH
滤泡B细胞
B细胞边缘区
BAFF
肥大细胞
肥大细胞_BE
肥大细胞_BE+抗原_1小时
肥大细胞_BE+抗原_6小时
髓系树突状细胞_CD8a-
淋巴树突状细胞_CD8a+
浆细胞样树突状细胞_B220+
骨髓巨噬细胞_0小时
骨髓巨噬细胞_2小时_LPS
骨髓巨噬细胞_6小时_LPS
骨髓巨噬细胞_24小时_LPS
巨噬细胞_PERI_LPS_THIO_0小时
巨噬细胞_PERI_LPS_THIO_1小时
巨噬细胞_PERI_LPS_THIO_7小时
粒细胞_MAC1+GR1+
破骨细胞
成骨细胞_第5天
成骨细胞_第14天
成骨细胞_第21天
小胶质细胞
脾
淋巴结
骨髓
骨
NIH_3T3

图4B

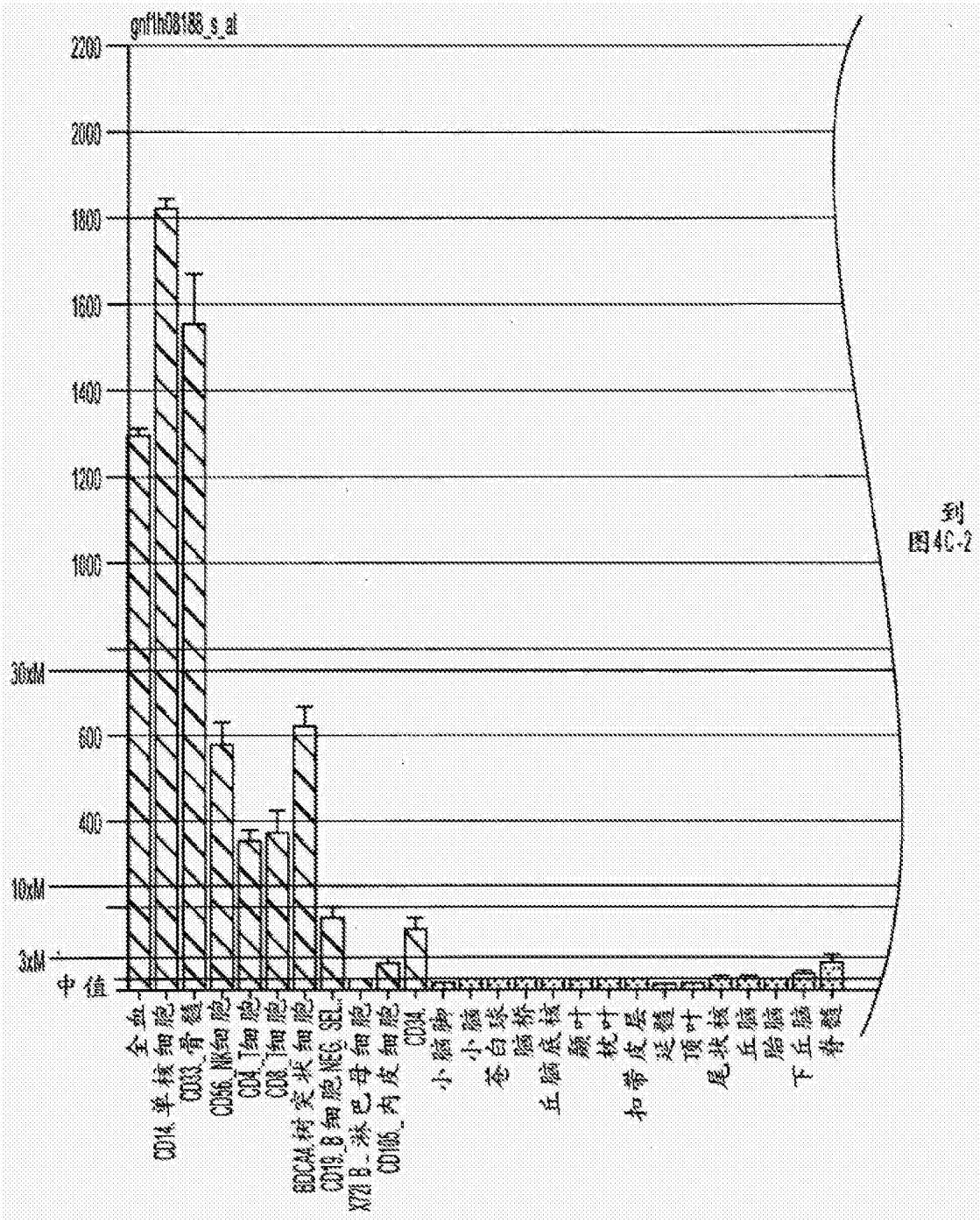

gnf1h03888_s_at
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
400
10xM
3xM
中值
全血
CD14_单核细胞
CD33_骨髓
CD56_NK细胞
CD4_T细胞
CD8_T细胞
BDCA4_树突状细胞
CD19_B细胞
MEG_巨核细胞
XZB_淋巴母细胞
CD105_内皮细胞
CD34_
小脑
小脑胎
苍白球
脑桥
丘脑底核
颞叶
枕叶
扣带皮质
运动皮质
顶叶
尾状核
丘脑
胎脑
下丘脑
脊髓

图4C-1

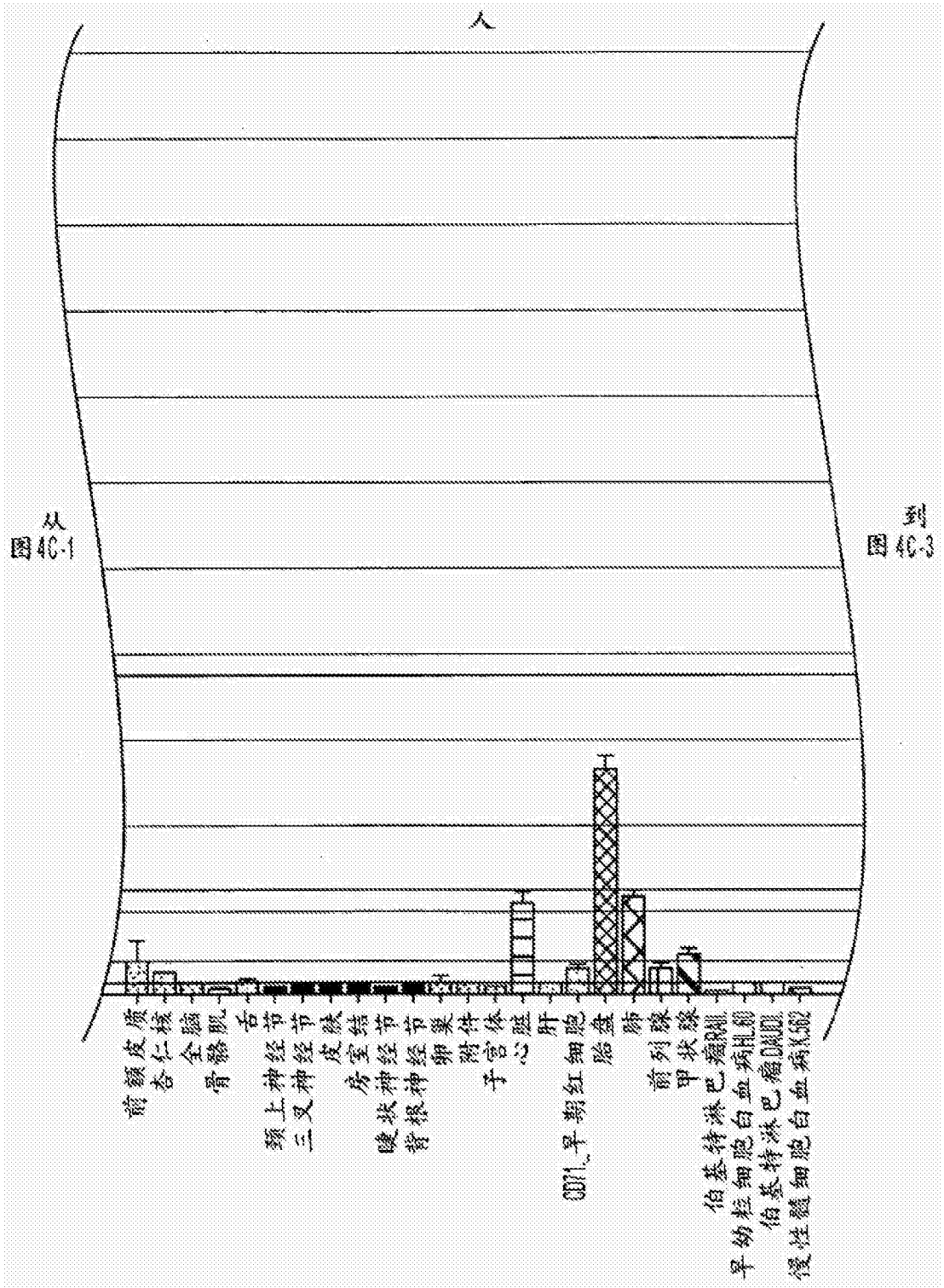

人
从
图4C-1
到
图4C-3
前额皮质
杏仁核
全脑
胃肠肌
舌节
颈上神经节
三叉神经节
皮质
肩关节
腰块神经节
背根神经
附件
子宫
肝
CD71_早期红细胞
胎盘
肺
前列腺
甲状腺
伯基特淋巴瘤BL
早幼粒细胞白血病HL60
伯基特淋巴瘤DAUDI
慢性髓细胞白血病K562

图4C-2

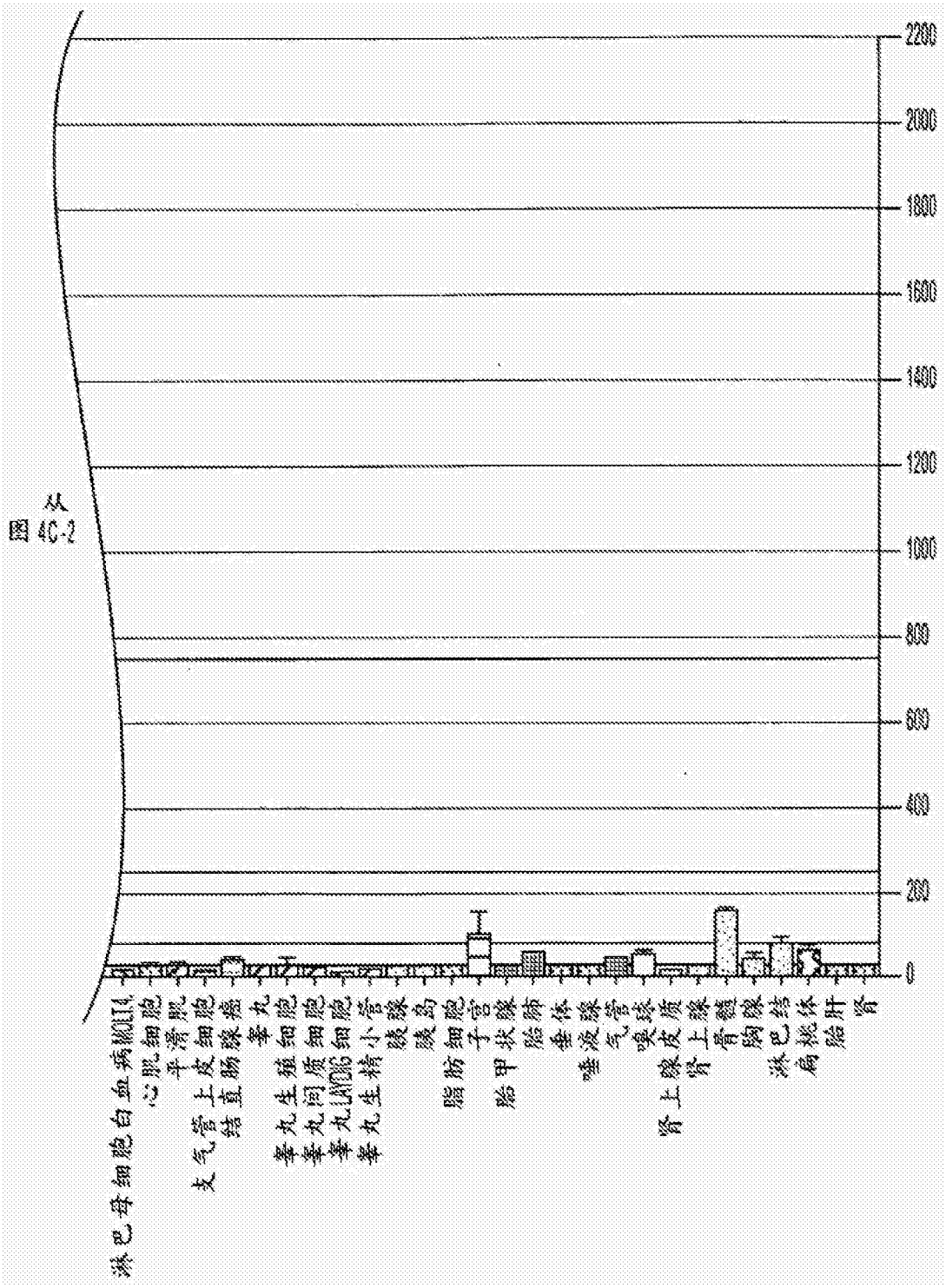

2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
慢性粒细胞白血病(CML)
心肌细胞
平滑肌
支气管上皮细胞
结直肠腺癌
睾丸
睾丸生殖细胞
睾丸间质细胞
睾丸LMDS细胞
睾丸生精小管腺
腺肋
脂肪细胞
子宫腺
胎甲状腺
胎肺
垂体
唾液管
支气管软骨
肾上腺皮质腺
肾上腺髓质
胸腺
淋巴结
角膜
胎肝
肾

