

(19)



(10) **LT 5063 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

- (11) Patento numeris: **5063** (51) Int. Cl.⁷: **C07K 14/705**
- (21) Paraiškos numeris: **2003 002**
- (22) Paraiškos padavimo data: **2003 01 07**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2003 07 25**
- (45) Patento paskelbimo data: **2003 11 25**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US01/21204**
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **2001 07 02**
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: **2003 01 07**
- (30) Prioritetas: **60/215,913, 2000 07 03, US**
- (72) Išradėjas:
Robert COHEN, US
Suzette CARR, US
David HAGERTY, US
Robert J. PEACH, US
Jean Claude BECKER, US
- (73) Patento savininkas:
BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, P.O.Box 4000, Lawrenceville-Princeton Road, Princeton, NJ 08543-4000, US
- (74) Patentinis patikėtinis:
Rita LAURINAVIČIŪTĖ, UAB „Metida“, Gedimino pr. 45-6, LT-2600 Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:
Tirpi CTLA4 molekulė, skirta reumatinių ligų gydymui
- (57) Referatas:

Šis išradimas yra susijęs su tirpia CTLA4 mutantine molekule ir kompozicijomis, skirtomis panaudoti reumatinėms ligoms gydyti, skiriant subjektui efektyvų kiekį tirpios CTLA4 mutantinės molekulės, kuri blokuoja endogeninių B7 molekulių susirišimą su jų ligandais.

Šioje paraiškoje yra cituojamos įvairios publikacijos. Norint pilniau aprašyti srities, kuriai priklauso šis išradimas, padėti, čia yra duodami pilni šių publikacijų, kurios yra įtrauktos į šią paraišką, aprašymai.

Išradimo sritis

Šis išradimas yra pagrindinai susijęs su reumatinių ligų sritimi. Konkrečiau tariant, šis išradimas yra susijęs su tirpia CTLA4 mutantinėmis molekulėmis ir kompozicijomis, kurios skirtos panaudoti subjekto reumatinių ligų, tokių kaip reumatinis artritas, gydymui.

Išradimo kilmė

Dabartiniu metu nėra vaistų reumatinėms ligoms gydyti. Terapiniai agentai greičiau yra naudojami simptomams gydyti. Paprastai terapiniai agentai yra skiriami ilgą laiką ir dažnai jų terapinę vertę mažina šalutinis poveikis.

Reumatinės ligos apima grupę ligų, kurios veikia kūno raumenų-skeletinius ir jungiamuosius audinius. Tokioms ligoms yra būdingas chroniškas uždegimas, kuris dažnai veda į nuolatinį audinio naikinimą, deformaciją, atrofiją ir negalią. Reumatinės ligos veikia sąnarius, kaulus, minkštuosius audinius arba stuburo smegenis (Mathies, H. 1983, *Rheuma*) ir yra klasifikuojamos kaip uždegiminis reumatizmas, degeneracinis reumatizmas, nesąnarinis reumatizmas arba kolageno ligos. Yra žinoma, kad kai kurios reumatinės ligos yra autoimuninės ligos, kurias sukelia pakitęs subjekto imuninis atsakas.

Reumatinis artritas yra progresuojanti reumatinė liga, kuria serga maždaug 2 % išsivysčiusių šalių suaugusių gyventojų (Utsinger, P.D. et al., 1985 *Rheumatoid Arthritis*, p. 140). Šiai ligai yra būdingas pastovus uždegiminis sinovitas, kuris sukelia kremzlių ir kaulų eroziją ir duoda

periferinių sąnarių struktūrinės deformacijos. Su reumatinio artritu susiję simptomai yra sąnarių patinimas, sąnarių jautrumas, uždegimas, rytinis sąnarių nejudrumas ir skausmas, ypač lankstant. Subjektai, turintys uždelstas artrito stadijas, kenčia nuo struktūrinių pakenkimų, įskaitant sąnario destruktiją su kaulo erozija ("Principals of Internal Medicine, Harrison, 13th edition, p. 1648-1655). Be to, pacientai gali turėti įvairių organinių pažeidimų kitų klinikinių simptomų, įskaitant odos, inkstų, širdies, plaučių, centrinės nervų sistemos ir akių pažeidimus dėl su imuniniu procesu susijusio gyslų uždegimo.

Kiti susiję su reumatinio artritu simptomai yra padidinti eritrocitų nusėdimo greičiai ir padidinti serumo C-reaktyvaus baltymo (CRP) ir/arba tirpaus IL-2 receptoriaus (IL-2r) kiekiai. Eritrocitų nusėdimo greitis yra padidintas beveik visiems pacientams, turintiems aktyvų reumatinį artritą. Serumo C-reaktyvaus baltymo kiekis taip pat yra padidintas ir koreliuojasi su ligos aktyvumu ir progresuojančio sąnario ardymo tikimybe. Be to, tirpaus IL-2r – aktyvuotų T-ląstelių produkto – kiekis yra padidintas pacientų su aktyviu reumatinio artritu kraujo serume ir sinoviniame skystyje (žr. "Principals of Internal Medicine, Harrison, 13th edition, p. 1650).

Manoma, kad reumatinis artritas yra T-ląstelių tarpininkaujama autoimuninė liga, kurioje dalyvauja antigenai nespecifinės tarpląstelinės sąveikos tarp T-limfocitų ir antigenus pateikiančių ląstelių. Bendrai imant, T-ląstelės atsako dydį apsprendžia kostimuliacinis atsakas, gaunamas dėl T-ląstelių paviršiuje esančių molekulių ir jų ligandų (Mueller, et al., 1989 *Ann. Rev. Immunol.* 7:445-480). Svarbiausi kostimuliaciniai signalai yra paduodami per sąveiką tarp T-ląstelės paviršinių receptorių, CD28 ir CTLA4, ir jų ligandų, tokių kaip su B7 susijusios molekulės CD80 (t.y. B7-1) ir CD86 (t.y. B7-2) ant antigeną pateikiančių ląstelių (Linsley, P. and Ledbetter, J. 1993 *An. Rev. Immunol.* 11:191-212).

✓ T-ląstelės aktyvacija nesant kostimuliacijos duoda anerginį T ląstelės atsaką (Schwartz, R.H. (1992) *Cell* 71:1065-1068), kur imuninė sistema nebeatsako į stimuliavimą.

Kadangi laikoma, kad reumatinis artritas yra T-ląstelių tarpininkaujama imuninės sistemos liga, viena naujų agentų reumatiniui artritui gydyti paieškos strategija yra identifikuoti molekules, kurios blokuoja kostimuliacinius

signalus tarp T-limfocitų ir antigeną pateikiančių ląstelių, blokuojant sąveiką tarp endogeninių CD28 arba CTLA4 ir B7. Potencialios molekulės yra tirpios CTLA4 molekulės, kurios yra modifikuotos taip, kad jos susiristų su B7 su didesne trauka nei laukinio tipo CTLA4 (kurios seka yra parodyta fig.23) arba CD28, tokiu būdu blokuojant kostimuliacinius signalus.

Buvo sukonstruotos tirpios CD28 ir CTLA4 formos, suliejant (V)-tipo CD28 ir CTLA4 ekstraląstelines dalis su imunoglobulino (Ig) pastoviosiomis sritimis, gaunant CD28Ig ir CTLA4Ig. CTLA4Ig nukleotidų ir aminorūgščių seka yra parodyta fig.24, kur baltymas prasideda nuo metionino +1 padėtyje arba alanino -1 padėtyje ir baigiasi lizinu +357 padėtyje. CTLA4Ig riša ir CD80-teigiamas, ir CD86-teigiamas ląsteles stipriau nei CD28Ig (Linsley, P. et al. 1994 *Immunity* 1:793-80). Buvo rasta, kad daugelį nuo T ląstelių priklausančių imuninių atsakų blokuoja CTLA4Ig tiek *in vitro*, tiek ir *in vivo*. (Linsley et al., 1991b, supra; Linsley, P.S. et al., 1992a *Science* 257:792-795; Linsley, P.S. et al., 1992b *J. Exp. Med.* 176:1595-1604; Lenschow, D.J. et al. 1992 *Science* 257:789-792; Tan, P. et al., 1992 *J. Exp. Med.* 177:165-173; Turka, L.A., 1992 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11102-11105).

Norint pakeisti susirišimo su gamtiniais ligandais, tokiais kaip B7, gebą, tirpios CTLA4Ig sulietos molekulės buvo modifikuotos panaudojant aminorūgščių mutaciją molekulių CTLA4 dalyje. CTLA4 sritys, kurios mutavus pakeičia susirišimo su B7 ligandais gebą arba trauką B7 ligandams, apima komplementarumą apsprendžiančią 1 sritį (CDR-1 kaip aprašyta JAV patentuose 6,090,914, 5,773,253, 5,844,095; JAV patentinėje paraiškoje Ser. Nr. 60/214,065; ir Peach et al. 1994, *J. Exp. Med.*, 180:2049-2058) ir komplementarumą apsprendžiančią 3 sritį, į (CDR-3) panašias sritis (CDR-3 yra CTLA4 ekstraląstelinės dalies išlaikyta sritis, kaip aprašyta JAV patentuose 6,090,914, 5,773,253 ir 5,844,095; JAV patentinėje paraiškoje Ser. Nr. 60/214,065; ir Peach et al. 1994, *J. Exp. Med.*, 180:2049-2058. Į CDR-3 panaši sritis apima CDR-3 sritį ir tęsiasi per keletą aminorūgščių prieš kryptį ir/arba pagal kryptį nuo CDR-3 gabalo). Į panašią į CDR-3 sritį įeina heksapeptidas MYPPPY, kuris yra labai konservatyvus visuose CD28 ir CDLA4 šeimos nariuose. Alanino skanavimo mutagenezė per heksapeptidą CTLA4 ir atrinktose CTLA4Ig liekanose sumažino arba panaikino susirišimą su CD80 (Peach, R.J., et al. *J. Exp. Med.* 1994 180:2049-2058).

Buvo padarytos kitos tirpios CTLA4Ig molekulės modifikacijos, sukeičiant CTLA4 ir CD28 homologines sritis. Šios chimerinės CTLA4/CD28 homologinės mutantinės molekulės identifikavo MYPPPY heksapeptidą, bendrą CTLA4 ir CD28, o taip pat tam tikras nekonservatyvias aminorūgščių sekas CTLA4 srityse, panašiose į CDR-1 ir CDR-3, kaip sritis, atsakingas už CTLA4 susirišimo su CD80 gebos padidinimą (Peach, R.J., et al. *J. Exp. Med.* 1994 180:2049-2058).

Tirpios CTLA4 molekulės, tokios kaip CTLA4Ig, CTLA4 mutantinės molekulės arba chimeriniai CTLA4/CD28 homologiniai mutantai, kaip aprašyta aukščiau, įveda naują grupę terapinių vaistų reumatinėms ligoms gydyti.

Dabartinis reumatinių ligų, tokių kaip reumatinis artritas, gydymas apima skyrimą nespecifinių citotoksinių imunodepresantų, tokių kaip metotreksatas, ciklofosfamidą, azatiopriną, ciklosporiną A ir auglio nekrozės alfa-faktoriaus (TNF α) blokatorių arba antagonistų. Šie imunodepresantai slopina visą subjekto imuninę sistemą ir ilgalaikis naudojimas didina infekcijos riziką. Be to, šie vaistai tik slopina reumatinio artrito progresavimą, ir nutraukus gydymą jis atsinaujina padidintu greičiu. Ilgalaikis gydymas šiais nespecifiniais vaistais sukelia šalutinius efektus, įskaitant tendenciją atsirasti tam tikroms ligoms, inkstų nepakankamumą, kaulų čiulpų slopinimą, plaučių fibrozę, piktybiškumą, diabetą ir kepenų funkcijos sutrikimus. Maždaug po 2-5 metų šie vaistai palaipsniui tampa neveiksmingi (Kelley's Textbook of Rheumatology, 6th Edition, pages 1001-1020).

Kitu atveju, terapiniai agentai, kurie yra nespecifiniai imunodepresantai ir priešuždegiminiai vaistai, buvo naudojami simptominiam palengvėjimui gauti. Šie vaistai priklauso nuo dozės ir neapsaugo nuo ligos progresavimo. Šie vaistai apima steroidinius junginius, tokius kaip prednizonas ir metilprednizolonas. Steroidai taip pat turi nemažus šalutinius efektus, susijusius su jų ilgalaikiu vartojimu (Kelley's Textbook of Rheumatology, 6th Edition, pages 829-833).

Taigi dabar naudojami reumatinio artrito gydymui terapiniai agentai yra riboto efektyvumo, turi žymius toksinius šalutinius efektus ir negali būti naudojami nepertraukiamai ilgą laiką.

Tokiu būdu yra poreikis terapinių agentų, kurie būtų efektyvūs ir veiksmingesni gydant reumatinius susirgimus, tokius kaip reumatinis artritas, ir leistų išvengti įprastų trūkumų, nukreipiant gydymo pastangas į autoimuniškumo patofiziologinį mechanizmą.

Išradimo santrauka

Šiame išradime yra pateikiamos kompozicijos, skirtos imuninės sistemos ligų gydymui, skiriant subjektui tirpias CTLA4 molekules, kurios rišasi su B7 molekulėmis, esančiomis ant B7-teigiamų ląstelių, tokiu būdu inhibuodamos endogenines B7 molekules nuo susirišimo su CTLA4 ir/arba CD28 ant T-ląstelių. Šiame išradime naudojamos tirpios CTLA4 molekulės yra CTLA4Ig ir tirpi CTLA4 mutantinė molekulė L104EA29YIg.

Šiame išradime taip pat yra pateikiami T-ląstelių funkcijos inhibavimo, bet ne T-ląstelių suardymo, žmogaus organizme būdai suleidžiant į kontaktą žmogaus B7-teigiamas ląsteles su tirpiu CTLA4. Tirpios CTLA4 pavyzdžiais yra CTLA4Ig ir L104EA29YIg.

Šiame išradime taip pat yra pateikiamos tirpios CTLA4 molekulės, tokios kaip CTLA4Ig ir/arba tirpi CTLA4 mutantinė molekulė L104EA29YIg, kurios skirtos panaudoti reumatinių ligų, tokių kaip reumatinis artritas, gydymui (pvz. simptomų sumažinimui), jas skiriant subjektui, kuriam diagnozuotas reumatinis artritas. Ši CTLA4 mutantinė molekulė L104EA29YIg, pvz prasidedanti metioninu +1 padėtyje arba alaninu -1 padėtyje ir užsibaigianti lizinu +357 padėtyje, kaip parodyta fig.19, yra tinkamiausia naudoti šio išradimo būduose.

Šiame išradime taip pat yra pateikiamas tirpių CTLA4 molekulių panaudojimas susijusių su reumatine liga patofiziologinių pokyčių, tokių kaip struktūriniai pakenkimai, sumažinimui, jas skiriant subjektui, kuriam diagnozuotas reumatinis artritas.

Šiame išradime taip pat yra pateikiamos farmacinės kompozicijos imuninių ligų, tokių kaip reumatinis artritas, gydymui, į kurias įeina farmaciškai priimtinas nešiklis ir biologiškai veiklus agentas, toks kaip tirpios CTLA4 molekulės.

Šis išradimas taip pat apima rinkinius, į kuriuos įeina farmacinės kompozicijos, kurios tinka imuninės sistemos ligų gydymui. Viena

igyvendinimo variante imuninės sistemos ligai, pvz. reumatiniam artritui, gydyti yra naudojamas rinkinys, į kurį įeina viena arba daugiau šio išradimo farmacinių kompozicijų. Pavyzdžiui, į farmacinę kompoziciją įeina efektyvus kiekis tirpios CTLA4 mutantinės molekulės, kuri rišasi su B7 molekulėmis ant B7-teigiamų ląstelių, tokiu būdu blokuodamos B7 ląsteles nuo susirišimo su CTLA4 ir/arba CD28 ant T-ląstelių. Be to, rinkinyje gali būti vienas arba daugiau imunodepresantų, naudojamų kartu su šio išradimo farmacinėmis kompozicijomis. Galimais imunodepresantais yra, bet jais neapsiribojama, kortikosteroidai, nesteroidiniai priešuždegiminiai vaistai (pvz. CoX-2 inhibitoriai), ciklosporino prednizonas, azatioprinas, metotreksatas, TNF α blokatoriai arba antagonistai, infiksimabas, bet koks biologinis agentas, veikiantis uždegiminius citokinus, hidroksichlorokvinas, sulfasalazoprinas, aukso druskos, etanerceptas ir anakinra.

Šiame išradime taip pat yra pateikiami eritrocitų sedimentacijos greičio, kuris yra susijęs su reumatinio artritu, sumažinimo būdai.

Be to, šiame išradime yra pateikiami tam tikrų kraujo serumo komponentų, kurie yra susiję su reumatinio artritu, įskaitant C-reaktyvų baltymą, tirpų ICAM-1, tirpų E-selektiną ir/arba tirpų IL-2r, kiekio sumažinimo būdai.

Trumpas figūrų aprašymas

Fig.1A: Pacientų grupės demografiniai duomenys. Demografiniai duomenys apima lytį, rasę ir ligos trukmę, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau.

Fig.1B: Pacientų grupės demografiniai duomenys. Demografiniai duomenys apima lytį, masę ir ligos aktyvumą, kurį įvertino pacientas ir terapeutas, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau.

Fig.1C: Pacientų grupės demografiniai duomenys, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau. Demografiniai duomenys apima ligos aktyvumą, eritrocitų nusėdimo greitį (ESR), fizinę funkciją (negalia, įvertintą pagal klausimus apie ligą) ir C-reaktyvų baltymą (CRP).

Fig.1D: Pacientų grupės demografiniai duomenys, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau. Demografiniai duomenys apima sąnarių patinimą, sąnarių jautrumą, rytinį nejudrumą ir skausmą.

Fig.1E: Pacientų grupės demografiniai duomenys, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau. Demografiniai duomenys apima ankstesnius gydymo būdus.

Fig.2: Gydymo nutraukimo 85-tą dieną priežastį, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau, santrauka.

Fig.3A: ACR atsakai 85-tą dieną, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau: ACR-20, -50, ir -70 atsakai.

Fig.3B: ACR-20 atsakai 85-tą dieną, įskaitant placebo, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau: ACR-20 atsakas 95 % patikimumo ribose.

Fig.3C: ACR-20 atsakai 85-tą dieną, įskaitant placebo, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau: ACR-20 atsako skirtumas 95 % patikimumo intervalo atžvilgiu.

Fig.4A: Pagrindiniai (20 % pagerėjimas) klinikiniai atsakai, skaičiuojant pacientų patinusius ir jautrius sąnarius 85-tą dieną, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau: pagrindinis klinikinis atsakas, ACR-20.

Fig.4B: Klinikiniai atsakai (pagerėjimo procentais), skaičiuojant pacientų patinusius ir jautrius sąnarius 85-tą dieną, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau: klinikinio atsako pokytis, skaičiuojant pagal procentinį pagerėjimą.

Fig.5A: Skausmo atsakas (pagal Likerto skalę, imant vidutinį vienetų pokytį nuo bazinės linijos), skaičiuojant pacientų procentus 85-tą dieną, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau: skausmo balų pokyčiai nuo bazinės linijos.

Fig.5B: Paciento įvertinti bendrieji ligos pokyčiai (pagal Likerto skalę, imant vidutinį vienetų pokytį nuo bazinės linijos), skaičiuojant pacientų procentus 85-tą dieną, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau: paciento įvertinti bendrojo ligos aktyvumo pokyčiai.

Fig.5C: Gydytojo įvertinti bendrieji ligos pokyčiai (pagal Likerto skalę, imant vidutinį vienetų pokytį nuo bazinės linijos), skaičiuojant pacientų procentus 85-tą dieną, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau: gydytojo įvertinti bendrojo ligos aktyvumo pokyčiai.

Fig.5D: Skausmas (pagal Likerto skalę, imant vidutinį vienetų pokytį nuo bazinės linijos), skaičiuojant pacientų procentus 85-tą dieną, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau: skausmo pokyčiai nuo bazinės linijos.

Fig.6A: Paciento bendras ligos aktyvumo pokyčio nuo bazinės linijos įvertinimas 2 vienetų intervale 85-tą dieną, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau; ligos aktyvumo pagerinimas.

Fig.6A: Gydytojo bendras ligos aktyvumo pokyčio nuo bazinės linijos įvertinimas 2 vienetų intervale 85-tą dieną, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau; ligos aktyvumo pagerinimas.

Fig.7A: C-reaktyvaus baltymo (CRP) kiekio procentinis sumažėjimas 85-tą dieną, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau; CRP procentinis sumažėjimas nuo bazinės linijos.

Fig.7B: C-reaktyvaus baltymo (CRP) kiekių sumažėjimo skirtumas 85-tą dieną, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau; CRP kiekių procentinio sumažėjimo skirtumai su 95 % patikimumo intervalais.

Fig.7C: Vidutinis C-reaktyvaus baltymo (CRP) kiekio sumažėjimas 85-tą dieną, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau; vidutinis pokytis nuo bazinės linijos.

Fig.8: Tirpaus IL-2 receptoriaus kiekių sumažėjimo vidutinis pokytis nuo bazinės linijos 85-tą dieną, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau.

Fig.9A: CTLA4Ig poveikio į jautrius sąnarius priklausomybė nuo laiko, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau; tarpinis skirtumas nuo bazinės linijos.

Fig.9B: CTLA4Ig poveikio į jautrius sąnarius priklausomybė nuo laiko, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau; vidutinis skirtumas nuo bazinės linijos.

Fig.10A: CTLA4Ig poveikio į patinusius sąnarius priklausomybė nuo laiko, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau; tarpinis skirtumas nuo bazinės linijos.

Fig.10B: CTLA4Ig poveikio į patinusius sąnarius priklausomybė nuo laiko, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau; vidutinis skirtumas nuo bazinės linijos.

Fig.11: CTLA4Ig poveikis į skausmo įvertinimo vidutinį skirtumą nuo bazinės linijos priklausomai nuo laiko, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau.

Fig.12A: CTLA4Ig poveikis į paciento ligos aktyvumo vidutinio skirtumo nuo bazinės linijos įvertinimą priklausomai nuo laiko, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau.

Fig.12B: CTLA4Ig poveikis į gydytojo ligos aktyvumo vidutinio skirtumo nuo bazinės linijos įvertinimą priklausomai nuo laiko, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau.

Fig.13A: L104EA29YIg poveikio į skausmingus sąnarius priklausomybė nuo laiko, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau; tarpinis skirtumas nuo bazinės linijos.

Fig.13B: L104EA29YIg poveikio į skausmingus sąnarius priklausomybė nuo laiko, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau; vidutinis pokytis nuo bazinės linijos.

Fig.14A: L104EA29YIg poveikio į patinusius sąnarius priklausomybė nuo laiko, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau; tarpinis skirtumas nuo bazinės linijos.

Fig.14B: L104EA29YIg poveikio į patinusius sąnarius priklausomybė nuo laiko, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau; vidutinis skirtumas nuo bazinės linijos.

Fig.15: L104EA29YIg poveikis į skausmo įvertinimo vidutinį skirtumą nuo bazinės linijos priklausomai nuo laiko, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau; vidutinio pokyčio nuo bazinės linijos priklausomybė nuo laiko.

Fig.16A: L104EA29YIg poveikis į paciento ligos aktyvumo vidutinio skirtumo nuo bazinės linijos įvertinimą priklausomai nuo laiko, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau.

Fig.16B: L104EA29YIg poveikis į gydytojo ligos aktyvumo vidutinio skirtumo nuo bazinės linijos įvertinimą priklausomai nuo laiko, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau.

Fig.17: Paciento negalios procentinis pagerėjimas, įvertintas pagal sveikatos vertinimo klausimų sąrašą (HAQ), lyginant su bazine linija, 85-tą dieną gydant CTLA4Ig ir L104EA29YIg, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau.

Fig.18: L104EIg nukleotidų ir aminorūgščių seka, kaip aprašyta 1 pavyzdyje toliau.

Fig.19: L104EA29YIg nukleotidų ir aminorūgščių seka, kaip aprašyta 1 pavyzdyje toliau.

Fig.20: L104EA29LIg nukleotidų ir aminorūgščių seka, kaip aprašyta 1 pavyzdyje toliau.

Fig.21: L104EA29TIg nukleotidų ir aminorūgščių seka, kaip aprašyta 1 pavyzdyje toliau.

Fig.22: L104EA29WIIg nukleotidų ir aminorūgščių seka, kaip aprašyta 1 pavyzdyje toliau.

Fig.23: CTLA4 receptoriaus nukleotidų ir aminorūgščių seka.

Fig.24: CTLA4Ig nukleotidų ir aminorūgščių seka.

Fig.25: SDS gelio (Fig.25A) CTLA4Ig (1 juostelė), L104EIg (2 juostelė) ir L104EA29YIg (3A juostelė); bei CTLA4Ig (Fig.25B) ir L104EA29YIg (Fig.25C) molekulinį sietų chromatogramos.

Fig.26 (kairysis ir dešinysis vaizdai): CTLA4 ekstraląstelinio Ig V-tipo klosčių juostinė diagrama, gautą iš tirpalo struktūros, nustatytos BMR spektroskopijos metodu. Fig.26 (kairysis vaizdas) rodo CDR-1 (S25-R33) srities ir MYPPPY srities padidintą vaizdą, nurodant surišimo gebą padidinančių mutacijų L104 ir A29 padėtį ir šoninės grandinės orientaciją.

Fig.27A ir 27B: FACS testai, rodantys L104EA29YIg, L104EIg ir CTLA4Ig susirišimą su žmogaus CD80- arba CD86-transfekuotomis CHO ląstelėmis, kaip aprašyta 2 pavyzdyje toliau.

Fig.28A ir 28B: Grafikai, rodantys CD80-teigiamų ir CD86-teigiamų CHO ląstelių proliferaciją, kaip aprašyta 2 pavyzdyje toliau.

Fig.29A ir 29B: Grafikai, rodantys, kad L104EA29YIg efektyviau inhibuoja pirminių ir antrinių alostimuliuotų T ląstelių proliferaciją nei CTLA4Ig, kaip aprašyta 2 pavyzdyje toliau.