图4C-3

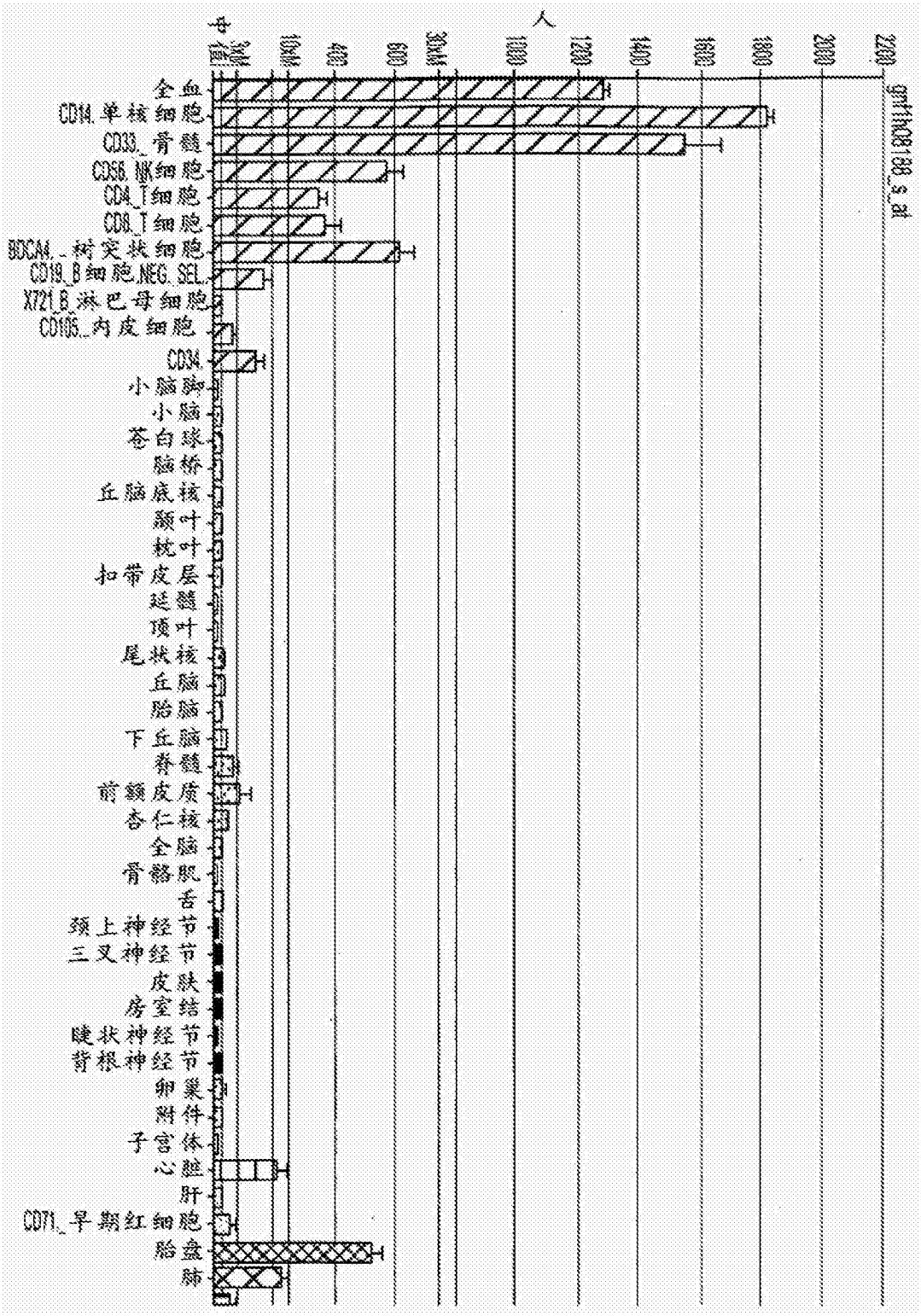

母
人
gnf1h08188_s_at
全血
CD14_单核细胞
CD33_骨髓
CD56_NK细胞
CD4_T细胞
CD8_T细胞
BDCA4_树突状细胞
CD19_B细胞_MEG_SEL
X721_B_淋巴母细胞
CD105_内皮细胞
CD34
小脑脚
小脑
苍白球
脑桥
丘脑底核
颞叶
枕叶
扣带皮层
延髓
顶叶
尾状核
丘脑
胎脑
下丘脑
脊髓
前额皮质
杏仁核
全脑
骨骼肌
舌
颈上神经节
三叉神经节
皮肤
房室结
楔状神经节
背根神经节
卵巢
附件
子宫体
心脏
肝
CD71_早期红细胞
胎盘
肺

图4D

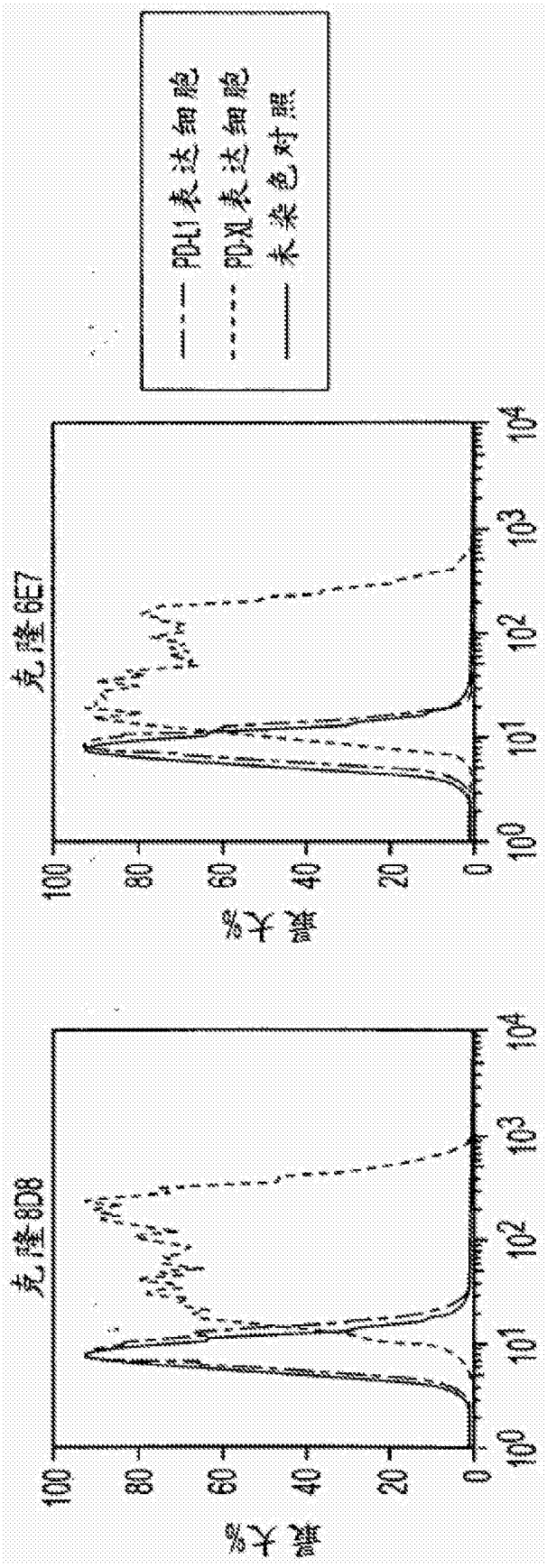

克隆6D8
克隆6E7
PD-L1表达细胞
PD-L2表达细胞
未染色对照
数目%
0
20
40
60
80
100
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

图5

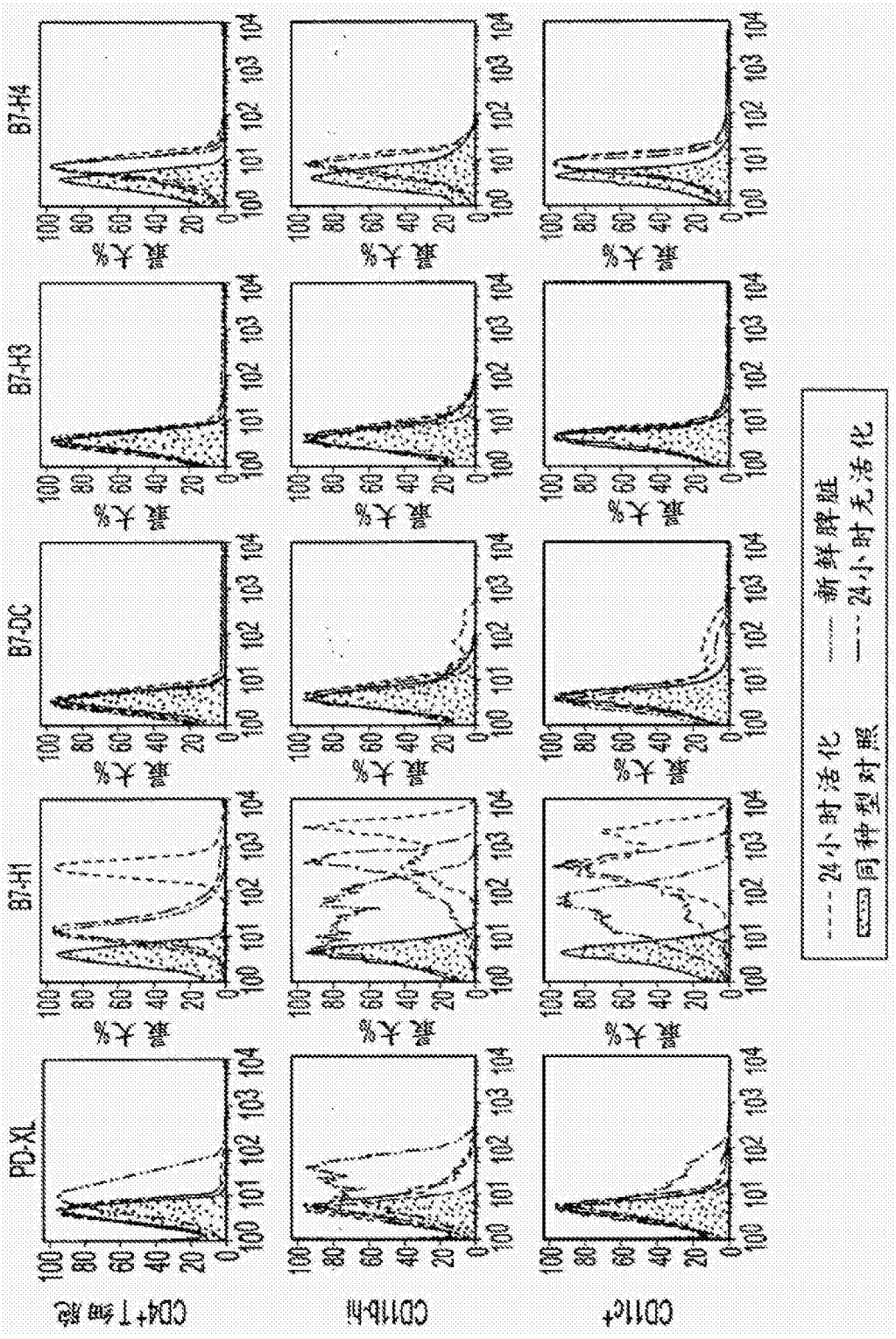

PD-XL
B7-H1
B7-DC
B7-H3
B7-H4
CD4+T细胞
CD11b+
CD11c+
数目%
24小时活化
新鲜脾脏
同种型对照
24小时无活化