Fig.30A-C: grafikai, rodantys, kad L104EA29YIg efektyviau inhibuoja alostimuliuotų žmogaus T ląstelių IL-2 (Fig.30A), IL-4 (Fig.30B) ir (γ)-interferono (Fig.30C) citokinų produkciją, nei CTLA4Ig, kaip aprašyta 2 pavyzdyje toliau.

Fig.31 Grafikas, rodantis, kad L104EA29YIg efektyviau inhibuoja beždžionių fitohemaglutinino (PHA) stimuliuotų T ląstelių proliferaciją nei CTLA4Ig, kaip aprašyta 2 pavyzdyje toliau.

Fig.32: Grafikas, rodantis L104EA29YIg, L104EIg ir laukinio tipo CTLA4Ig pusiausvyrinę susirišimo su CD86Ig analizę.

Fig.33A ir B: Tirpaus ICAM-1 ir tirpaus E-selektino kiekių sumažėjimo vidutinis pokytis nuo bazinės linijos 85-tą dieną, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau.

Smulkus išradimo aprašymas

APIBRĖŽIMAI

Visi šioje paraiškoje naudojami moksliniai ir techniniai terminai, jeigu nepažymėta kitaip, turi įprastas reikšmes. Šioje paraiškoje toliau duodamos frazės turi čia nurodytas reikšmes.

Čia naudojamas "ligandas" reiškia molekulę, kuri specifiskai atpažįsta ir rišasi su kita molekule, pavyzdžiui ligandas CTLA4 yra B7 molekulė.

Čia naudojamas "laukinio tipo CTLA4" arba "nemutuotas CTLA4" turi gamtinę aminorūgščių seką, pilno ilgio CTLA4, kaip parodytas fig.23 (taip pat aprašytas JAV patentuose Nr.Nr. 5,434,131, 5,844,095, 5,851,795) arba bet kokią jo dalį arba yra jo darinys, kuris atpažįsta ir rišasi su B7 arba sąveikauja su B7 taip, kad jis blokuoja susirišimą su CD80 ir/arba CTLA4 (pvz. endogeniniu CD28 ir/arba CTLA4). Konkrečiuose įgyvendinimo variantuose laukinio tipo CTLA4 ekstraląstelinė dalis prasideda nuo metionino +1 padėtyje ir baigiasi asparto rūgštimi +124 padėtyje arba laukinio tipo CTLA4 ekstraląstelinė dalis prasideda nuo alanino -1 padėtyje ir baigiasi asparto rūgštimi +124 padėtyje. Laukinio tipo CTLA4 yra ląstelės paviršiaus baltymas, turintis N-galinę ekstraląstelinę dalį, transmembraninę dalį ir C-galinę citoplazminę dalį. Ekstraląstelinė dalis rišasi su tikslinėmis molekulėmis, tokiomis kaip B7 molekulė. Ląstelėje gamtinis laukinio tipo CTLA4 baltymas yra transliuojamas kaip nesubrendęs polipeptidas, į kurį įeina signalinis peptidas N-baigmės gale. Šis nesubrendęs polipeptidas patiria potransliacinį brendimą, kurį sudaro signalinio peptido atskėlimas ir pašalinimas, pasigaminant atskeltam CTLA4 produktui, turinčiam naujai atsiradusį N-baigmės galą, kuris skiriasi nuo N-baigmės galo nesubrendusioje formoje. Specialistas turėtų suprasti, kad gali vykti ir papildomas potransliacinis brendimas, kuris pašalina vieną arba daugiau aminorūgščių iš atskelto CTLA4 produkto naujai susidariusio N-baigmės galo. Kitu atveju, signalinis peptidas gali nebūti pilnai pašalintas, susidarant molekulėms, kurios prasideda prieš įprastą pradinę aminorūgštį – metioniną. Taigi, subrendęs CTLA4 baltymas gali prasidėti nuo metionino +1 padėtyje arba alanino -1 padėtyje. Į

subrendusią CTLA4 molekulės formą įeina ekstraląstelinė CTLA4 dalis arba bet koks jos gabalas, kuris rišasi su B7.

Čia naudojamas terminas "CTLA4 mutantinė molekulė" reiškia laukinio tipo CTLA4, kaip parodyta fig.23, arba jos dalį arba jos darinį, kuri turi mutaciją arba daug mutacijų (geriausia CTLA4 ekstraląstelinėje dalyje). CTLA4 mutantinė molekulė turi seką, kuri yra panaši į laukinio tipo CTLA4 molekulę, bet yra neidentiška jai ir vis dar rišasi su B7. Mutacijos gali apimti vieną arba daugiau aminorūgščių liekanų, pakeičiant aminorūgštis, turinčiomis konservatyvią (pvz. leucinas pakeičiamas izoleucinu) arba nekonservatyvią (pvz. glicinas pakeičiamas triptofanu) struktūrą, arba chemines savybes, išimant kai kurias aminorūgštis, pridedant kai kurias aminorūgštis, paslenkant rėmelius arba nukerpant kai kurias aminorūgštis. Į mutantines CTLA4 molekules gali įeiti ne-CTLA4 molekulė, arba jos gali būti prijungtos prie tokios molekulės. Mutantinės molekulės gali būti tirpios (t.y. cirkuliuojančios) arba prijungtos prie ląstelės paviršiaus. Papildomos CTLA4 mutantinės molekulės apima molekules, aprašytas JAV patentinėje paraiškoje, Ser. Nr. 09/865,321, 60/214,065 ir 60/287,576; JAV patentuose Nr. 6,090,914, 5,844,095 ir 5,773,253; ir Peach, R.J. et al., *J. Exp. Med.* 180:2049-2058 (1994). CTLA4 mutantinės molekulės gali būti pagaminamos sintezės arba rekombinantiniu būdu.

"CTLA4Ig" yra tirpus sulietas baltymas, turintis laukinio tipo CTLA4 ekstraląstelinę dalį, prijungtą prie Ig uodegos, arba jos gabalą, kurie rišasi su B7. Ypatingas įgyvendinimo variantas turi laukinio tipo CTLA4 ekstraląstelinę dalį (kaip parodyta fig.23), prasidedančią nuo metionino +1 padėtyje ir besibaigiančią asparto rūgštimi +124 padėtyje arba prasidedančią nuo alanino -1 padėtyje ir besibaigiančią asparto rūgštimi +124 padėtyje; jungiančią aminorūgštis liekaną glutaminą +125 padėtyje; ir imunoglobulino dalį, apimančią nuo glutamo rūgštis +126 padėtyje iki lizino +357 padėtyje (CTA4Ig koduojanti DNR buvo deponuota 1991 m. gegužės 31 d. Amerikos tipinių kultūrų kolekcijoje (ATCC), 10801 University B1vd., Manassas, VA 20110-2209 pagal Budapešto sutartį ir jai buvo suteiktas ATCC depozito numeris ATCC68629; Linsley, P. et al., 1994, *Immunity* 1:793-80). CTLA4Ig-24, kuniškojo žiurkėno kiaušidžių (CHO) ląstelių linija, ekspresuojanti CTLA4Ig, buvo deponuota 1991 m. gegužės 31 d. su ATCC identifikacijos numeriu

CRL-10762. Šio išradimo būduose ir rinkiniuose naudojamos tirpios CTLA4Ig molekulės gali turėti arba gali neturėti signalinės (lyderinės) peptido sekos. Paprastai šio išradimo būduose ir rinkiniuose naudojamos tirpios CTLA4Ig molekulės neturi signalinės peptido sekos.

"L104EA29Yig" yra sulietas baltymas, kuris yra tirpi CTLA4 mutantinė molekulė, turinti laukinio tipo CTLA4 ekstraląstelinę dalį su aminorūgščių pakeitimais A29Y (tirozino liekana keičia 29 padėties alaniną) ir L104E (glutamo rūgšties liekana keičia +104 padėties leuciną), arba jos dalis, kuri rišasi su B7 molekule, prijungta prie Ig uodegos (duota fig.19; L104EA29YIg koduojanti DNR buvo deponuota 2000 m. birželio 20 d. su ATCC numeriu PTA-2104; JAV patentinėje paraiškose Ser. Nr. 09/579,927, 60/287,576 ir 60/214,065, duodamos kaip literatūros šaltiniai). Šio išradimo būduose ir rinkiniuose naudojamos tirpios L104EA29YIg molekulės gali turėti arba gali neturėti signalinės (lyderinės) peptido sekos. Paprastai šio išradimo būduose ir rinkiniuose naudojamos molekulės neturi signalinės peptido sekos.

Čia naudojamas terminas "tirpi" reiškia bet kokią molekulę, jos fragmentus arba darinius, nesurištus arba neprijungtus prie ląstelės, t.y. cirkuliuojančius. Pavyzdžiui, CTLA7, B7 arba CD28 gali būti padarytos tirpiomis, prijungiant imunoglobulino (Ig) liekaną atitinkamai prie CTLA4, B7 arba CD28. Kitu atveju, molekulė, tokia kaip CTLA4, gali būti paverčiama tirpia pašalinant jos transmembraninę dalį. Paprastai šio išradimo būduose ir rinkiniuose naudojamos tirpios molekulės neturi signalinės (arba lyderinės) sekos.

Čia naudojamas terminas "tirpios CTLA4 molekulės" reiškia neprijungtas prie ląstelės paviršiaus (t.y. cirkuliuojančias) CTLA4 molekules arba bet kurią funkcinę CTLA4 molekulės dalį, kuri rišasi su B7, įskaitant, bet neapsiribojant: CTLA4Ig sulietus baltymus (pvz. ATCC 68629), kuriuose CTLA4 ekstraląstelinė dalis yra sujungta su imunoglobulino (Ig) liekana, paverčiančia sulietą molekulę tirpia, jų fragmentus ir jų darinius; baltymus su CTLA4 ekstraląsteline dalimi, sulietą su arba prijungta prie biologiškai aktyvaus arba chemiškai aktyvaus baltymo dalies, tokio kaip papilomos viruso E7 geno produktas (CTLA4-E7), su melanoma susijusio antigeno p97 (CTLA4-p97) arba ŽIV env baltymo (CTLA4-env gp120), arba jų fragmentus arba jų darinius; CTLA4 molekules su pašalinta transmembranine dalimi,

paverčiant baltymą tirpiu (Oaks, M.K. et al., 2000 *Cellular Immunology* 201:144-153) arba jos fragmentus, arba jos darinius. "Tirpios CTLA4 molekulės" taip pat apima jų fragmentus, dalis arba darinius ir tirpias CTLA4 mutantines molekules, turinčias CTLA4 surišimo aktyvumą. Šio išradimo būduose ir rinkiniuose naudojamos tirpios CTLA4Ig molekulės gali turėti arba gali neturėti signalinės (lyderinės) peptido sekos. Paprastai šio išradimo būduose naudojamos molekulės neturi signalinės peptido sekos.

Čia naudojamas terminas "ekstraląstelinė CTLA4 dalis" reiškia CTLA4 dalį, kuri atpažįsta ir suriša CTLA4 ligandus, tokius kaip B7 molekulės. Pavyzdžiui, ekstraląstelinė CTLA4 dalis apima nuo metionino +1 padėtyje iki asparto rūgšties +124 padėtyje (fig.23). Kitu atveju, ekstraląstelinė CTLA4 dalis apima nuo alanino -1 padėtyje iki asparto rūgšties +124 padėtyje (fig.23). Ekstraląstelinė dalis apima CTLA4 fragmentus arba darinius, kurie susiriša su B7 molekule. Ekstraląstelinė CTLA4 dalis, kaip parodyta fig.23, taip pat gali apimti mutacijas, kurios pakeičia CTLA4 molekulės susirišimo su B7 molekule gebą.

Čia naudojamas terminas "mutacija" reiškia nukleotidų arba aminorūgščių pakeitimą laukinio tipo polipeptido sekoje, pavyzdžiui, DNR ir/arba aminorūgščių pakeitimus laukinio tipo CTLA4 ekstraląstelinėje dalyje. Mutacija DNR gali pakeisti kodoną, kuris duos pakeitimą aminorūgščių sekoje. DNR pakeitimai gali būti pakeitimai, delecijos, pridėjimai, alternatyvus sukirpimas arba nukirpimas. Aminorūgščių pakeitimai gali būti pakeitimai, delecijos, įterpimai, pridėjimai, nukirpimai arba baltymo brandinimo arba skaldymo klaidos. Kitu atveju, mutacijos nukleotidų sekoje gali duoti tylias mutacijas aminorūgščių sekoje, kas yra suprantama specialistams. Šiuo atžvilgiu, tam tikri nukleotidiniai kodonai koduoja tą pačią aminorūgštį. Pavyzdžiais yra nukleotidiniai kodonai CGU, CGG, CGC ir CGA, koduojantys aminorūgštį arginina (R), arba kodonai GAU ir GAC, koduojantys asparto rūgštį (D). Taigi baltymą gali koduoti viena arba daugiau nukleorūgščių molekulių, kurios skiriasi savo konkrečiomis nukleotidų sekomis, bet koduoja baltymo molekules, turinčias vienodas sekas. Aminorūgštis koduojančios sekos yra tokios:

Aminorūgštis	Simbolis	Vienraidis kodas	Kodonas
Alaninas	Ala	A	GCU, GCC, GCA, GCG
Cisteinas	Cys	C	UGU, UGC
Asparto rūgštis	Asp	D	GAU, GAC
Glutamo rūgštis	Glu	E	GAA, GAG
Fenilalaninas	Phe	F	UUU, UUC
Glicinas	Gly	G	GGU, GGC, GGA, GGG
Histidinas	His	H	CAU, CAC
Izoleucinas	Ile	I	AUU, AUC, AUA
Lizinas	Lys	K	AAA, Aag
Leucinas	Leu	L	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG
Metioninas	Met	M	AUG
Asparaginas	Asn	N	AAU, AAC
Prolinas	Pro	P	CCU, CCC, CCA, CCG
Glutaminas	Gln	Q	CAA, CAG
Argininas	Arg	R	CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Serinas	Ser	S	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
Treoninas	Thr	T	ACU, ACC, ACA, ACG
Valinas	Val	V	GUU, GUC, GUA, GUG
Triptofanas	Trp	W	UGG
Tirozinas	Tyr	Y	UAU, UAC

Mutantinė molekulė gali turėti vieną arba daugiau mutacijų.

Čia naudojami terminai "ne-CTLA4 baltymo seka" arba "ne-CTLA4 molekulė" reiškia bet kokią baltymo molekulę, kuri nesiriša su B7 ir netrukdo CTLA4 susirišti su jos taikiniu. Pavyzdžiais yra, bet jais neapsiribojama, imunoglobulino (Ig) pastovioji sritis arba jos dalis. Geriau, kad Ig patovioji sritis būtų žmogaus arba beždžionės Ig pastovioji sritis, pvz. žmogaus C(gama)1, įskaitant šarnyrą, CH2 ir CH3 sritis. Ig pastovioji sritis gali būti mutuota norint sumažinti jos efektorines funkcijas (JAV patentai Nr.Nr. 5,637,481, 5,844,095 ir 5,434,131).

Čia naudojamas "fragmentas" arba "dalis" reiškia bet kokią CTLA4 mutantinės molekulės dalį arba segmentą, geriau ekstraląstelinę CTLA4 dalį arba jos segmentą, kurie atpažįsta ir jungiasi su jos taikiniu, pvz. B7 molekule.

Čia naudojamas žymėjimas "B7" reiškia molekulių B7 šeimą, įskaitant, bet neapsiribojant, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) ir B7-3, kurios gali atpažinti ir susirišti su CTLA4 ir/arba CD28.

Čia naudojamas terminas "B7-teigiamos ląstelės" reiškia bet kokias ląsteles su vieno arba daugiau B7 molekulių, ekspresuojamų ant ląstelės paviršiaus, tipų.

Čia naudojamas terminas "darinys" yra molekulė, kuri turi homologinę seką jos tėvinei molekulei ir giminingą aktyvumą. Pavyzdžiui, CTLA4 darinys apima CTLA4 molekulę, turinčią aminorūgščių seką, kuri yra bent 70 % panaši į laukinio tipo CTLA4 ekstraląstelinės dalies seką ir kuri atpažįsta ir rišasi su B7, pvz. CTLA4Ig arba tirpi CTLA4 mutantinė molekulė L104EA29YIg.

Čia naudojamas terminas "blokuoti" arba "inhibuoti" receptorių, signalą arba molekulę reiškia trukdyti receptoriui, signalui arba molekulei pasireikšti, kas nustatoma pripažintais šioje srityje testais. Pavyzdžiui, ląstelės tarpininkaujamo imuninio atsako blokavimas gali būti detektuojamas nustatant su reumatine liga susijusių simptomų sumažėjimą. Blokavimas arba inhibavimas gali būti dalinis arba pilnas.

Čia naudojamas terminas "B7 sąveikos blokavimas" reiškia trukdymą B7 susirišti su jos ligandais, tokiais kaip CD28 ir/arba CTLA4, tokiu būdu suardant T-ląstelių ir B7-teigiamų ląstelių sąveikas. Agentų, kurie blokuoja B7 sąveikas, pavyzdžiais yra, bet jais neapsiribojama, molekulės, tokios kaip antikūnas (arba jo dalis, arba jo darinys), kuris atpažįsta ir rišasi su bet kuria iš CTLA4, CD28 arba B7 molekulių (pvz. B7-1, B7-2); molekulės tirpi forma (arba jos dalis, arba jos darinys), tokios kaip tirpi CTLA4; peptidinis fragmentas arba kita maža molekulė, skirta sutrukdyti ląstelės signalo perdavimui per CTLA4/CD28/-7 tarpininkaujamą sąveiką. Tinkamiausiame įgyvendinimo variante blokuojantis agentas yra tirpi CTLA4 molekulė, tokia kaip CTLA4Ig (ATCC 68629) arba L104EAYIg (ATCC PTA-2104), tirpi CD28 molekulė, tokia kaip CD28Ig (ATCC 68628), tirpi B7 molekulė, tokia kaip B7Ig (ATCC 68627), anti-B7 monokloninis antikūnas (pvz. ATCC HB-253, ATCC CRL-2223, ATCC CRL-2226, ATCC HB-301, ATCC HB-11341 ir monokloniniai antikūnai, kaip aprašyta Anderson et al. JAV patentuose 6,113,898 arba Yokochi et al., 1982, *J. Immun.*, 128(2) 823-827), anti-CTLA4 monokloninis antikūnas (pvz. ATCC HB-304 ir monokloniniai antikūnai, aprašyti 82-83 literatūros šaltiniuose) ir/arba anti-CD28 monokloninis antikūnas (pvz. ATCC HB 11944 ir mAb 9.3, kurį aprašė Hansen (Hansen et al., 1980, *Immunogenetics* 10: 247-260) arba Martin (Martin et al., 1984, *J. Clin. Immun.*, 4(1):18-22)).

Čia naudojamas terminas "imuninės sistemos liga" reiškia bet kokią ligą, kurioje tarpininkauja T-ląstelių sąveikos su B7-teigiamomis ląstelėmis, įskaitant, bet neapsiribojant, autoimunines ligas, su implantais susijusius sutrikimus ir imunoproliferacines ligas. Su implantu susijusių ligų pavyzdžiais yra implantas-prieš-šeimininką liga (GVHD) (pvz. liga, kuri gali atsirasti dėl kaulų čiulpų transplantacijos arba sukeliant toleranciją), imuniniai sutrikimai, susiję su implanto atmetimu, chroniški atmetimai ir audinių arba ląstelių alo- arba ksenoimplantai, įskaitant kietus organus, odą, saleles, raumenis, hepatocitus, neuronus. Imunoproliferacinių ligų pavyzdžiais yra, bet jais neapsiribojama, psoriazė, T ląstelių limfoma, T ląstelių ūmi limfoblastinė leukemija, sėklidinė angiocentrinė T ląstelių limfoma, gerybinis limfocitinis angitas, vilkligė (pvz. raudonoji vilkligė, inkstų vilkligė), Hashimoto tiroiditas, pirminė miksiedema, Graves'o liga, piktybinė mažakraujystė, autoimuninis atrofines gastritas, Adisono liga, diabetas (pvz. nuo insulino priklausantis cukrinis diabetas, I tipo cukrinis diabetas), geros ganyklos sindromas, sunkioji miastenija, pūslinė, Krono liga, simpatinė oftalmija, autoimuninis uveitas, išsėtinė sklerozė, autoimuninė hemolitinė anemija, idiopatinė trombocitopenija, pirminė tulžies cirozė, chroninis hepatitas, opinis kolitas, Sjogren'o sindromas, reumatinės ligos (pvz., reumatinis artritas), polimiozitas, skleroderma ir mišri jungiamojo audinio liga.

Čia naudojamas terminas "reumatinės ligos" reiškia bet kokią ligą, kuri veikia sąnarius, kaulus, minkštuosius audinius arba stuburo smegenis (Mathies, H. 1983, *Rheuma*) ir apima uždegiminį reumatą, degeneracinį reumatą, ekstraartikulinį reumatą ir kolageno ligas. Be to, reumatinės ligos apima, bet neapsiribojama, chronišką poliartritą, artropatinę psoriazė, ankilozinį spondilitą, reumatinį artritą, mazginį panarteritą, sisteminę raudonąją vilkligę, progresuojančią sisteminę sklerodermiją, žastikaulio ir menties periartritą, uratinį artritą, chondrokalcinozę, dermatomiozitą, raumenų reumatą, miozitą ir miogeliozę. Žinoma, kad kai kurios reumatinės ligos yra autoimuninės ligos, kurias sukelia pakitęs subjekto imuninis atsakas.

Čia naudojamas terminas "genų terapija" yra ligos gydymo būdas manipuliuojant taip, kad nukleorūgščių seka yra perkeliama į ląstelę; tada ląstelė ekspresuoja bet kokį genetinį produktą, kurį koduoja ši nukleorūgštis. Pavyzdžiui, specialistams žinoma, kad perkelti nukleorūgštį galima įterpiant

dominančią nukleorūgštį turintį ekspresijos vektorių į ląsteles *ex vivo* arba *in vivo* įvairiais metodais, įskaitant, pavyzdžiui, kalcio fosfato nusodinimą, dietilaminoetildekstrą, polietilenglikolį (PEG), elektroporaciją, tiesioginę injekciją, lipofekciją arba virusinę infekciją (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989); Kriegler M. *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (W.H. Freeman and Co, New York, N.Y., 1993) ir Wu, *Methods in Enzymology* (Academic Press, New York, 1993), kurie duodami kaip literatūros šaltiniai). Kitu atveju, dominančios nukleorūgščių sekos gali būti perkeltos į ląsteles *in vivo* įvairiuose vektoriuose ir įvairiausiais būdais, įskaitant, pavyzdžiui, tiesioginį nukleorūgšties įvedimą į subjektą (Williams et al., 1991 *PNAS* 88:2726-2730) arba įterpiant nukleorūgštį į virusinį vektorių ir infekuojant subjektą šiuo virusu (Battleman et al., 1993 *J. Neurosci.*, 13:94-951; Carroll et al., 1993, *J. Cell Biochem.*, 17E:241; Lebkowski et al., JAV patentas 4,354,678; Davison and Elliott, *Molecular Virology: A Practical Approach* (IRL Press, New York, 1993)). Kiti pernešimui *in vivo* naudojami metodai yra nukleorūgšties įkapsuliavimas į liposomas ir tiesioginis liposomų arba liposomų, sujungtų su hemaglutinuojančiu Sendai virusu, perkėlimas subjektui (JAV patentas 5,824,655, įtrauktas kaip literatūros šaltinis). Transfekuotos arba infekuotos ląstelės ekspresuoja šių nukleorūgščių koduojamus baltyminius produktus ligos būklei arba ligos simptomams pagerinti.

Norint, kad čia aprašytas išradimas būtų geriau suprantamas, duodamas šis tolimesnis aprašymas.

Išradimo kompozicijos ir jų panaudojimo būdai

Šiame išradime yra pateikiamos kompozicijos, skirtos panaudoti imuninių sistemos ligų, tokių kaip reumatinės ligos, gydymui, skiriant subjektui efektyvų kiekį ligando, kuris rišasi su B7, pavyzdžiui tirpių CTLA4 molekulių (tokių kaip CTLA4Ig ir/arba L104EA29YIg) ir mAb, kurie atpažįsta ir rišasi su B7. Efektyvus kiekis yra apibūdinamas kaip tirpių CTLA4 molekulių kiekis, kuris, kai jos susiriša su B7 molekulėmis ant B7-teigiamų ląstelių, inhibuoja B7 molekulių susirišimą su endogeniniais ligandais, tokiais kaip CTLA4 ir CD28.

Tinkamiausiame įgyvendinimo variante imuninė liga yra reumatinė liga. Reumatinės ligos yra bet kokios ligos, kurioms yra būdinga (i) kūno raumenų-skeleto arba jungiamojo audinio struktūrų, ypač sąnarių, įskaitant raumenis, sausgysles, kremzles, sinovinius ir pluoštinius audinius, uždegimas arba degeneracija, (ii) lydintis sąnarių patinimas, sąnarių jautrumas, uždegimas, rytinis nejudrumas ir/arba skausmas, arba šių struktūrų judrumo arba funkcijos pablogėjimas ir, tam tikrais atvejais, (iii) dažnai lydintis reumatinio faktoriaus ir kitų uždegiminių pakaitinių žymių serologiniai duomenys.

Reumatine liga yra, bet ja neapsiribojama, reumatinis artritas. Reumatinio artrito simptomai yra sąnarių patinimas, sąnarių jautrumas, uždegimas, rytinis nejudrumas ir skausmas, sukeliantis fizinį bejėgiškumą. Subjektai, turintys užleistą artrito stadiją, kenčia dėl struktūrinio pažeidimo simptomų ir sekinančio skausmo. Kiti organai taip pat gali būti pakenkti dėl šio autoimuninio mechanizmo.

Kompozicijos

Šiame išradime yra pateikiamos imuninėms ligoms, tokioms kaip reumatinis artritas, gydyti skirtos kompozicijos, į kurias įeina tirpios CTLA4 molekulės. Be to, šiame išradime yra pateikiamos kompozicijos, į kurias įeina biologinis agentas, kuris žmogaus organizme inhibuoja T-ląstelės funkciją, bet ne T-ląstelės suardymą, kontaktuojant žmogaus B7-teigiamoms ląstelėms su tirpiu CTLA4. Tirpaus CTLA4 pavyzdžiais yra CTLA4Ig ir tirpi CTLA4 mutantinė molekulė, pvz. L104EAYIg.