图6

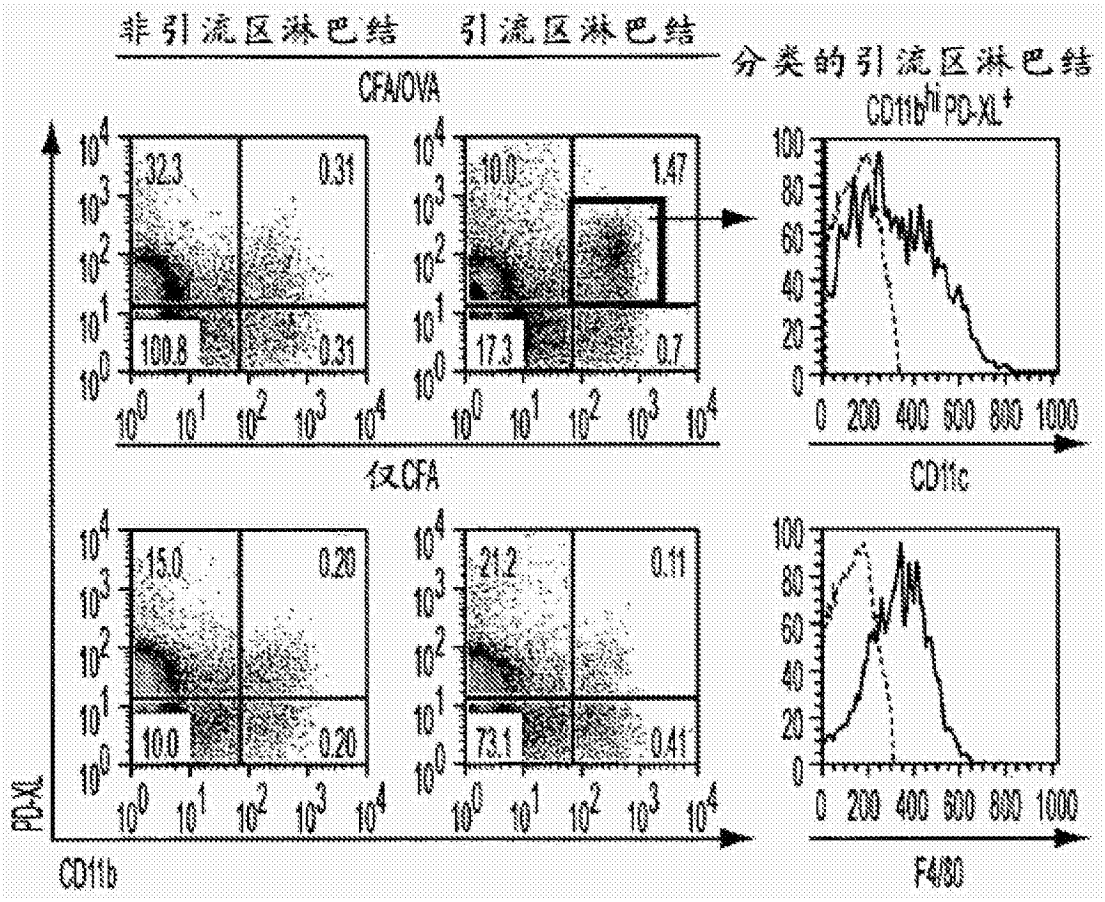

非引流区淋巴结
引流区淋巴结
分类的引流区淋巴结
CFA/OVA
仅CFA
32.3
0.31
100.8
0.31
10.0
1.47
17.3
0.7
15.0
0.20
10.0
0.20
21.2
0.11
73.1
0.41
CD11b^hi PD-XL+
PD-XL
CD11b
CD11c
F4/80