CTLA4 molekulės su mutantinėmis ir laukinio tipo sekomis, gali būti padarytos tirpiomis pašalinant CTLA4 transmembraninį segmentą (Oaks, M.K., et al., 2000, *Cellular Immunology* 201:144-153).

Kitu atveju, tirpios CTLA4 molekulės su mutantinėmis arba laukinio tipo sekomis gali būti sulieti baltymai, kuriuose CTLA4 molekulės yra sulietos su ne-CTLA4 liekanomis, tokiomis kaip imunoglobulino (Ig) molekulės, kurios padaro CTLA4 molekules tirpiomis. Pavyzdžiui, CTLA4 sulietas baltymas gali turėti CTLA4 ekstraląstelinę dalį, sulietą su imunoglobulino pastovia sritimi,

gaunant CTLA4Ig molekulę (fig.24) (Linsley, P.S. et al., 1994, *Immunity* 1:793-80).

Klinikiniam naudojimui pageidautina, kad imunoglobulino sritis nesukeltų žalingo imuninio atsako subjekte. Tinkamiausia liekana yra imunoglobulino pastovioji sritis, įskaitant žmogaus arba beždžionės imunoglobulino pastoviąsias sritis. Vienas tinkamos imunoglobulino srities pavyzdys yra žmogaus C γ 1, apimantis šarnyrą, CH2 ir CH3 sritis, kurios gali tarpininkauti efektorinėse funkcijose, tokiose kaip susirišimas su Fc receptoriais, tarpininkaujant nuo komplemento priklausančiame citotoksiškume (CDC) arba tarpininkaujant nuo antikūno priklausančiame ląstelių tarpininkaujamame citotoksiškume (ADCC). Imunoglobulino liekanoje gali būti viena arba daugiau mutacijų (pvz. CH2 dalyje, efektorinėms funkcijoms, tokioms kaip CDC arba ADCC sumažinti), kur mutacijos moduliuoja imunoglobulino sugebėjimą susirišti su jo ligandu, didinant arba mažinant imunoglobulino susirišimo gebą su Fc receptoriais. Pavyzdžiui, imunoglobulino mutacijomis gali būti bet kurio arba visų cisteino liekanų pakeitimai šarnyro dalyje, pavyzdžiui +130, +136 ir +139 padėtyse esantys cisteinai yra pakeisti serinu (fig.24). Imunoglobulino molekulėje +148 padėtyje esantis prolinas gali būti pakeistas serinu, kaip parodyta fig.24. Be to, kaip mutacija imunoglobulino liekanoje +144 padėtyje esantis leucinas gali būti pakeistas fenilalaninu, +145 padėtyje esantis leucinas gali būti pakeistas glutamo rūgštimi arba +147 padėtyje esantis glicinas gali būti pakeistas alaninu.

Kitos ne-CTLA4 liekanos, tinkamos naudoti tirpiose CTLA4 molekulėse arba tirpiose mutantinėse CTLA4 molekulėse yra, bet jomis neapsiribojama, p97 molekulė, env gp120 molekulė, E7 molekulė ir ova molekulė (Dash, B., et al. 1994 *J. Gen. Virol.* 75 (Pt 6):1389-97; Ikeda, T., et al. 1994 *Gene* 138(1-2):193-6; Falk, K., et al. 1993 *Cell Immunol.* 150(2):447-52; Fujisaka, K. et al. 1994 *Virology* 204(2):789-93). Taip pat yra galimos ir kitos molekulės (Gerard, C. et al. 1994 *Neuroscience* 62(3):721-739; Byrn, R. et al. *J. Virol.* 1989 63(10):4370-4375; Smith, D. et al., 1987 *Science* 238:1704-1707; Lasky, L., 1996 *Science* 233:209).

[šio išradimo tirpią CTLA4 molekulę gali įeiti signalinio peptido seka, prijungta prie molekulės CTLA4 dalies ekstraląstelinės srities N-baigmės galo. Šis signalinis peptidas gali būti bet kokia seka, kuri duoda galimybę sekretuoti molekulę, įskaitant signalinį peptidą iš onkostatino M (Malik, et al., (1989) *Molec. Cell. Biol.* 9:2847-2853) arba CD5 (Jones, N.H. et al., (1986) *Nature* 323:346-349) arba signalinį peptidą iš bet kokio ekstraląstelinio baltymo.

Šio išradimo tirpi CTLA4 molekulė gali turėti onkostatino M signalinį peptidą, prijungtą prie CTLA4 ekstraląstelinės dalies N-baigmės galo, ir žmogaus imunoglobulino molekulę (pvz. šarnyrą, CH2 ir CH3), prijungtą prie CTLA4 (laukinio tipo arba mutuotos) ekstraląstelinės dalies C-baigmės galo. Į šią molekulę įeina onkostatino M signalinis peptidas, apimantis aminorūgščių seką nuo metionino -26 padėtyje iki alanino -1 padėtyje, CTLA4 dalį, apimančią aminorūgščių seką nuo metionino +1 padėtyje iki asparto rūgšties +124 padėtyje, jungiančiąją aminorūgšties liekaną glutaminą +125 padėtyje, ir imunoglobulino dalį, apimančią aminorūgščių seką nuo +126 padėtyje esančios glutamo rūgšties iki +357 padėtyje esančio lizino.

Konkrečiau, šio išradimo tirpios CTLA4 mutantinės molekulės, turinčios toliau aprašytas mutuotas CTLA4 sekas, yra sulietos molekulės, apimančios žmogaus IgG1 liekanas, sulietas su mutuotais CTLA4 fragmentais.

Viename įgyvendinimo variante tirpios CTLA4 mutantinės molekulės turi IgG1, sulietą su CTLA4 fragmentu, turinčiu vienos vietos mutaciją ekstraląstelinėje dalyje. CTLA4 ekstraląstelinė dalis apima nuo metionino +1 padėtyje iki asparto rūgšties +124 padėtyje (pvz. fig.23). CTLA4 ekstraląstelinė dalis gal apimti nuo alanino -1 padėtyje iki asparto rūgšties +124 padėtyje (pvz. fig.23). Vienos vietos mutacijos yra duodamos toliau, kuriose +104 padėtyje esantis leucinas yra pakeistas bet kokia kita aminorūgštimi:

Vienos vietos mutantas:	Kodono pakeitimas:
L104EIg	Glutamo rūgštis GAG
L104SIg	Serinas AGT
L104ETIg	Treoninas ACG
L104AIg	Alaninas GCG

L104Wlg	Triptofanas TGG
L104Qlg	Glutaminas CAG
L104Klg	Lizinas AAG
L104Rlg	Argininas CGG
L104Glg	Glicinas GGG

Be to, šiame išradime yra pateikiamos mutantinės molekulės, turinčios CTLA4 ekstraląstelinę dalį su dviem mutacijomis, sulietą su IgCy1 liekana. Pavyzdžiais yra tokios molekulės, kuriose +104 padėtyje esantis leucinas yra pakeistas kita aminorūgštimi (pvz. glutamo rūgštimi), +105 padėtyje esantis glicinas, +25 padėtyje esantis serinas, +30 padėtyje esantis serinas arba +29 padėtyje esantis alaninas yra pakeisti bet kuria kita aminorūgštimi:

Dviejų vietų mutantas:	Kodono pakeitimas:
L104EG105Flg	Fenilalaninas TTC
L104EG105Wlg	Triptofanas TGG
L104EG105Llg	Leucinas CTT
L104ES25Rlg	Argininas CGG
L104ET30Glg	Glicinas GGG
L104ET30Nlg	Asparaginas ATT
L104EA29Ylg	Tirozinas TAT
L104EA29Llg	Leucinas TTG
L104EA29Tlg	Treoninas ACT
L104EA29Wlg	Triptofanas TGG

Be to, šiame išradime yra pateikiamos mutantinės molekulės, turinčios CTLA4 ekstraląstelinę dalį su trimis mutacijomis, sulietą su IgCy1 liekana. Pavyzdžiais yra tokios molekulės, kuriose +104 padėtyje esantis leucinas yra pakeistas kita aminorūgštimi (pvz. glutamo rūgštimi), +29 padėtyje esantis alaninas yra pakeistas kita aminorūgštimi (pvz. tirozinu) ir +25 padėtyje esantis serinas yra pakeistas kita aminorūgštimi:

Trijų vietų mutantas:	Kodono pakeitimas:
L104EA29YS25KIg	Lizinas AAA
L104EA29YS25KIg	Lizinas AAG
L104EA29YS25NIg	Asparaginas AAC
L104EA29YS25RIg	Argininas CGG

Tirpios CTLA4 mutantinės molekulės gali turėti jungiančią aminorūgšties liekaną, kuri yra tarp CTLA4 dalies ir molekulės Ig dalies. Jungiančia aminorūgštimi gali būti bet kokia aminorūgštis, įskaitant glutaminą. Jungianti aminorūgštis gali būti įvesta specialistams žinomais molekulinės arba cheminės sintezės metodais.

Šiame išradime yra pateikiama tirpi CTLA4 mutantinė molekulė, turinti signalinio peptido seką, prijungtą prie CTLA4 mutantinės molekulės ekstraląstelinės dalies N-baigmės galo. Šiuo signaliniu peptidu gali būti bet kokia seka, kuri suteikia galimybę sekretuoti mutantinę molekulę, įskaitant signalinį peptidą iš onkostatino M (Malik, et al., 1989 *Molec. Cell. Biol.* 9:2847-2853) arba CD5 (Jones, N.H. et al., 1986 *Nature* 323:346-349), arba signalinį peptidą iš bet kokio ekstraląstelinio baltymo.

Šiame išradime yra pateikiamos tirpios CTLA4 mutantinės molekulės, turinčios vienos vietos mutaciją CTLA4 ekstraląstelinėje dalyje, tokios kaip L104EIg (kaip parodyta fig.18) arba L104SIg, kur L104EIg ir L104SIg yra mutuotos jų CTLA4 sekose taip, kad +104 padėtyje esantis leucinas yra atitinkamai pakeistas glutamo rūgštimi arba serinu. Į vienos vietos mutantinės molekulės dar įeina CTLA4 dalys nuo +1 padėtyje esančio metionino iki +124 padėtyje esančios asparto rūgšties, jungianti aminorūgšties liekana glutaminas +125 padėtyje ir imunoglobulino dalis nuo +126 padėtyje esančios glutamo rūgšties iki +357 padėties lizino. Mutantinės molekulės imunoglobulino dalis taip pat gali būti mutuota taip, kad +130, +136 ir +139 padėtyse esantys cisteinai yra pakeisti serinu ir +148 padėtyje esantis prolinas yra pakeistas serinu. Kitu atveju vienos vietos tirpi CTLA4 mutantinė molekulė gali turėti CTLA4 dalį nuo -1 padėtyje esančio alanino iki +124 padėtyje esančios asparto rūgšties.

Šiame išradime yra pateikiamos tirpios CTLA4 mutantinės molekulės, turinčios dviejų vietų mutaciją CTLA4 ekstraląstelinėje dalyje, tokios kaip L104EA29YIg, L104EA29LIg, L104EA29TIg arba L104EA29WLIg, kuriose +104 padėtyje esantis leucinas yra pakeistas glutamo rūgštimi, o +29 padėtyje esantis alaninas yra atitinkamai pakeistas tirozinu, leucinu, treoninu ir triptofanu. L104EA29YIg, L104EA29LIg, L104EA29TIg arba L104EA29WLIg sekos, prasidedančios nuo +1 padėtyje esančio metionino ir besibaigiančios +357 padėties lizinu, plius signalinio (lyderinio) peptido seka į sekas, parodytas atitinkamai fig. 19-22. Į dviejų vietų mutantines molekules dar įeina CTLA4 dalys nuo +1 padėtyje esančio metionino iki +124 padėtyje esančios asparto rūgšties, jungianti aminorūgšties liekana glutaminas +125 padėtyje ir imunoglobulino dalis nuo +126 padėtyje esančios glutamo rūgšties iki +357 padėties lizino. Mutantinės molekulės imunoglobulino dalis taip pat gali būti mutuota taip, kad +130, +136 ir +139 padėtyse esantys cisteinai yra pakeisti serinu ir +148 padėtyje esantis prolinas yra pakeistas serinu. Kitu atveju šios mutantinės molekulės gali turėti CTLA4 dalį nuo -1 padėtyje esančio alanino iki +124 padėtyje esančios asparto rūgšties.

Šiame išradime yra pateikiamos tirpios CTLA4 mutantinės molekulės, turinčios dviejų vietų mutaciją CTLA4 ekstraląstelinėje dalyje, tokios kaip L104EG105FIg, L104EG105WLIg ir L104EG105LIg, kuriose +104 padėtyje esantis glicinas yra pakeistas atitinkamai fenilalaninu, triptofanu ir leucinu. Į šias dviejų vietų mutantines molekules dar įeina CTLA4 dalys nuo +1 padėtyje esančio metionino iki +124 padėtyje esančios asparto rūgšties, jungianti aminorūgšties liekana glutaminas +125 padėtyje ir imunoglobulino dalis nuo +126 padėtyje esančios glutamo rūgšties iki +357 padėties lizino. Imunoglobulino dalis taip pat gali būti mutuota taip, kad +130, +136 ir +139 padėtyse esantys cisteinai yra pakeisti serinu ir +148 padėtyje esantis prolinas yra pakeistas serinu. Kitu atveju šios mutantinės molekulės gali turėti CTLA4 dalį nuo -1 padėtyje esančio alanino iki +124 padėtyje esančios asparto rūgšties.