图7A

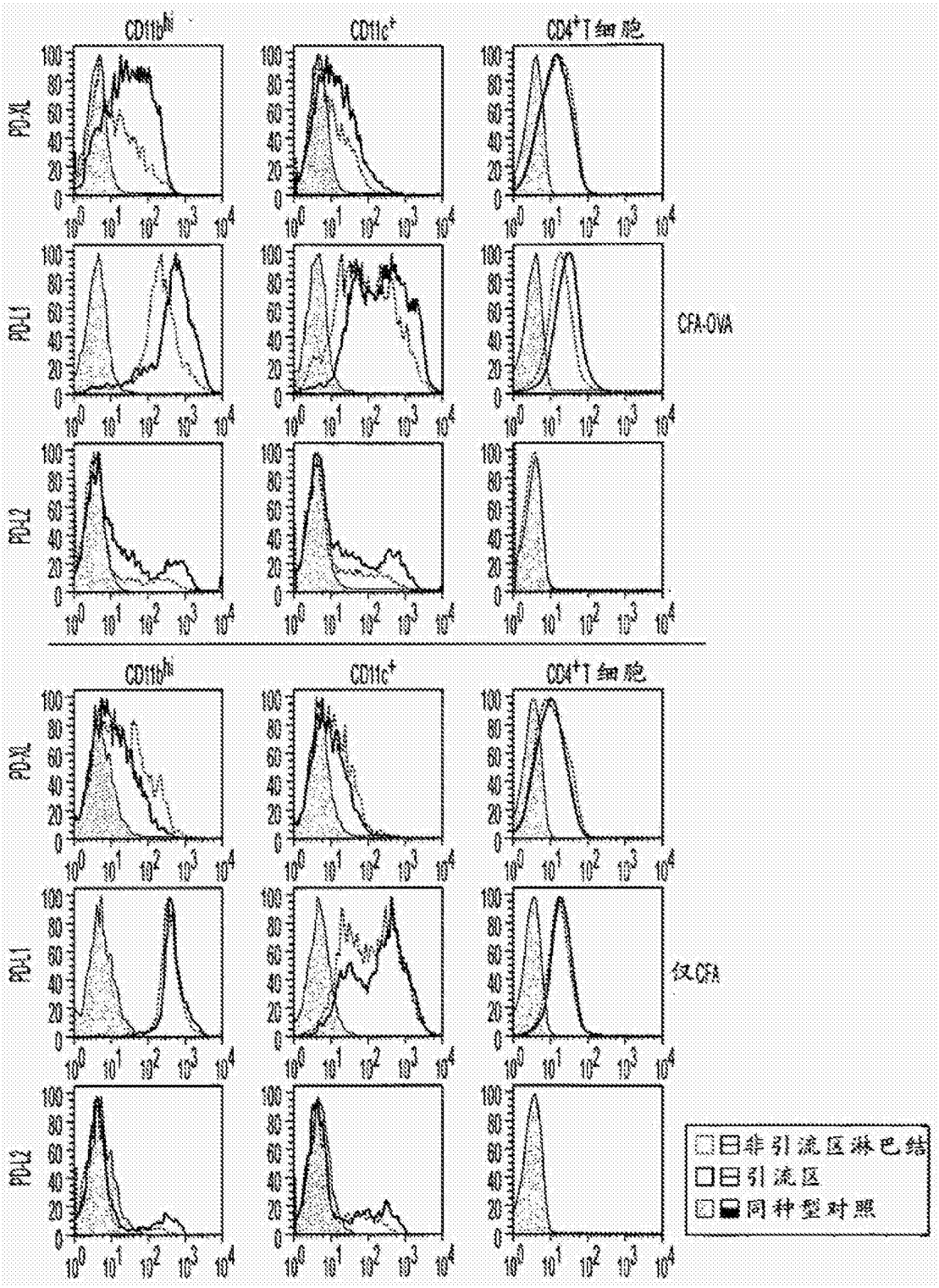


图7B

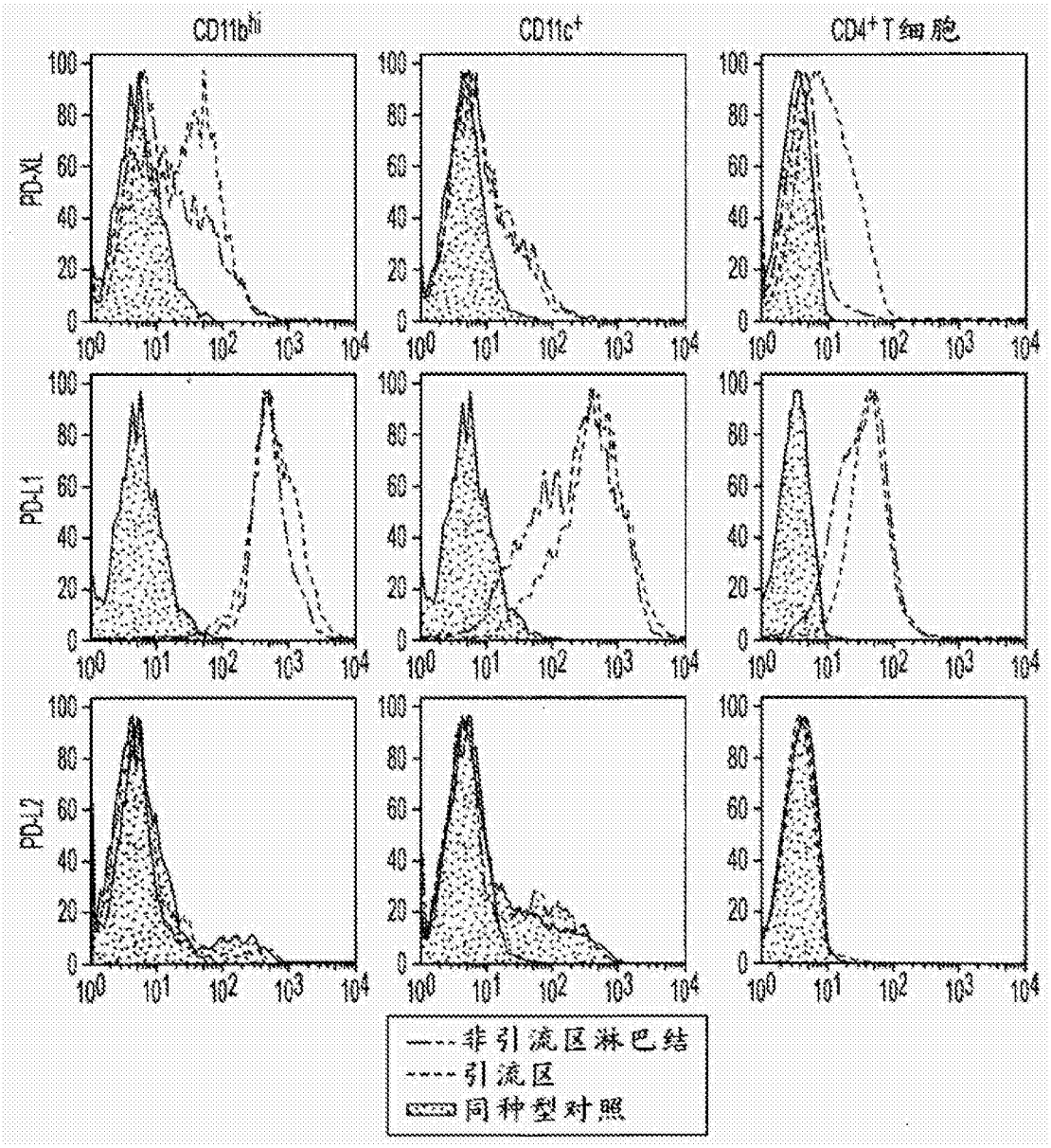


图8

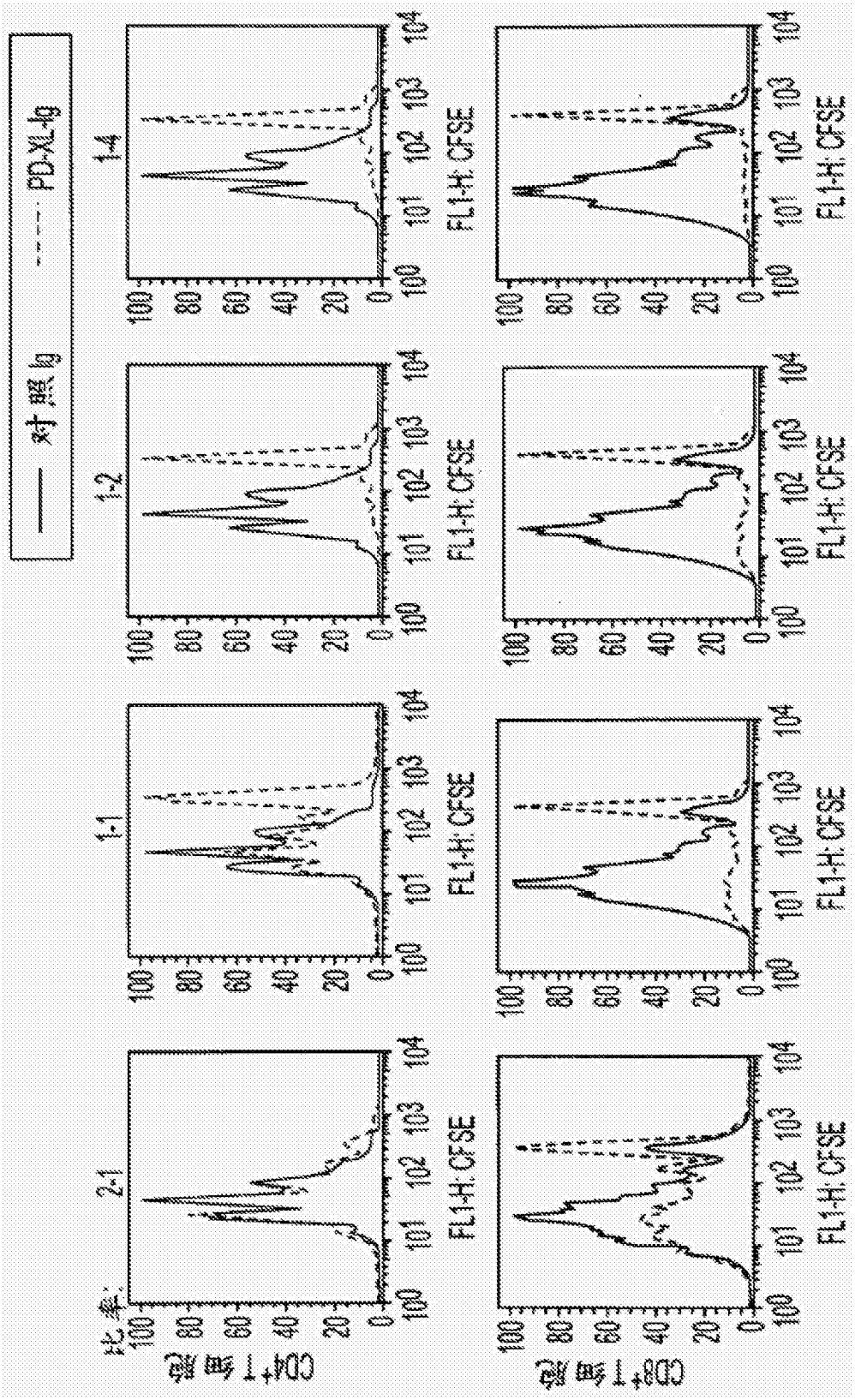


图9A

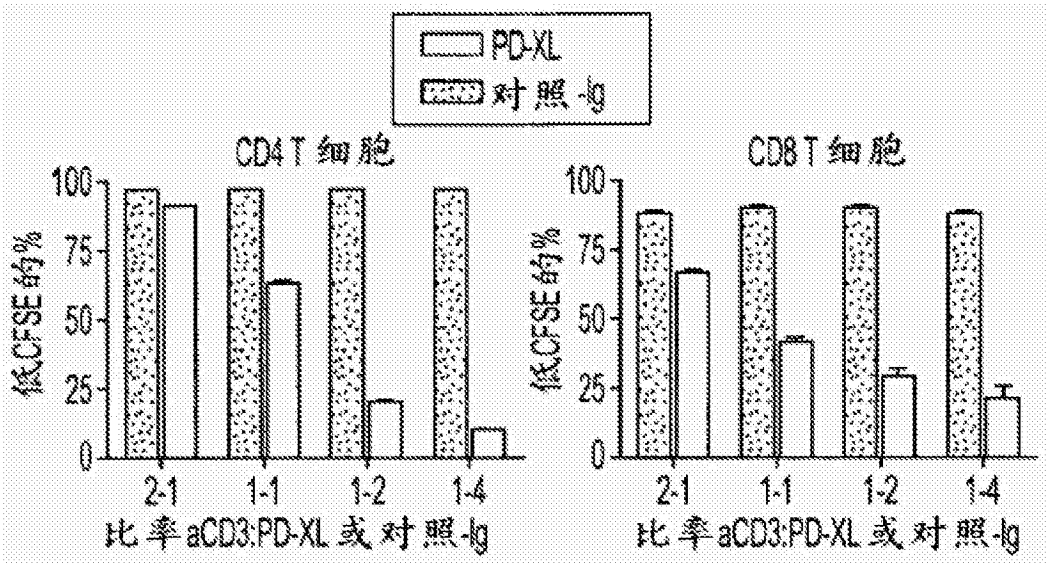

PD-XL
对照-Ig
CD4 T 细胞
CD8 T 细胞
低CFSE的%
100
75
50
25
0
2-1
1-1
1-2
1-4
比率aCD3:PD-XL或对照-Ig

图9B

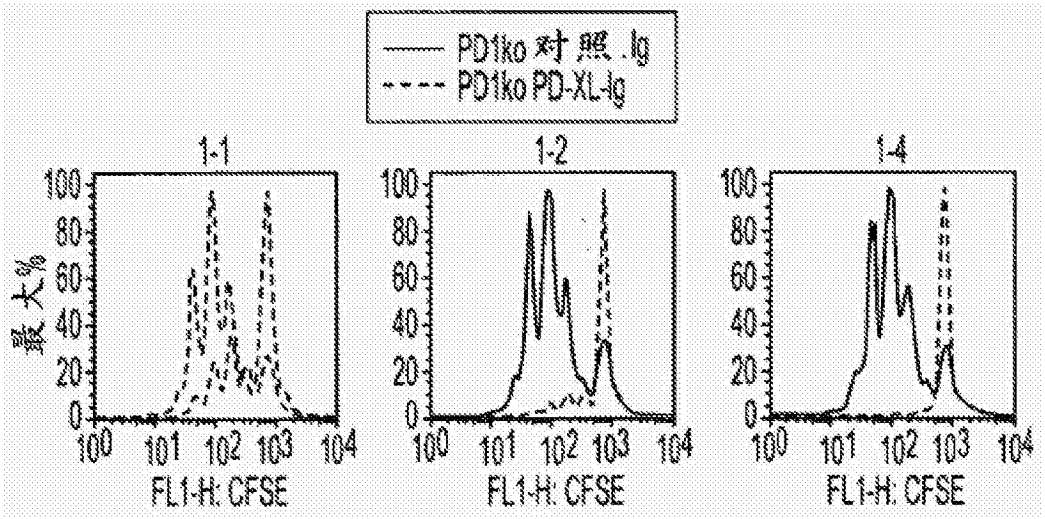

PD1ko对照.Ig
PD1ko PD-XL-Ig
1-1
1-2
1-4
最大%
100
80
60
40
20
0
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4
FL1-H: CFSE