Šiame išradime yra pateikiamas L104ES25RIg, kuris yra dviejų vietų mutantinė molekulė, apimanti CTLA4 dalį nuo +1 padėtyje esančio metionino iki +124 padėtyje esančios asparto rūgšties, jungiančią aminorūgšties liekaną glutaminą +125 padėtyje ir imunoglobulino dalį nuo +126 padėtyje esančios

glutamo rūgštis iki +357 padėties lizino. Dalis, turinti CTLA4 ekstraląstelinę dalį yra mutuota taip, kad +25 padėtyje esantis serinas yra pakeistas argininu, o +104 padėtyje esantis leucinas yra pakeistas glutamo rūgštimi. Kitu atveju L104ES25RIg gali turėti CTLA4 dalį nuo -1 padėtyje esančio alanino iki +124 padėtyje esančios asparto rūgštis.

Šiame išradime yra pateikiamos tirpios CTLA4 mutantinės molekulės, turinčios dviejų vietų mutaciją CTLA4 ekstraląstelinėje dalyje, tokios kaip L104ET30GIg ir L104ET30NIg, kuriose +104 padėtyje esantis leucinas yra pakeistas glutamo rūgštimi, o +30 padėtyje esantis treoninas yra pakeistas atitinkamai glicinu ir asparaginu. Į šias dviejų vietų mutantines molekules dar įeina CTLA4 dalys nuo +1 padėtyje esančio metionino iki +124 padėtyje esančios asparto rūgštis, jungianti aminorūgštis liekana glutaminas +125 padėtyje ir imunoglobulino dalis nuo +126 padėtyje esančios glutamo rūgštis iki +357 padėties lizino. Imunoglobulino dalis taip pat gali būti mutuota taip, kad +130, +136 ir +139 padėtyse esantys cisteinai yra pakeisti serinu ir +148 padėtyje esantis prolinas yra pakeistas serinu. Kitu atveju šios mutantinės molekulės gali turėti CTLA4 dalį nuo -1 padėtyje esančio alanino iki +124 padėtyje esančios asparto rūgštis.

Šiame išradime yra pateikiamos tirpios CTLA4 mutantinės molekulės, turinčios trijų vietų mutaciją CTLA4 ekstraląstelinėje dalyje, tokios kaip L104EA29YS25KIg, L104EA29YS25NIg, L104EA29YS25RIg, kuriose +104 padėtyje esantis leucinas yra pakeistas glutamo rūgštimi, +29 padėtyje esantis alaninas yra pakeistas tirozinu, o +25 padėtyje esantis serinas yra pakeistas atitinkamai lizinu, asparaginu ir argininu. Į šias trijų vietų mutantines molekules dar įeina CTLA4 dalys nuo +1 padėtyje esančio metionino iki +124 padėtyje esančios asparto rūgštis, jungianti aminorūgštis liekana glutaminas +125 padėtyje ir imunoglobulino dalis nuo +126 padėtyje esančios glutamo rūgštis iki +357 padėties lizino. Imunoglobulino dalis taip pat gali būti mutuota taip, kad +130, +136 ir +139 padėtyse esantys cisteinai yra pakeisti serinu ir +148 padėtyje esantis prolinas yra pakeistas serinu. Kitu atveju šios mutantinės molekulės gali turėti CTLA4 dalį nuo -1 padėtyje esančio alanino iki +124 padėtyje esančios asparto rūgštis.

Kiti tirpių CTLA4 mutantinių molekulių įgyvendinimo variantai apima chimerines CTLA4/CD28 homologines mutantines molekules, kurios rišasi su

B7 (Peach, R.J., et al., 1994 *J Exp Med* 180:2049-2058). Tokių chimerinių CTLA4/CD28 mutantinių molekulių pavyzdžiais yra HS1, HS2, HS3, HS4, HS5, HS6, HS4A, HS4B, HS7, HS8, HS9, HS10, HS11, HS12, HS13 ir HS14 (JAV patentas, Nr. 5,773,253).

Tinkamiausi šio išradimo įgyvendinimo variantai yra tirpios CTLA4 molekulės, tokios kaip CTLA4Ig (kaip parodyta fig.24, prasidedanti nuo +1 padėtyje esančio metionino ir besibaigianti +357 padėties lizinu) ir tirpi CTLA4 mutantinė molekulė L104EA29YIg (kaip parodyta fig.19, prasidedanti nuo +1 padėtyje esančio metionino ir besibaigianti +357 padėties lizinu). Išradime taip pat yra pateikiamos nukleorūgšties molekulės, apimančios nukleotidų sekas, koduojančias aminorūgščių sekas, atitinkančias šio išradimo tirpias CTLA4 molekules. Viename įgyvendinimo variante nukleorūgšties molekulė yra DNR (pvz. kDNR) arba jos hibridas. CTLA4Ig koduojanti DNR (fig.24) buvo deponuota 1991 m. gegužės 31 d. Ametikos tipinių kultūrų kolekcijoje (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, ir jai buvo priskirtas ATCC depozito numeris ATCC 68629. L104EA29YIg koduojanti DNR (seka duota fig.19) buvo deponuota 2000 m. birželio 19 d. ATCC, ir jai buvo priskirtas ATCC depozito numeris PTA-2104. Kitu atveju nukleorūgšties molekulė yra RNR arba jos hibridas.

Šiame išradime taip pat yra pateikiamas vektorius, į kurį įeina šio išradimo nukleotidų sekos. Vektorių pavyzdžiais yra, bet jais neapsiribojama, vektoriai žinduolių šeiminių ląstelėms (pvz., BVP-1, pHyg, pRSV, pSV2, pTK2 (Maniatis); pIRES (Clontech); pRc/CMV2, pRc/RSV, pSFV1 (Life Technologies); pVPakc vektoriai, pCMV vektoriai, pSG5 vektoriai (Stratagene), retrovirusiniai vektoriai (pvz. pFB vektoriai (Stratagene)), pCDNA-3 (Invitrogen) arba jų modifikuotos formos, adenovirusiniai vektoriai; susiję su adenovirusu vektoriai, bakuloviruso vektoriai, mielių vektoriai (pvz. pESC vektoriai (Stratagene)).

Taip pat yra pateikiama šeimininko vektoriaus sistema. Šeimininko vektoriaus sistema apima šio išradimo vektorių tinkamo šeimininko ląstelėje. Tinkamų šeiminių pavyzdžiais yra, bet jais neapsiribojama, prokariotinės ir eukariotinės ląstelės. Pagal šio išradimo praktiką eukariotinės ląstelės taip pat yra tinkamos šeimininko ląstelės. Eukariotinių ląstelių pavyzdžiais yra bet kokios gyvūnų ląstelės, kaip pirminės, taip ir imortalizuotos, mielės (pvz.

Saccharomyces cerevisiae, *Schizosaccharomyces pombe* ir *Pichia pastoris*) ir augalų ląstelės. Gyvūnų ląstelių, kurios gali būti naudojamos šeiminingais, pavyzdžiais yra mielomos, COS ir CHO ląstelės. Konkrečios CHO ląstelės yra, bet jomis neapsiribojama, DG44 (Chasin, et al., 1986 *Som. Cel. Molec. Genet.* 12:555-556; Kolkekar 1997 *Biochemistry* 36:10901-10909), CHO-K1 (ATCC No. CCL-61), CHO-K1 Tet-On ląstelių linija (Clontech), CHO pažymėta ECACC 85050302 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), CHO klonas 13 (GEIMO, Genova, IT), CHO klonas B (GEIMO, Genova, IT), CHO-K1/SF, pažymėta ECACC 93061607 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK) ir RR-CHOK1, pažymėta ECACC 92052129 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK). Augalų ląstelių pavyzdžiais yra tabako (ištisas augalas, ląstelių kultūra arba antauga), kukurūzų, sojos ir ryžių ląstelės. Taip pat priimtinos yra kukurūzų, sojos ir ryžių sėklos.

Šio išradimo mutantinės molekulės gali būti išskirtos kaip gamtoje atsirandantys polipeptidai arba iš bet kokio šaltinio, tokio kaip gamtinis, sintetinis, pusiau sintetinis arba rekombinantinis. Taigi, CTLA4 mutantinės polipeptidinės molekulės gali būti išskirtos kaip gamtoje atsirandantys baltymai iš bet kokių rūšių, ypatingai žinduolių, įskaitant jaučius, avis, kiaules, peles, arklius, o geriausiai žmones. Kitu atveju, CTLA4 mutantinės polipeptidinės molekulės gali būti išskirtos kaip rekombinantiniai polipeptidai, kurie yra ekspresuoti prokariotinių ir eukariotinių šeiminingų ląstelėse arba išskirti kaip chemiškai sintezuotas polipeptidas.

Patyręs specialistas nesunkiai panaudos standartinius išskyrimo būdus išskirtoms CTLA4 mutantinėms molekulėms gauti. Išskyrimo prigimtis ir laipsnis priklausys nuo šaltinio ir numatyto išskirtų molekulių panaudojimo tikslo.

CTLA4 mutantinės molekulės ir jų fragmentai bei dariniai gali būti gaunami rekombinantiniais metodais. Tam tikslui su išskirta nukleotidų seka, koduojančia laukinio tipo CTLA4 molekules, gali būti manipuluojama, įvedant mutacijas, kurios duoda nukleotidų sekas, koduojančias CTLA4 mutantines polipeptidines molekules. Pavyzdžiui, CTLA4 mutantines molekules koduojančios nukleotidų sekos gali būti generuojamos, panaudojant nukreiptos į vietą mutagenezės metodus, naudojant pradmenis ir PGS amplifikaciją. Pradmenyse gali būti specifinės sekos, skirtos norimoms

mutacijoms įvesti. Kitu atveju, pradmenys gali būti skirti atsitiktinėms arba pusiau atsitiktinėms sekoms įvesti, gaunant atsitiktines mutacijas. CTLA4 mutantiniams polinukleotidams, koduojantiems CTLA4 mutantinius polipeptidus, generuoti ir išskirti gali būti naudojami standartiniai rekombinantiniai metodai (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, Sambrook, Fritsch, and Maniatis 1989, Cold Spring Harbor Press) ir PGS technologija (JAV patentas Nr. 4,603,102).

Šis išradimas apima imuninių ligų gydymui skirtas farmacinės kompozicijas, turinčias efektyvų kiekį tirpių CTLA4 molekulių. Tam tikruose įgyvendinimo variantuose imuninės sistemos ligoje tarpininkauja CD28/CTLA4 sąveikos. Pageidautina, kad tirpios CTLA4 molekulės būtų tirpios CTLA4 molekulės su laukinio tipo seka ir/arba tirpios CTLA4 molekulės turėtų vieną arba daugiau mutacijų ekstraląstelinėje CTLA4 dalyje. Į farmacinės kompozicijas gali įeiti tirpios CTLA4 baltymo molekulės ir/arba nukleorūgšties molekulės, ir/arba vektoriai, koduojantys šias molekules. Tinkamiausiuose įgyvendinimo variantuose tirpios CTLA4 molekulės turi CTLA4 ekstraląstelinės dalies aminorūgščių sekas, parodytas fig.24 arba 19 (atitinkamai CTLA4lg arba L104EA29Y). Dar geriau, kai tirpi CTLA4 mutantinė molekulė yra čia aprašytas L104EA29Ylg. Į kompozicijas gali įeiti dar ir kiti terapiniai agentai, įskaitant, bet neapsiribojant, vaistinius toksinus, fermentus, antikūnus arba konjugatus.

Pagal standartinę praktiką yra pateikiamos farmacinės kompozicijos, kuriose šio išradimo molekulės yra sumaišytos su specialistams žinomais priimtinais nešikliais ir adjuvantais. Geriausia, kai į farmacinės kompozicijas įeina tinkami nešikliai ir adjuvantai, kurie yra bet kokia medžiaga, kuri sumaišyta su šio išradimo molekule (pvz. tirpia CTLA4 mutantine molekule, tokia kaip CTLA4lg arba L104EA29Ylg) išlaiko šios molekulės aktyvumą ir neveikia subjekto imuninės sistemos. Tokiais nešikliais ir adjuvantais yra, bet jais neapsiribojama, jonitai, aliuminio oksidas, lecitinas, serumo baltymai, tokie kaip žmogaus serumo albuminas, buferinės medžiagos, tokios kaip fosfatai, glicinas, sorbo rūgštis, kalio sorbatas, sočiųjų augalinių riebalų rūgščių dalinių gliceridų mišiniai, fosfatinio buferio ir valgomosios druskos tirpalas, vanduo, emulsijos (pvz. alyvos/vandens emulsijos), druskos arba elektrolitai, tokie kaip protamino sulfatas, dinatrio vandenilio fosfatas, kalio

vandenilio fosfatas, natrio chloridas, cinko druskos, koloidinis silicio dioksidas, magnio trisilikatas, polivinilpirolidonas, medžiagos celiuliozės pagrindu ir polietilenglikolis. Kitais nešikliais taip pat gali būti sterilūs tirpalai; tabletės, įskaitant padengtas tabletes, ir kapsulės. Paprastai tokie nešikliai turi pagalbinių medžiagų, kaip antai krakmolo, pieno cukraus (pvz. sacharozės, gliukozės, maltozės), tam tikros rūšies molio, želatinos, stearino rūgšties arba jos druskų, magnio arba kalcio stearato, talko, augalinių riebalų arba aliejų, sakų, glikolių, arba kitų žinomų pagalbinių medžiagų. Tokiuose nešikliuose taip pat gali būti skonį ir spalvą duodančių priedų arba kitų ingredientų. Tokius nešiklius turinčios kompozicijos yra sukomponuojamos gerai žinomais įprastais būdais. Tokios kompozicijos taip pat gali būti sukomponuojamos su įvairiomis lipidų kompozicijomis, tokiomis kaip, pavyzdžiui, liposomos, bei įvairiomis polimerinėmis kompozicijomis, tokiomis kaip polimeriniai mikrorutuliukai.