图9C

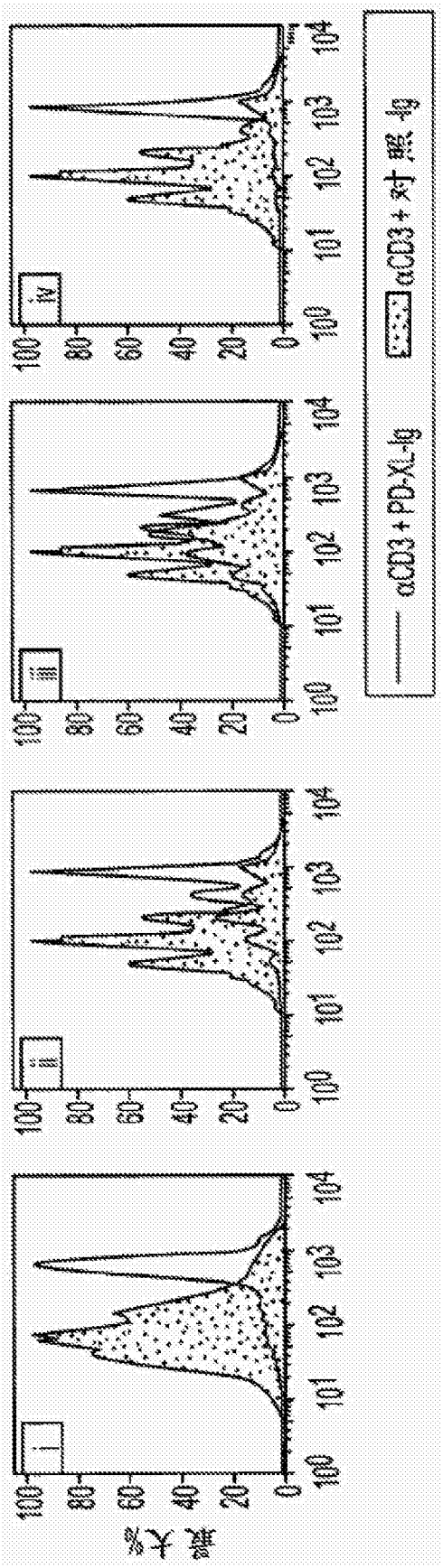

i
ii
iii
iv
αCD3 + PD-XL-Ig
αCD3 + 对照 Ig
数 人 %
FL1-H: CFSE

图9D

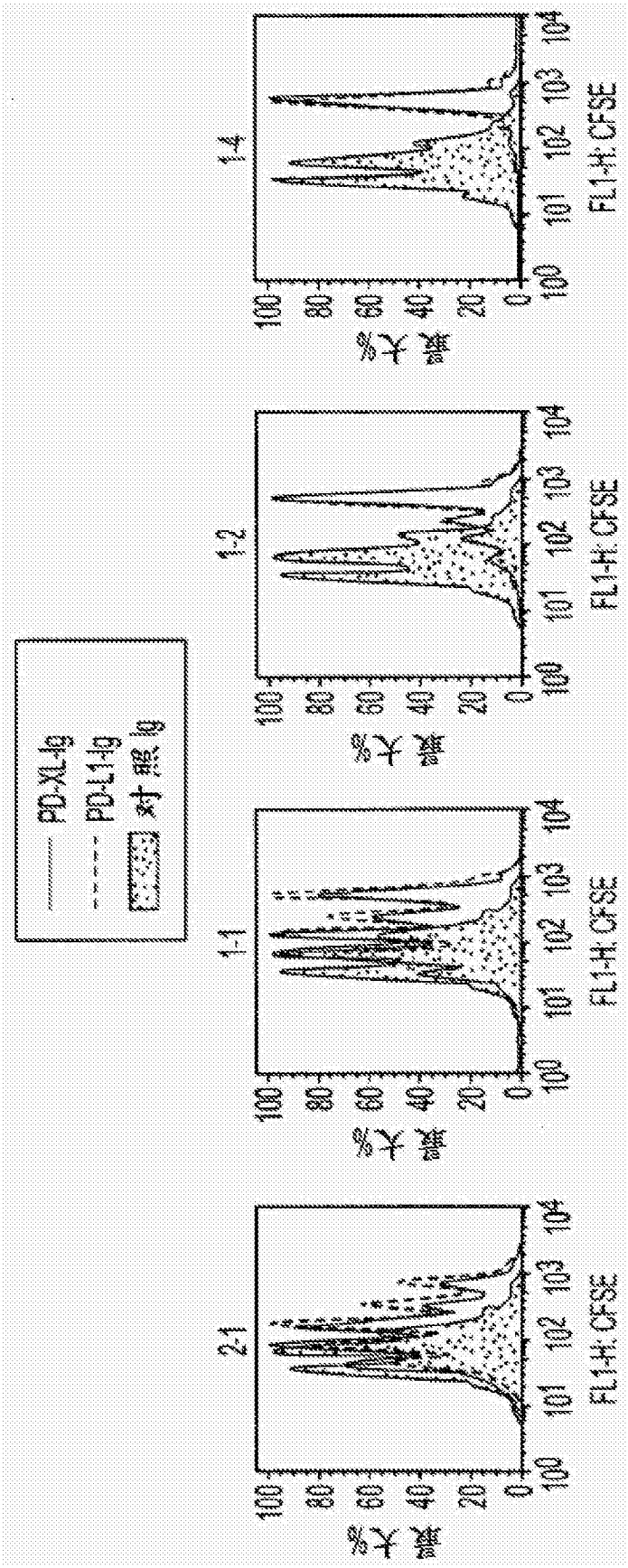

PD-XL-Ig
PD-L1-Ig
对照 Ig
1-1
1-2
1-4
2-1
数 人 %
FL1-H: CFSE

图10

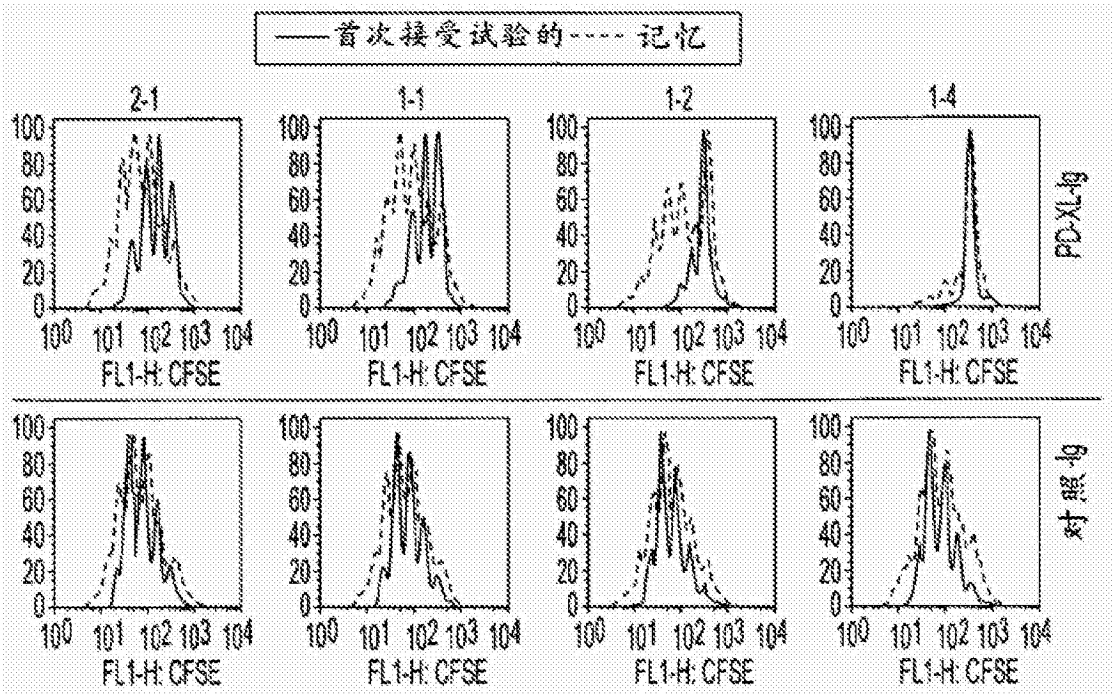

——首次接受试验的---- 记忆
2-1
1-1
1-2
1-4
PD-XL-Ig
对照-Ig
FL1-H: CFSE

图11A

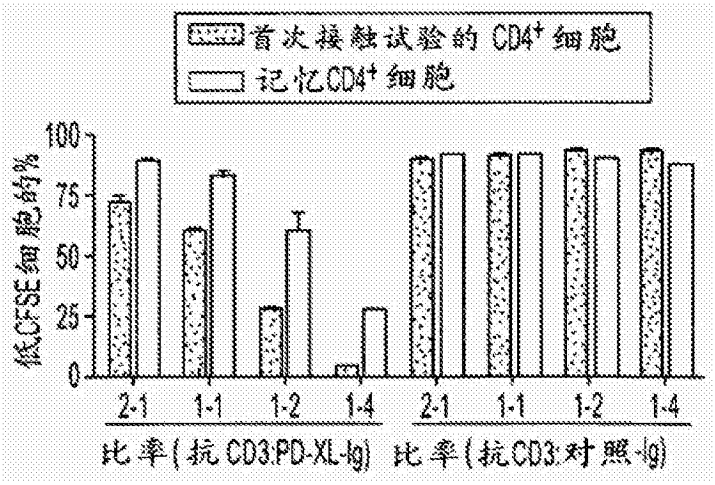

首次接触试验的 CD4+ 细胞
记忆CD4+ 细胞
低CFSE细胞的%
2-1
1-1
1-2
1-4
比率(抗 CD3:PD-XL-Ig)
比率(抗CD3:对照-Ig)

图11B

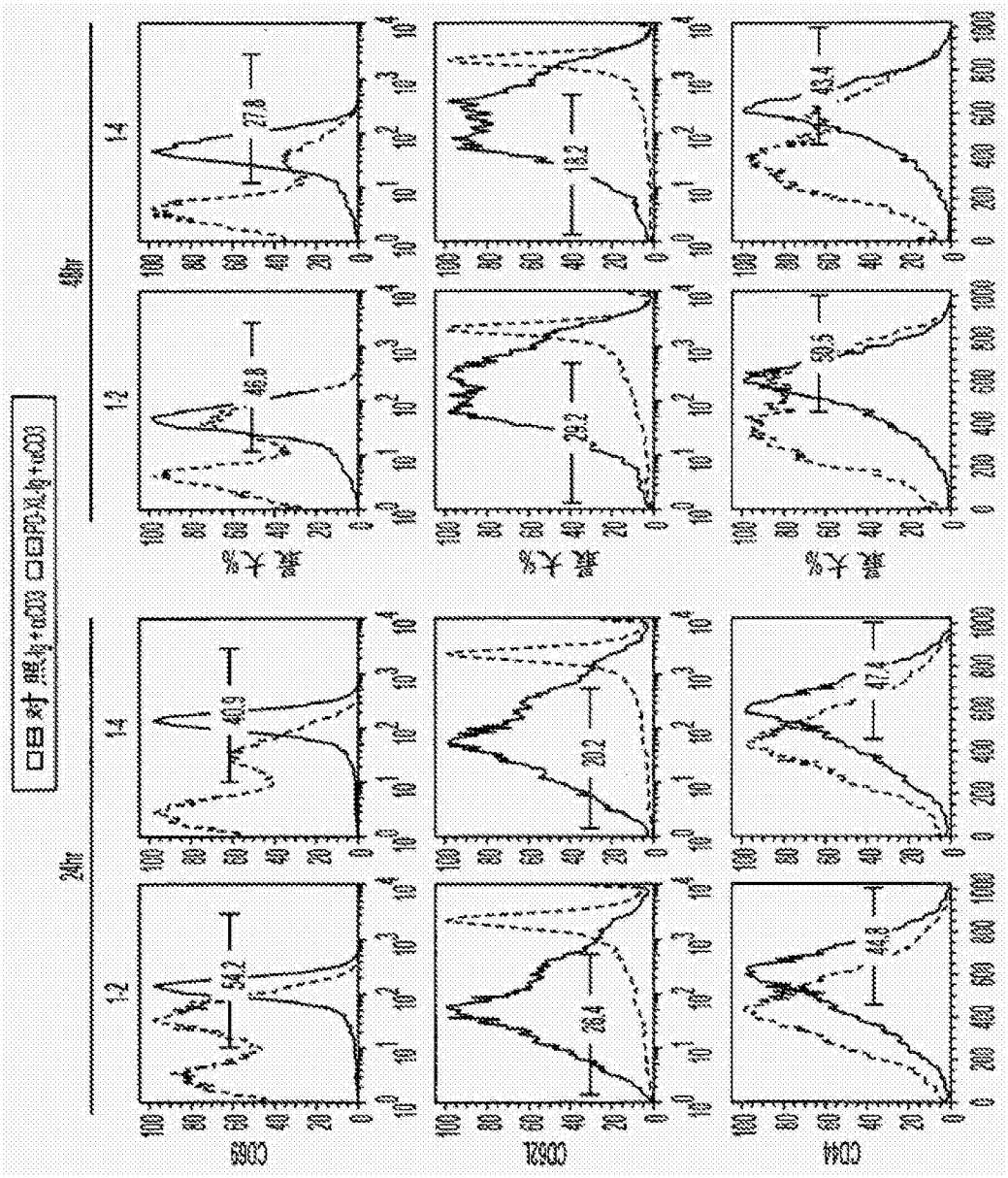

24hr
48hr
1:2
1:4
CD69
CD62L
CD44
氣大%
542
409
283.4
282.2
448
472
278
496.8
183.2
292.2
434
583