Kompozicijų panaudojimo būdai

Šiame išradime yra pateikiami funkcinų CTLA4- ir CD28-teigiamų ląstelių sąveikos su B7-teigiamomis ląstelėmis reguliavimo būdai. Šie būdai apima B7-teigiamų ląstelių suleidimo į kontaktą su tirpia šio išradimo CTLA4 molekule taip, kad susidarytų tirpūs CTLA4/B7 kompleksai, trukdantys endogeninės CTLA4 ir/arba CD28 molekulės sąveikai su B7 molekule.

Šiame išradime yra taip pat pateikiami T-ląstelių funkcijos inhibavimo, bet ne T-ląstelių suardymo žmogaus organizme būdai, suleidžiant į kontaktą žmogaus B7-teigiamas ląsteles su tirpia CTLA4. Tirpios CTLA4 pavyzdžiais yra tirpus CTLA4Ig ir tirpi CTLA4 mutantinė molekulė, pvz. L104EA29YIg.

Šiame išradime taip pat yra pateikiama terapinė kompozicija, kurioje yra tirpios šio išradimo CTLA4 molekulės, skirta panaudoti imuninės sistemos ligų, tokių kaip reumatinis artritas, gydymui, skiriant subjektui jos tokį kiekį, kad jis efektyviai palengvintų bent vieną iš su imuninės sistemos ligomis susijusių simptomų. Šio išradimo terapinė kompozicija gali būti panaudota ilgalaikiam imuninės sistemos ligų gydymui, blokuojant T-ląstelės/B7-teigiamos ląstelės sąveikas, tokiu būdu blokuojant T-ląstelės stimuliacinius ir kostimuliacinius signalus, tokius kaip B7 susirišimą su CD28, kuris sukelia T-

ląstelių nejautrumą ir toleranciją. Imuninės sistemos ligos apima, bet jomis neapsiriboja, autoimunines ligas, imunoproliferacines ligas ir su implantais susijusius sutrikimus. Su implantu susijusių ligų pavyzdžiais yra implantas-prieš-šeimininką liga (GVHD) (pvz. liga, kuri gali atsirasti dėl kaulų čiulpų transplantacijos arba sukeliant toleranciją), imuniniai sutrikimai, susiję su implanto atmetimu, chroniški atmetimai ir audinių arba ląstelių alo- arba ksenoimplantai, įskaitant kietus organus, odą, saleles, raumenis, hepatocitus, neuronus. Imunoproliferacinių ligų pavyzdžiais yra, bet jais neapsiribojama, psoriazė, T ląstelių limfoma, T ląstelių ūmi limfoblastinė leukemija, sėklidinė angiocentrinė T ląstelių limfoma, gerybinis limfocitinis angitas; ir autoimuninės ligos, tokios kaip vilkligė (pvz. raudonoji vilkligė, inkstų vilkligė), Hashimoto tiroiditas, pirminė miksedema, Graves'o liga, piktybinė mažakraujystė, autoimuninis atrofinis gastritas, Adisono liga, diabetas (pvz. nuo insulino priklausantis cukrinis diabetas, I tipo cukrinis diabetas, II tipo cukrinis diabetas), geros ganyklos sindromas, sunkioji miastenija, pūslinė, Krono liga, simpatinė oftalmija, autoimuninis uveitas, išsėtinė sklerozė, autoimuninė hemolitinė anemija, idiopatinė trombocitopenija, pirminė tulžies cirozė, chroninis hepatitas, opinis kolitas, Sjogren'o sindromas, reumatinės ligos (pvz., reumatinis artritas), polimiozitas, skleroderma ir mišri jungiamojo audinio liga.

Šio išradimo tirpios CTLA4 molekulės pasižymi inhibicinėmis savybėmis *in vivo*. Sąlygomis, kuriomis T-ląstelės/B7-teigiamos ląstelės sąveikos, pavyzdžiui T-ląstelės/B-ląstelės sąveikos, atsiranda dėl kontakto tarp T-ląstelių ir B7-teigiamų ląstelių, įvestų CTLA4 molekulių susirišimas su B7-teigiamomis ląstelėmis, pavyzdžiui, B-ląstelėmis, gali trukdyti, t.y. inhibuoti, T-ląstelės/B7-teigiamos ląstelės sąveikas, ir tokiu būdu reguliuoti imuninius atsakus.

Šiame išradime yra pateikiami imuninių atsakų negatyviosios moduliacijos būdai. Imuninio atsako negatyvioji moduliacija šio išradimo tirpiomis CTLA4 molekulėmis gali vykti inhibuojant arba blokuojant jau besivystantį imuninį atsaką arba gali apimti apsisaugojimą nuo imuninio atsako sukėlimo. Tirpios šio išradimo CTLA4 molekulės gali inhibuoti aktyvuotų T ląstelių funkcijas, tokias kaip limfocitų proliferacija ir citokinų sekrecija, slopinant T ląstelių atsakus arba sukeliant specifinį toleravimą T

ląstelėse, arba abu šiuos procesus. Be to, tirpios šio išradimo CTLA4 molekulės, trukdančios perduoti signalą CTLA4/CD28/B7 keliu, gali inhibuoti T-ląstelių proliferaciją ir/arba citokinų sekreciją ir tokiu būdu sumažinti audinio destruktiją bei padaryti T-ląsteles nereaguojančiomis arba inertiškomis.

[tinkamiausią šio išradimo įgyvendinimo variantą įeina tirpios CTLA4 mutantinės molekulės L104EA29YIg panaudojimas funkicinei CTLA4- ir CD-28-teigiamų ląstelių sąveikai su B7-teigiamomis ląstelėmis reguliuoti, imuninės sistemos ligoms, tokioms kaip reumatinis artritas, gydyti ir imuninių atsakų negatyviajai moduliacijai. Šio išradimo L104EA29YIg yra tirpi CTLA4 mutantinė molekulė, turinti mažiausiai dvi pakeistas aminorūgštis - leuciną (L) į glutamo rūgštį (E) 104 padėtyje ir alaniną (A) į tiroziną (Y) +29 padėtyje. L104EA29YIg molekulė, apart šių dviejų nurodytų, gali turėti daugiau mutacijų.

[tinkamiausią įgyvendinimo variantą įeina tirpių CTLA4 molekulių panaudojimas reumatinių ligų, tokios kaip reumatinis artritas, gydymui, subjektui skiriant efektyvų kiekį tirpių CTLA4 molekulių. Terapinės kompozicijos efektyvaus kiekio skyrimas tokiu būdu palengvina subjektui bent vieną iš su liga susijusių simptomų, įskaitant sąnarių patinimo, sąnarių jautrumo, uždegimo, rytinio nejudrumo ir skausmo bei struktūrinio pakenkimo sumažinimą, tokiu būdu sumažinant fizinę negalią. Šio išradimo būdai taip pat gali būti naudojami sumažinti bent vienam iš su reumatinio artritu susijusių simptomų, įskaitant eritrocitų sedimentacijos greičio, C-reaktyvaus baltymo, tirpaus ICAM-1, tirpaus E-selektino ir/arba tirpaus IL-2r kiekio serume, sumažinimą.

Simptominio palengvinimo, kurį duoda šis išradimas, dydis gali būti matuojamas naudojant bet kurį iš priimtų kriterijų, nustatytų matuoti ir dokumentuoti simptominiam palengvinimui klinikoje. Priimtinais simptominio palengvinimo kriterijais gali būti balai, paremti Amerikos reumatologijos kolegijos (pvz. ACR 20) nustatytais kriterijais, keturi simptominio palengvinimo matai ("CDER Guideline for Clinical Evaluation of Anti-Inflammatory and Antirheumatic Drugs – FDA 1988) ir Sveikatos įvertinimo klausimynas (HAQ) (Fries, J.F., et al., *J. of Rheumatology* 9:789-793). Bendrą šių kriterijų aprašymą galima rasti "Guidance for Industry: Clinical Development Programs for Drugs, Devices, and Biological products for Treatment of Rheumatoid Arthritis (RA)", 1999 m. vasario mėn.

Pagal šį išradimą gydomi subjektai yra žinduoliai, įskaitant žmones, beždžiones, šunis, kates, karves, arklius, triušius, peles ir žiurkes.

Šiame išradime yra pateikiami įvairiausi vietiniai ir sisteminiai tirpių CTLA4 molekulių įvedimo metodai. Tokie metodai apima intraveninius, intraraumeninius, intraperitoninius, peroralinius, inhaliacinius ir poodinius metodus, taip pat implantuojamus siurblius, nepertraukiamą infuziją, genų terapiją, liposomas, žvakutes, vietinį kontaktą, pūsleles, kapsules ir injekcijas metodus. Terapinis agentas - junginys su nešikliu - paprastai yra liofilizuojamas laikymui ir prieš įvedant praskiedžiamas vandeniui arba neutralaus pH (apie pH 7-8, pvz., pH 7,5) buferiniu tirpalu.

Kaip yra įprasta šios srities praktikoje, išradimo kompozicijos gali būti skiriamos subjektui bet kokia farmaciškai priimtina forma.

Pagal šio išradimo praktiką, būdai apima tirpių šio išradimo CTLA4 molekulių skyrimą subjektui CD28- ir/arba CTLA4-teigiamų ląstelių sąveikoms su B7-teigiamomis ląstelėmis reguliuoti. B7-teigiamos ląstelės yra suleidžiamos į kontaktą su efektyviu kiekiu tirpių šio išradimo CTLA4 molekulių, jų fragmentų arba darinių, kad susidarytų tirpūs CTLA4/B7 kompleksai. Šie kompleksai trukdo endogeninėms CTLA4 ir CD28 molekulėms sąveikauti su B7 šeimos molekulėmis.

Subjektui gali būti skiriamas toks tirpios CTLA4 mutantinės molekulės kiekis ir tokį laiką (pvz. tam tikrą laiko tarpą arba keletą kartų), kad jo pakaktų blokuoti subjekto endogeninių B7 molekulių susirišimą su jų atitinkamais ligandais. Endogeninio B7/ligando blokavimas tuo pačiu inhibuoja B7-teigiamų ląstelių sąveiką su CD28- ir/arba CTLA4-teigiamomis ląstelėmis.

Terapinio agento dozės priklauso nuo daugelio faktorių, įskaitant, bet neapsiribojant, paveikto audinio tipą, gydomos autoimuninės ligos tipą, ligos sunkumo laipsnį, subjekto sveikatą ir subjekto atsaką į gydymą šiais agentais. Tokiu būdu agentų dozės gali kisti priklausomai nuo subjekto ir vartojimo būdo. Tirpios CTLA4 mutantinės molekulės gali būti skiriamos kiekiais nuo 0,1 iki 20,0 mg/kg paciento masės/per dieną, geriau nuo 0,5 iki 10,0 mg/kg/per dieną.

Šis išradimas taip pat apima šio išradimo kompozicijų panaudojimą su kitais farmaciniais agentais, skirtais imuninės sistemos ligoms gydyti. Pavyzdžiui, reumatinės ligos gali būti gydomos šio išradimo molekulėmis.

kartu su, bet jais neapsiribojant, imunodepresantais, tokiais kaip kortikosteroidai, ciklosporinas (Mathiesen, 1989 *Cancer Lett.*, 44(2):151-156), prednizonas, azatioprinas, metotreksatas (R. Handschumacher, in "Drugs Used for Immunosuppression", p. 1264-1276), $TFN\alpha$ blokatoriais arba antagonistais (*New England Journal of Medicine*, vol. 130:478-486) arba bet kokių kitų biologinių agentų, veikiančių kurį nors uždegiminį citokiną, nesteroidiniais prieš uždegiminius vaistais/Cox-2 inhibitoriais, hidroksichlorokvinu, sulfazaloprinu, aukso druskomis, etanerceptu, infliksimabu, rapamicinu, mikofenoliato mofetilu, azatioprinu, takrolizmu, baziliksimumu, citoksanu, interferonu beta-1a, interferonu beta-1b, glatiramero acetatu, mitoksantrono hidrochloridu, anakinru ir/arba kitais biopreparatais.