图12A

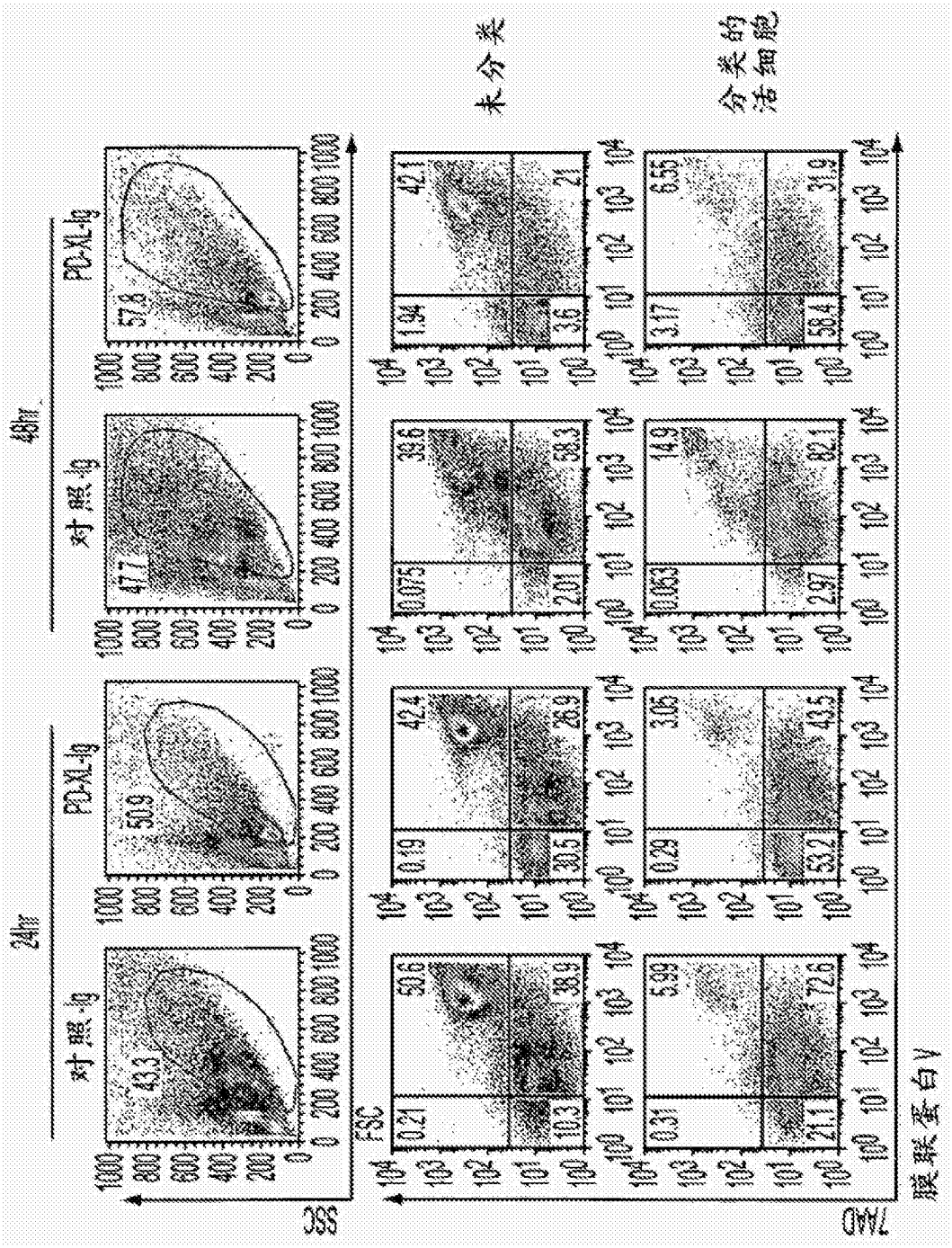

24hr
48hr
对照-Ig
PD-XL-Ig
对照-Ig
PD-XL-Ig
未分类
分类的活细胞
SSC
FSC
7AAD
膜联蛋白V

图12B

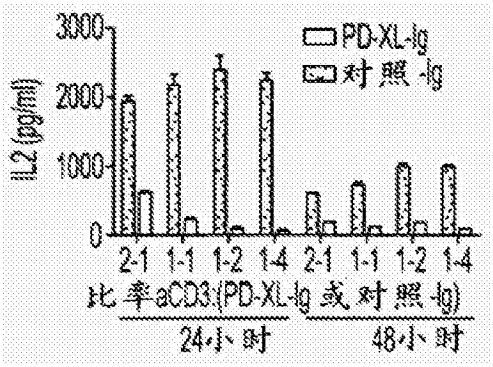


图13A

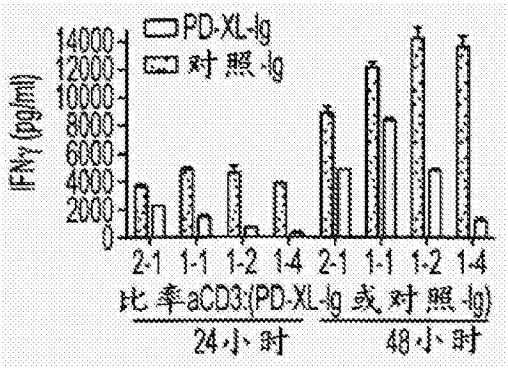


图13B

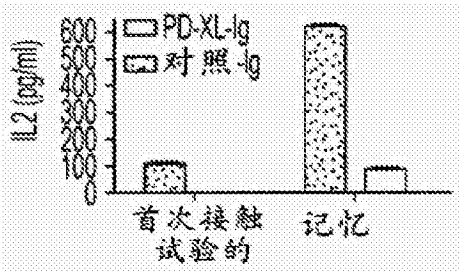


图13C

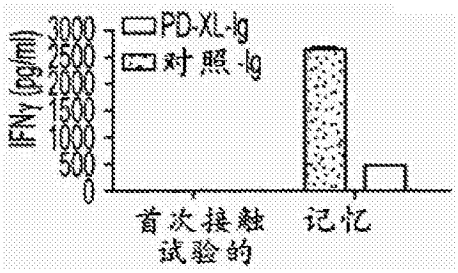


图13D

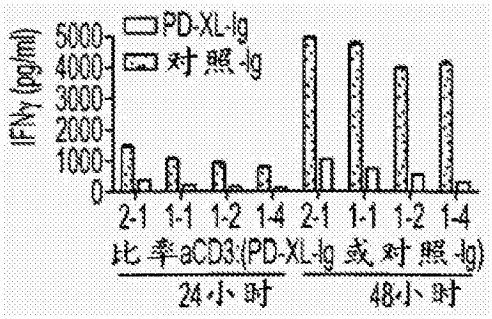


图13E

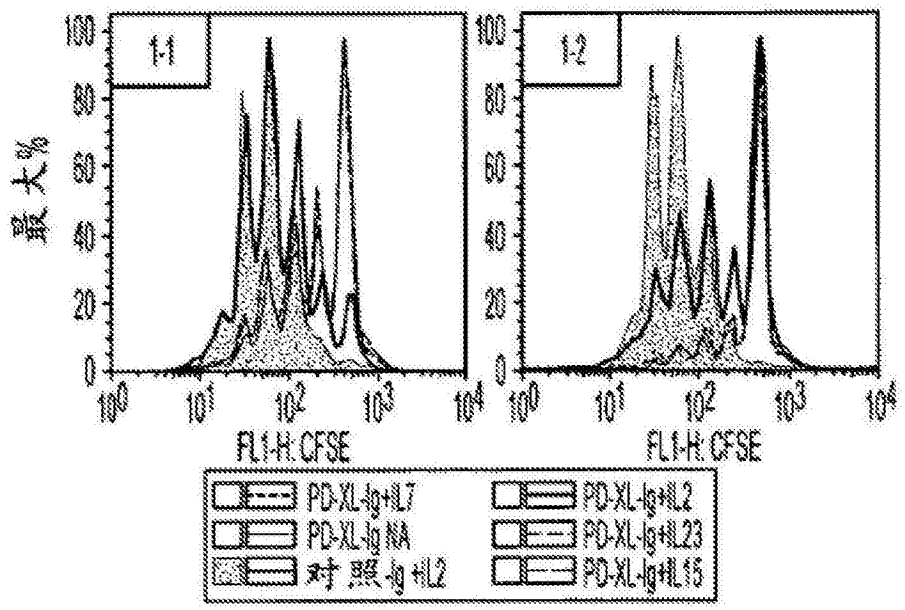

1-1
1-2
聚大%
FL1-H: CFSE
FL1-H: CFSE
PD-XL-Ig+IL7
PD-XL-Ig+IL2
PD-XL-Ig NA
PD-XL-Ig+IL23
对 照-Ig +IL2
PD-XL-Ig+IL15

图14A

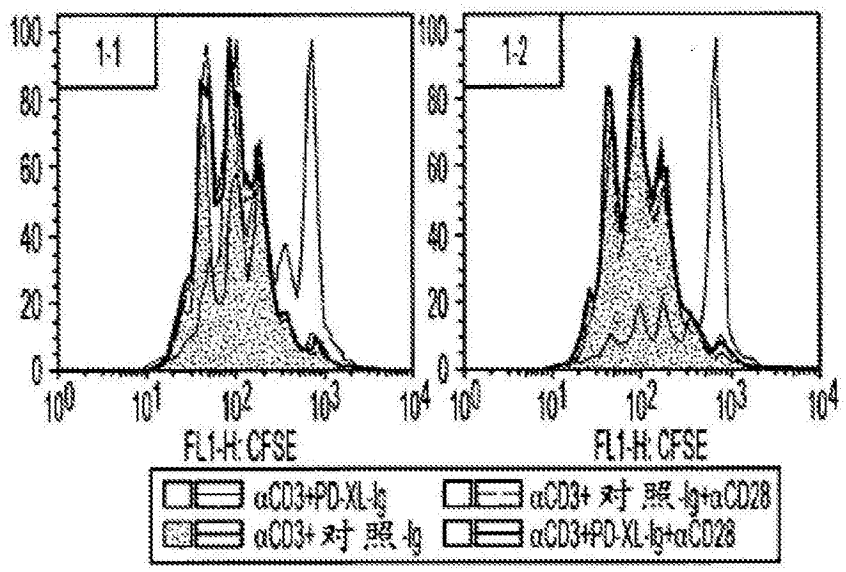

1-1
1-2
FL1-H: CFSE
FL1-H: CFSE
αCD3+PD-XL-Ig
αCD3+ 对 照-Ig+αCD28
αCD3+ 对 照-Ig
αCD3+PD-XL-Ig+αCD28

图14B

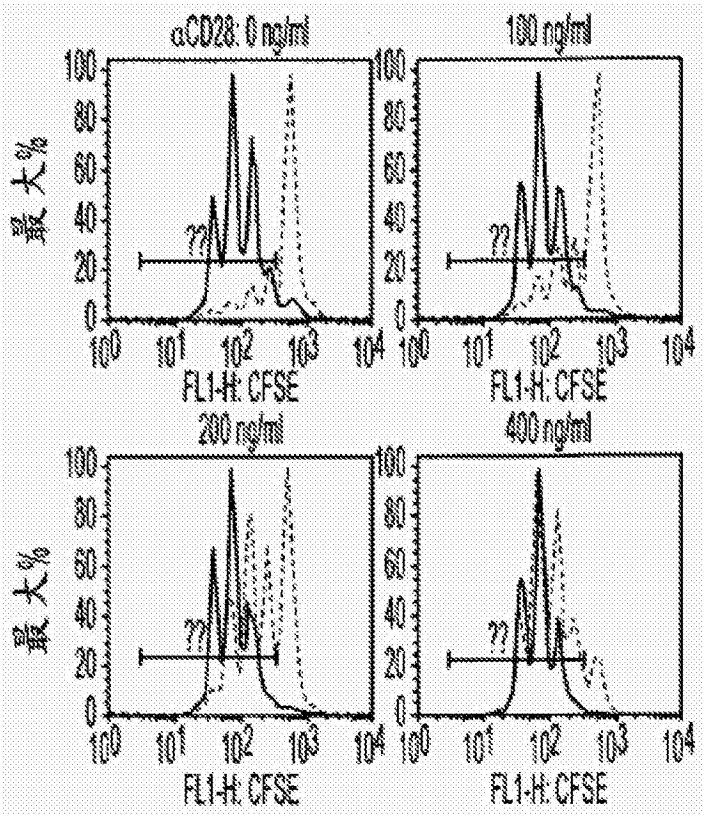

aCD28: 0 ng/ml
100 ng/ml
200 ng/ml
400 ng/ml
最大%
FL1-H: CFSE

图14C

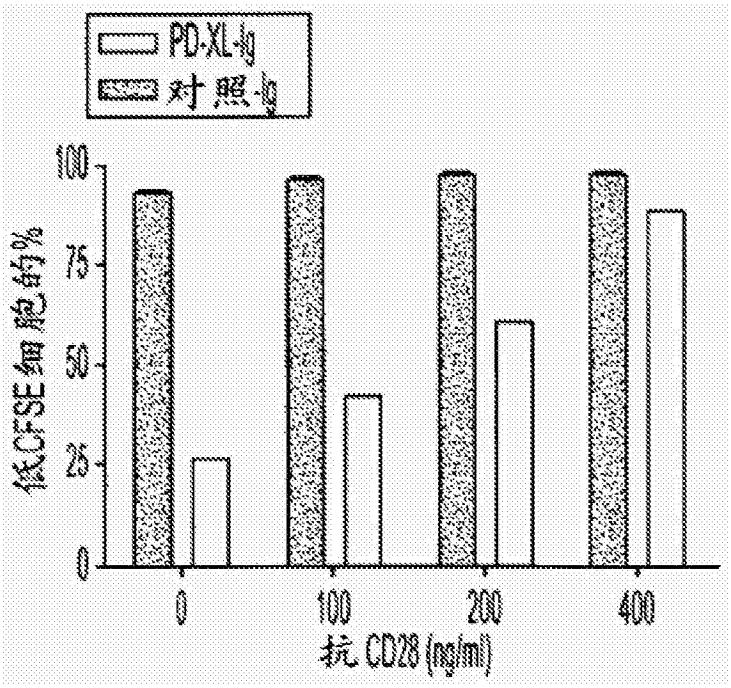

PD-XL-Ig
对照-Ig
依CFSE细胞的%
抗 CD28 (ng/ml)

图14D

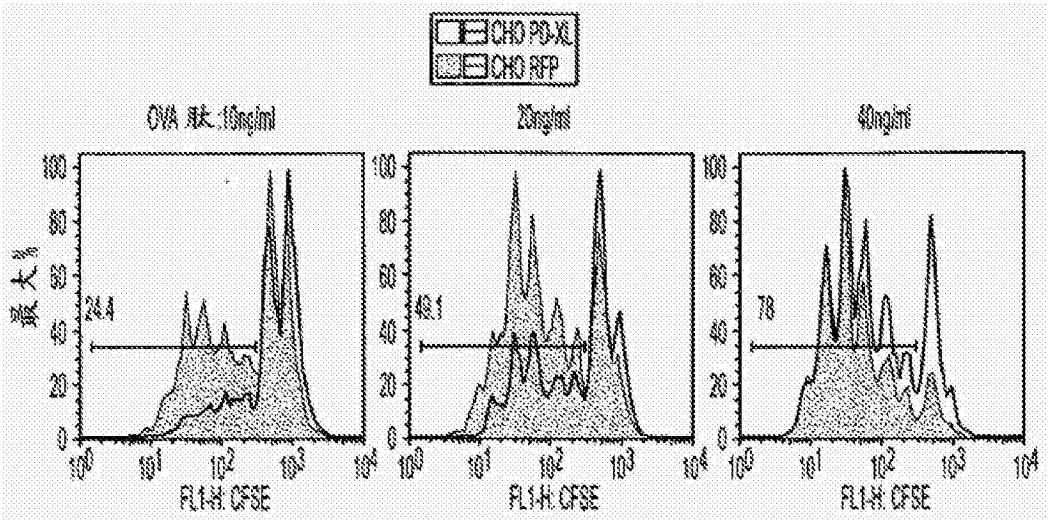


图15A

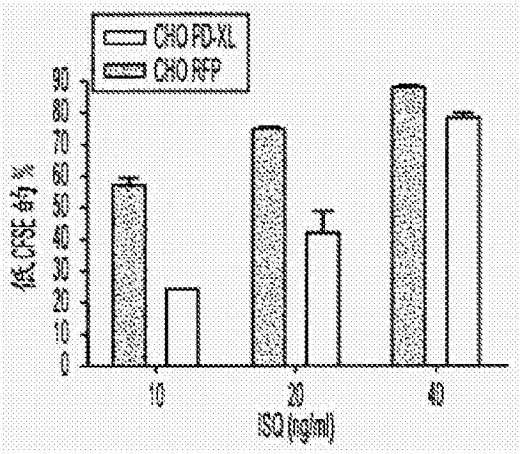


图15B

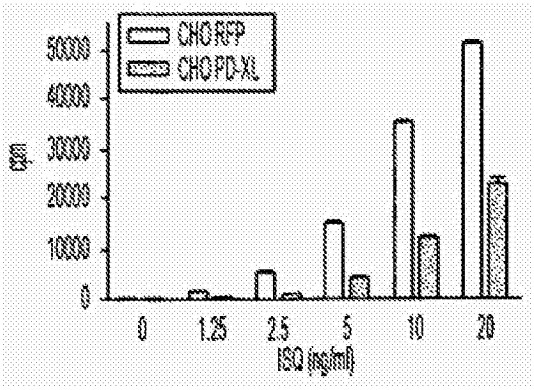


图15C

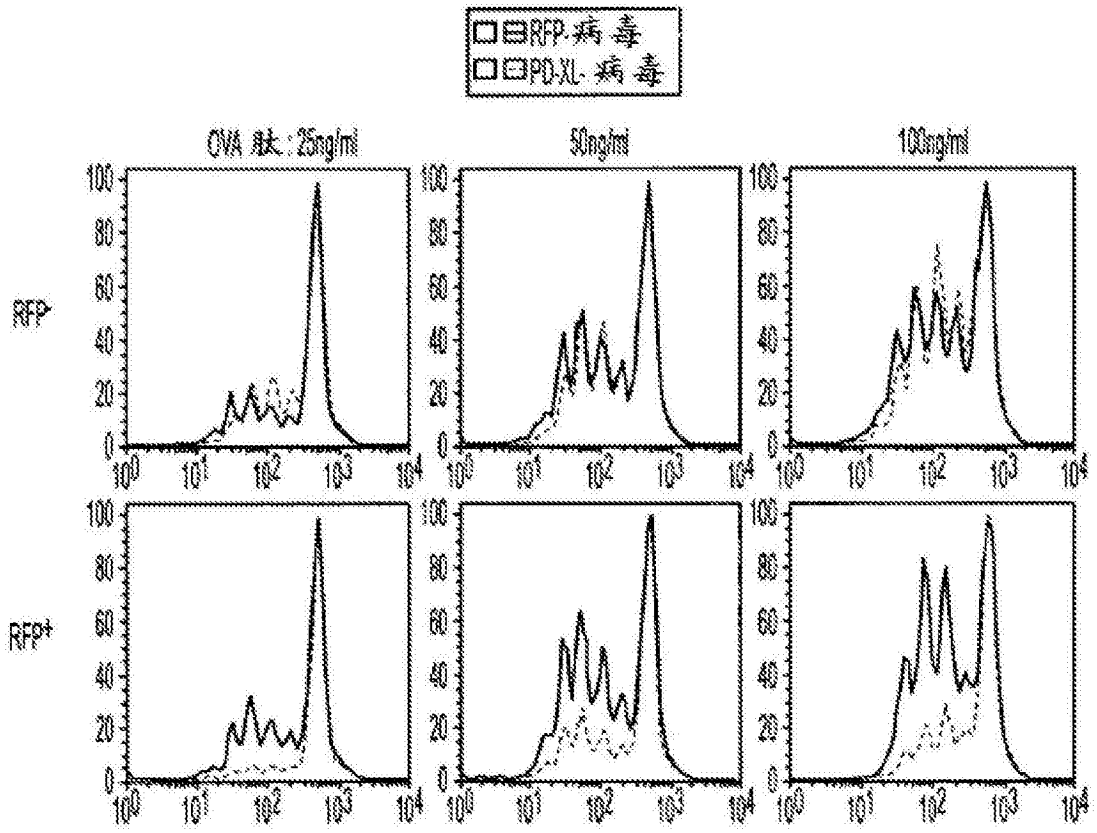


图15D

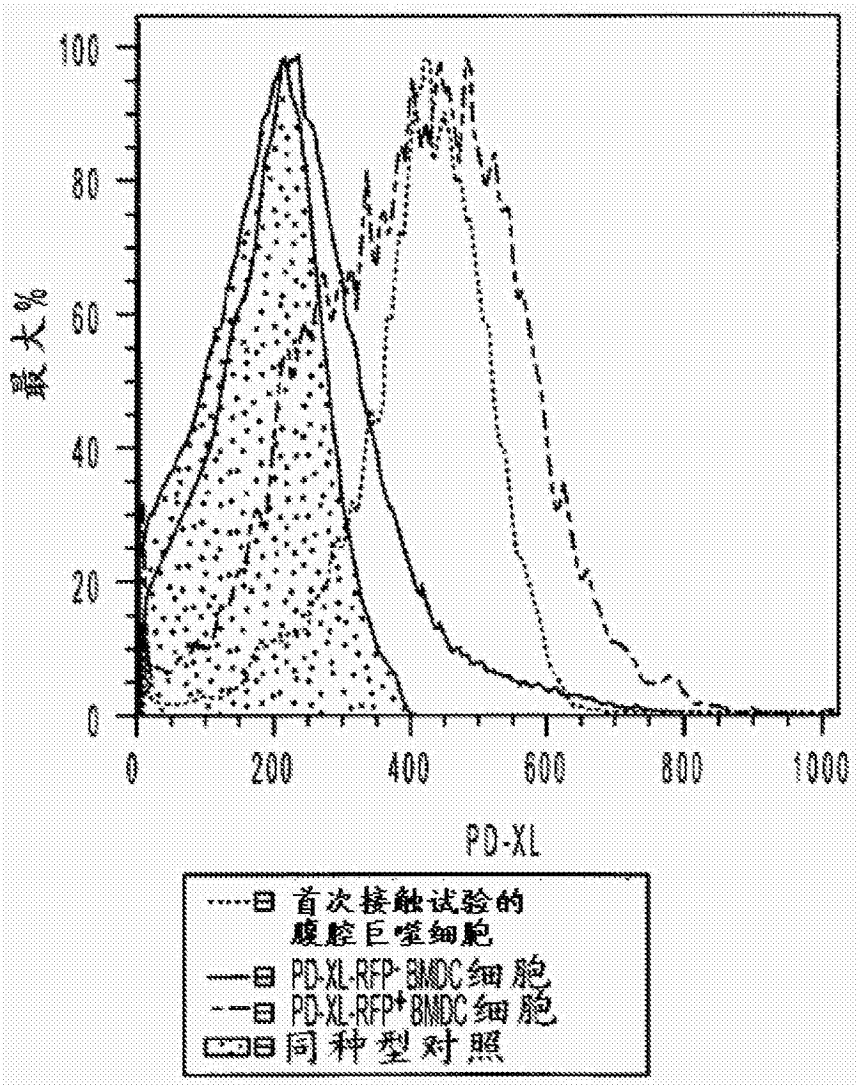

100
80
60
40
20
0
最大%
0
200
400
600
800
1000
PD-XL
首次接触试验的
腹腔巨噬细胞
PD-XL-RFP- BMDC细胞
PD-XL-RFP+ BMDC细胞
同种型对照

图16

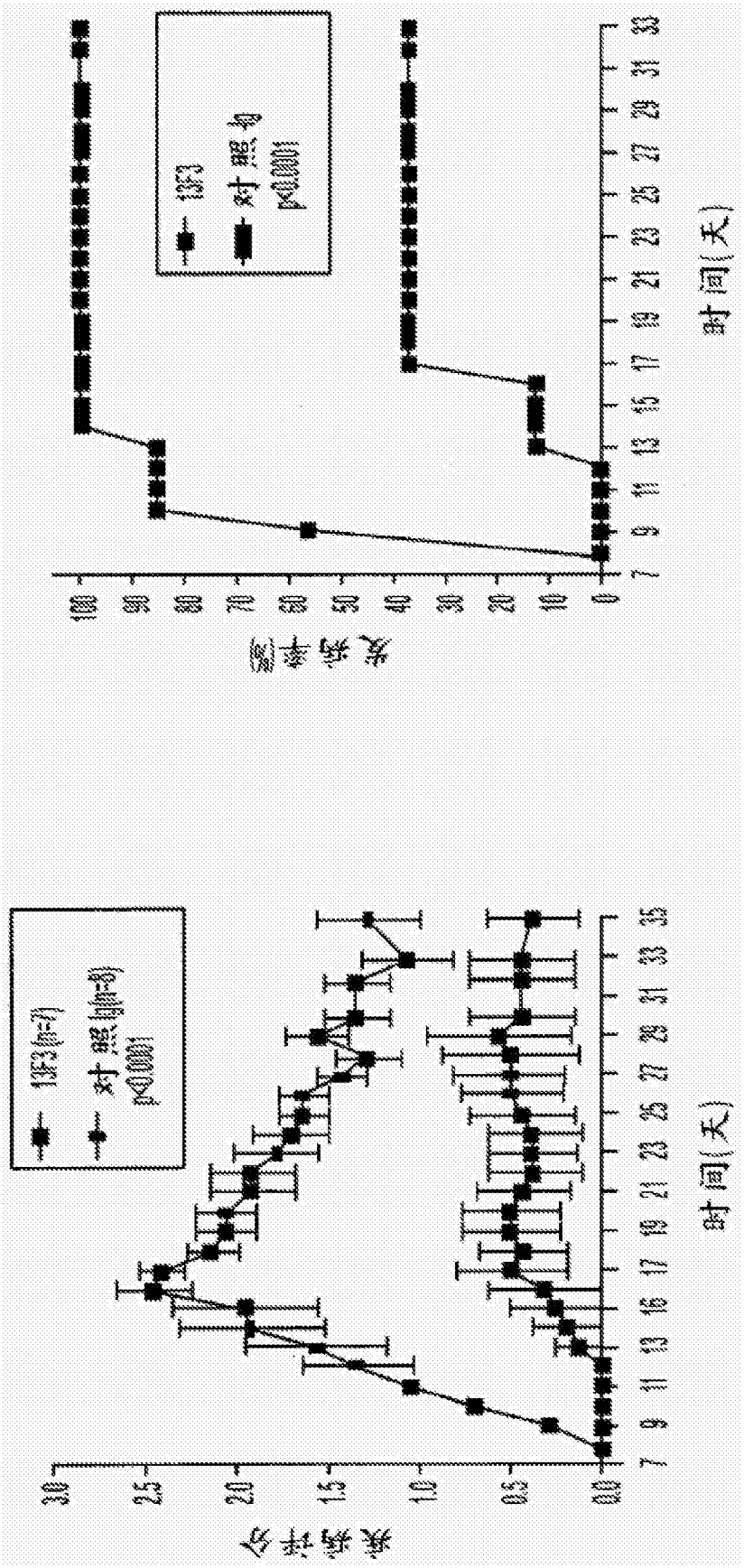


图17

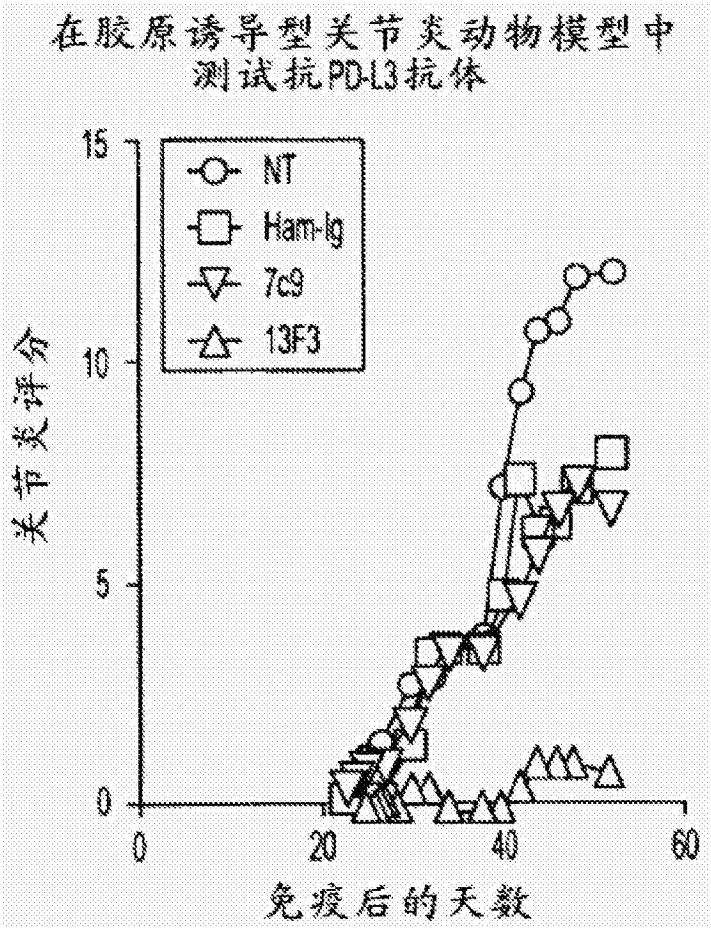

在胶原诱导型关节炎动物模型中
测试抗PD-L3抗体
NT
Ham-Ig
7c9
13F3
关节炎评分
15
10
5
0
0
20
40
60
免疫后的天数

图18

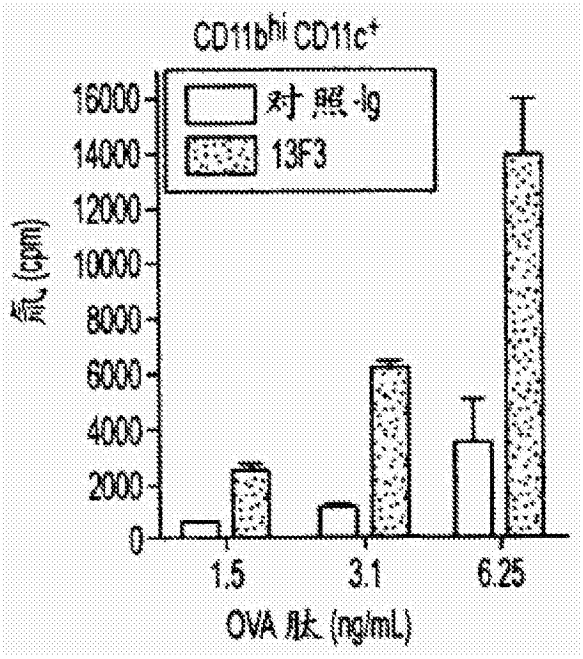

CD11b^hi CD11c^+
对照-Ig
13F3
氚 (cpm)
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
1.5
3.1
6.25
OVA 肽 (ng/mL)

图19

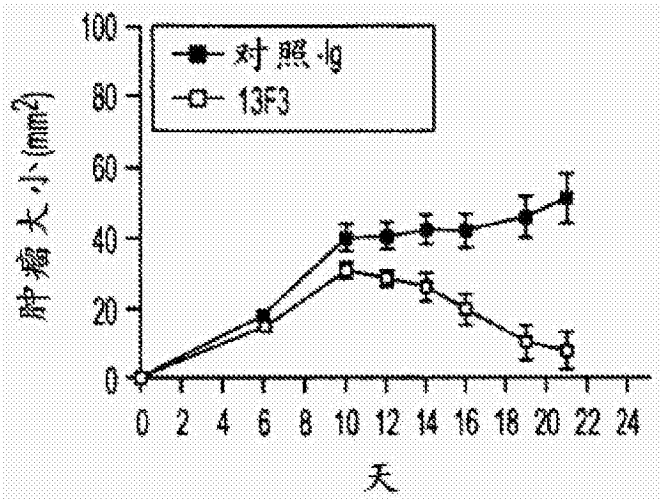


图20

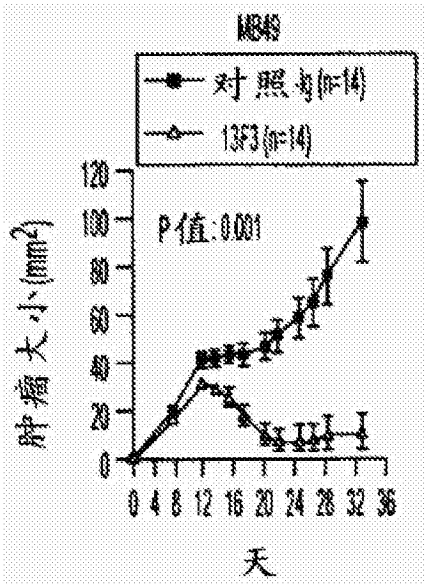


图21A

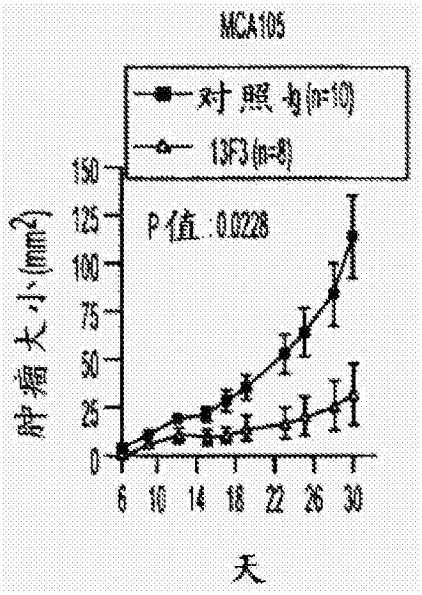


图21B

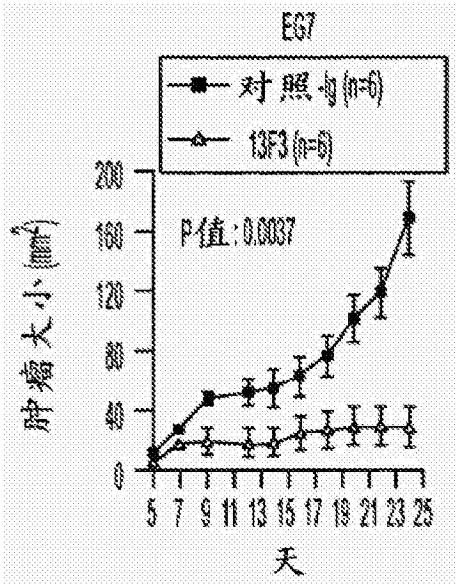


图21C

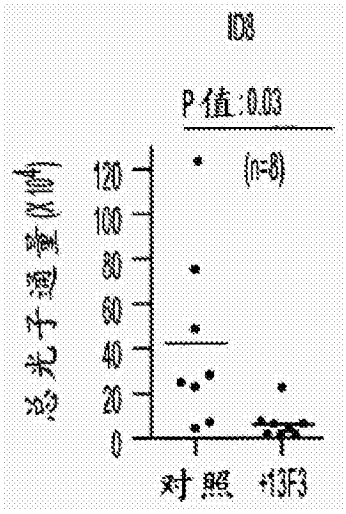


图21D

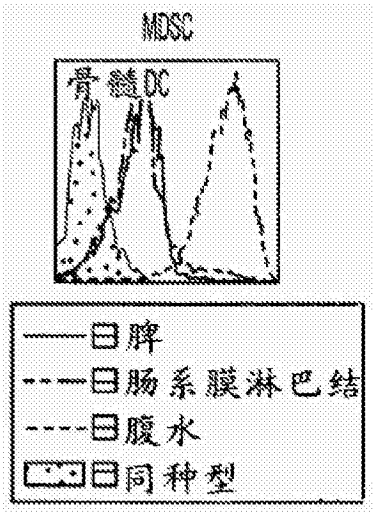


图21E

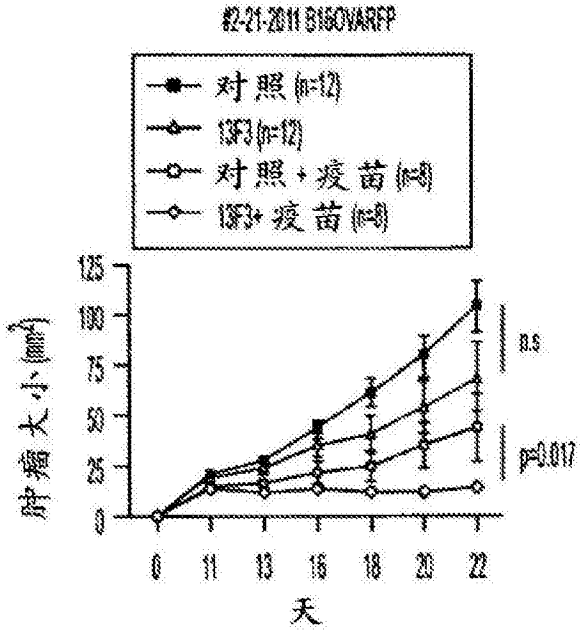


图22

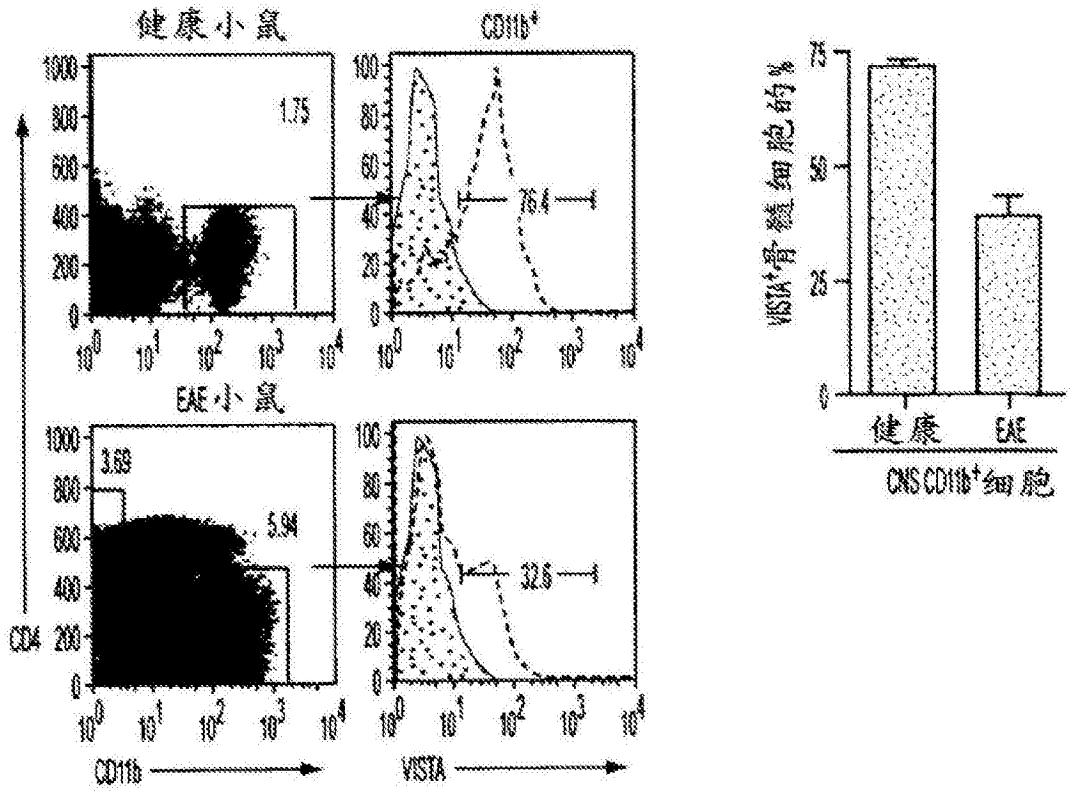

健康小鼠
CD11b+
1.75
76.4
EAE小鼠
3.69
5.94
32.6
CD4
CD11b
VISTA
VISTA+骨髓细胞的%
健康
EAE
CNS CD11b+细胞

图23

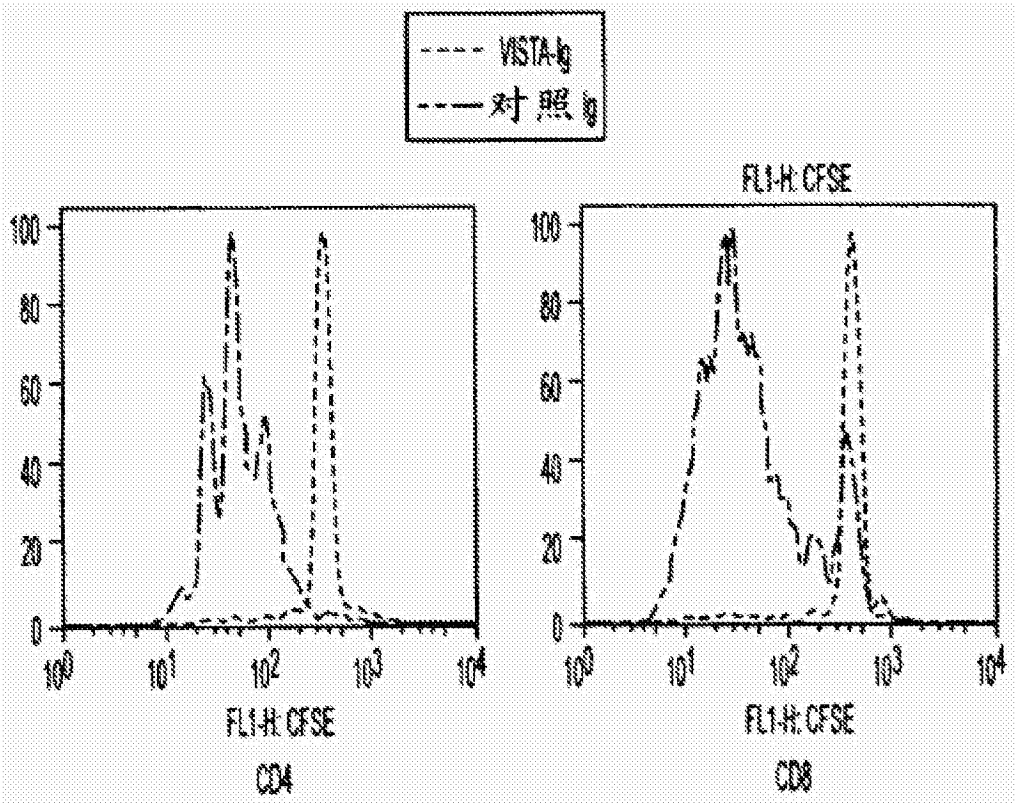

VISTA-Ig
对照 Ig
FL1-H: CFSE
CD4
CD8

图24