Tirpios CTLA4 mutantinės molekulės (geriausia L104EA29YIg) taip pat gali būti naudojamos imuniniam atsakui reguliuoti derinyje su vienu arba daugiau toliau duodamų agentų: tirpiu gp39 (taip pat žinomu kaip CD40 ligandas (CD40L), CD154, T-BAM, TRAP), tirpiu CD29, tirpiu CD40, tirpiu CD80 (pvz. ATCC 68627), tirpiu CD86, tirpiu CD28 (pvz. 68628), tirpiu CD56, tirpiu Thy-1, tirpiu CD3, tirpiu TCR, tirpiu VLA-4, tirpiu VCAM-1, tirpiu LECAM-1, tirpiu ELAM-1, tirpiu CD44, antikūnais reaguojančiais su gp39 (pvz. ATCC HB-10916, ATCC HB-12055 ir ATCC HB-12056), antikūnais reaguojančiais su CD40 (pvz. ATCC HB-9110), antikūnais reaguojančiais su B7 (pvz. ATCC HB-253, ATCC CRL-2223, ATCC CRL-2226, ATCC HB-301, ATCC HB-11341 ir t.t.), antikūnais reaguojančiais su CD28 (pvz. ATCC HB-11944 arba mAb 9.3, kaip aprašyta Martin et al. (*J. Clin. Immunol.* 4(1):18-22, 1980) , antikūnais reaguojančiais su LFA-1 (pvz. ATCC HB-9579 ir ATCC TIB-213), antikūnais reaguojančiais su LFA-2, antikūnais reaguojančiais su IL-2, antikūnais reaguojančiais su IL-12, antikūnais reaguojančiais su IFN-gama, antikūnais reaguojančiais su CD-2, antikūnais reaguojančiais su CD48, antikūnais reaguojančiais su bet kuriuo ICAM (pvz. ICAM-1 (ATCC CRL-2252), ICAM-2 ir ICAM-3), antikūnais reaguojančiais su CTLA4 (pvz. ATCC HB-304), antikūnais reaguojančiais su Thy-1, antikūnais reaguojančiais su CD56, antikūnais reaguojančiais su CD3, antikūnais reaguojančiais su CD29, antikūnais reaguojančiais su TCR, antikūnais reaguojančiais su VLA-4, antikūnais reaguojančiais su VCAM-1, antikūnais reaguojančiais su LECAM-

1, antikūnais reaguojančiais su ELAM-1, antikūnais reaguojančiais su CD44. Tam tikruose įgyvendinimo variantuose tinkamesni yra monokloniniai antikūnai. Kituose įgyvendinimo variantuose yra pageidautini antikūnų fragmentai. Specialistai nesunkiai supras, kad derinyje gali būti šio išradimo tirpios CTLA4 mutantinės molekulės su vienu kitu imunodepresantu, tirpios CTLA4 mutantinės molekulės su dviem kitais imunodepresantais, tirpios CTLA4 mutantinės molekulės su trim kitais imunodepresantais ir t.t. Optimalūs deriniai ir dozės gali būti nustatomos ir optimizuojamos naudojant specialistams žinomus būdus.

Kai kurie konkretūs deriniai yra tokie: L104EA29Ylg ir CD80 monokloniniai antikūnai (mAb); L104EA29Ylg ir CD86 mAb; L104EA29Ylg, CD80 mAb ir CD86 mAb; L104EA29Ylg ir gp39 mAb; L104EA29Ylg ir CD40 mAb; L104EA29Ylg ir CD28 mAb; L104EA29Ylg, CD80 ir CD86 mAb ir gp39 mAb; L104EA29Ylg CD80 ir CD86 mAb ir CD40 mAb; ir L104EA29Ylg, anti-LFA-1 mAb ir anti-gp mAb. Specifinis gp39 mAb pavyzdys yra MR1. Specialistai nesunkiai įvertins ir supras kitus derinius.

Tirpios šio išradimo mutantinės molekulės, pavyzdžiui L104EA29Ylg, gali būti vartojamos kaip vienintelis veiklusis ingredientas arba kartu su kitais vaistais imunomoduliavimo režimuose arba su kitais priešuždegiminiais agentais, pvz. gydymui arba apsisaugojimui nuo alo- arba ksenoimplanto ūmaus arba chroniško atmetimo, arba uždegiminių arba autoimuninių sutrikimų, arba tolerancijai indukuoti. Pavyzdžiui, jos gali būti naudojamos derinyje su kalcineurino inhibitoriumi, pvz. ciklosporinu A arba FK506; imunodepresiniu makrolidu, pvz. rapamicinu arba jo dariniais; pvz. 40-O-(2-hidroksi)etil-rapamicinu, limfocitus nukreipiančiu agentu, pvz. FTY720 arba jo analogu; kortikosteroidais; ciklofosfamidų; azatioprenu; metotreksatu; leflunomidu arba jo analogu; mizoribinu; mikofenolio rūgštimi; mikofenolio mofetilu; 15-deoksispergualinu arba jo analogu; imunodepresiniais monokloniniais antikūnais, pvz. monokloniniais antikūnais leukocitų receptoriams, pvz., MHC, CD2, CD3, CD4, CD11a/CD18, CD7, CD25, CD27, B7, CD40, CD45, CD58, CD137, ICOS, CD150 (SLAM), OX40, 4-1BB arba jų ligandais; arba kitais imunomoduliaciniais junginiais, pvz. CTLA4/CD28-Ig arba kitais adhezinių molekulių inhibitoriais, pvz. mAb arba mažos molekulinės masės inhibitoriais, įskaitant LFA-1 antagonistus, selektino

antagonistus ir VLA-4 antagonistus. Šis junginys yra ypatingai tinkamas derinyje su junginiu, kuris sąveikauja su CD40 ir jo ligandu, pvz. antikūnai prieš CD40 arba antikūnai prieš CD40-L.

Kai tirpios šio išradimo CTLA4 mutantinės molekulės yra skiriamos derinyje su kita imunodepresine/imunomoduliacine arba priešuždegimine terapija, pvz. taip, kaip aprašyta aukščiau, kartu skiriamo imunodepresanto, imunomodulatoriaus arba priešuždegiminio junginio dozės, žinoma, keisis priklausomai nuo naudojamo kovaisto tipo, pvz. ar jis yra steroidas, ar ciklosporinas, nuo konkretaus vartojamo vaisto, nuo gydamos būklės ir t.t.

Pagal aukščiau duotą aprašymą, šiame išradime yra pateikiami dar ir kitu aspektu aukščiau aprašyti būdai, pvz. apimantys terapiškai efektyvaus kiekio šio išradimo tirpių CTLA4 mutantinių molekulių, pvz. CTLA4Ig ir/arba L104EA29YIg (laisvos formos arba farmaciškai priimtinos druskos formos) ir antrosios vaistinės medžiagos, kur ši antroji vaistinė medžiaga yra imunodepresantas, imunomodulatorius arba priešuždegiminis vaistas, bendrą vartojimą kartu arba pakaitomis, pvz. kaip nurodyta aukščiau. Taip pat yra pateikiami terapiniai deriniai, pvz. rinkinys, pvz. naudojimui bet kuriame iš aukščiau aprašytų būdų, į kurį įeina tirpi CTLA4 molekulė (laisvos formos arba farmaciškai priimtinos druskos formos), skirta naudoti kartu arba pakaitomis, su bent viena farmacine kompozicija, turinčia imunodepresanto, imunomodulatoriaus arba priešuždegiminio vaisto. Rinkinyje gali būti nurodymai apie jo vartojimą.

Šiame išradime taip pat yra pateikiami tirpių šio išradimo CTLA4 mutantinių molekulių pagaminimo būdai. CTLA4 mutantinės molekulės gali būti ekspresuojamos prokariotinėse ląstelėse.

Dažniausiai prokariotus atstovauja įvairūs bakterijų kamienai. Bakterijos gali būti gram-teigiamos arba gram-neigiamos. Paprastai tinkamiausios yra gram-neigiamos bakterijos, tokios kaip *E. coli*. Taip pat gali būti naudojami ir kiti mikrobo kamienai. CTLA4 mutantinės molekulės koduojančios sekos gali būti įterptos į vektorius, skirtą svetimoms sekoms ekspresuoti prokariotinėse ląstelėse, tokiose kaip *E. coli*. Šiuose vektoriuose gali būti paprastai naudojamos prokariotinės kontrolinės sekos, kurios yra čia apibūdintos kaip turinčios transkripcijos iniciacijos promotorius, esant reikalui, su operatoriumi, kartu su ribosominėmis rišančios vietos sekomis, ir apimti

tokius paprastai naudojamus promotorius, kaip beta-laktamazės (penicilinizės) ir laktozės (lac) promotorių sistemą (Chang et al., (1977) *Nature* 198:1056), triptofano (trp) promotorių sistemą (Goeddel, et al., (1980) *Nucleic Acid Res.* 8:4057) ir iš lambda išvestą P_L promotorių bei N-geno ribosominę rišančią vietą (Shimatake, et al., (1981) *Nature* 292:128).

[tokius ekspresijos vektorius taip pat įeis replikacijos pradžios ir atrankos žymės, tokios kaip beta-laktamazės arba neomicino fosfotransferazės genai, suteikiantys atsparumą antibiotikams, taip kad vektoriai gali dvigubėti bakterijose, ir šias plazmides turinčios ląstelės gali būti atrinktos auginant su antibiotikais, tokiais kaip ampicilinas arba kanamicinas.

Ekspresijos plazmidė gali būti įvesta į prokariotines ląsteles įvairiais standartiniais būdais, įskaitant, bet neapsiribojant, CaCl₂ šoką (Cohen, (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2110 ir Sambrook et al. (eds.) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, (1989)) ir elektroporaciją.

Pagal šio išradimo praktiką eukariotinės ląstelės taip pat yra tinkamos šeimininko ląstelės. Eukariotinių ląstelių pavyzdžiais yra bet kokios gyvūnų ląstelės, kaip pirminės, taip ir imortalizuotos, mielės (pvz. *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* ir *Pichia pastoris*) ir augalų ląstelės. Gyvūnų ląstelių, kurios gali būti naudojamos šeimininkais, pavyzdžiais yra mielomos, COS ir CHO ląstelės. Ypatingos CHO ląstelės apima, bet jomis neapsiribojama, DG44 (Chasin, et al., 1986 *Som. Cel. Molec. Genet.* 12:555-556; Kolkekar 1997 *Biochemistry* 36:10901-10909), CHO-K1 (ATCC No. CCL-61), CHO-K1 Tet-On ląstelių linija (Clontech), CHO, pažymėta ECACC 85050302 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), CHO klonas 13 (GEIMG, Genova, IT), CHO klonas B (GEIMG, Genova, IT), CHO-K1/SF, pažymėta ECACC 93061607 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK) ir RR-CHOK1, pažymėta ECACC 92052129 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK). Augalų ląstelių pavyzdžiais yra tabako (ištisas augalas, ląstelių kultūra arba antauga), kukurūzų, sojos ir ryžių ląstelės. Taip pat priimtinos yra kukurūzų, sojos ir ryžių sėklos.

CTLA4 mutantinės molekulės koduojančios nukleorūgščių sekos taip pat gali būti įterptos į vektorių, skirtą svetimoms sekoms ekspresuoti

eukariotiniame šeimininke. Šio vektoriaus reguliaciniai elementai gali kisti priklausomai nuo konkretaus eukariotinio šeimininko.

Paprastai naudojamos eukariotinės kontrolinės sekos, skirtos naudoti ekspresijos vektoriuose, apima promotorius ir kontrolines sekas, suderinamas su žinduolių ląstelėmis, tokias kaip, pavyzdžiui, CMV promotorius (CDM8 vektoriui) ir paukščių sarcomos virusas (AVS) (π LN vektoriui). Kitais paprastai naudojamais vektoriais yra ankstyvasis ir vėlyvasis promotoriai iš Simian Virus 40 (SV40) (Fiers, et al., (1973) *Nature* 273:113) arba kiti virusiniai promotoriai, tokie kaip promotoriai, išvesti iš poliomos, adenoviruso 2 ir jaučio papilomos viruso. Taip pat gali būti naudojamas indukuojamas promotorius, kaip antai hMTII (Karin, et al., (1982) *Nature* 299:797-802).

Vektoriai CTLA4 mutantinių molekulių ekspresijai eukariotuose taip pat gali turėti sekas, vadinamas stiprinimo sritimis. Jos yra svarbios genų ekspresijos optimizavimui ir yra randamos arba prieš promotoriaus sritį, arba po jos.

Ekspresijos vektorių eukariotinių šeimininkų ląstelėms pavyzdžiais yra, bet jais neapsiribojama, vektoriai žinduolių šeimininkų ląstelėms (pvz., BVP-1, pHyg, pRSV, pSV2, pTK2 (Maniatis); pIRES (Clontech); pRc/CMV2, pRc/RSV, pSFV1 (Life Technologies); pVPakc vektoriai, pCMV vektoriai, pSG5 vektoriai (Stratagene), retrovirusiniai vektoriai (pvz. pFB vektoriai (Stratagene)), pCDNA-3 (Invitrogen) arba jų modifikuotos formos, adenovirusiniai vektoriai; susiję su adenovirusu vektoriai, bakuloviruso vektoriai, mielių vektoriai (pvz. pESC vektoriai (Stratagene)).

CTLA4 mutantinės molekulės koduojančios nukleorūgščių sekos gali integruotis į eukariotinio šeimininko ląstelės genomą ir dvigubėti kaip šeimininko genomo kopijos. Kitu atveju, CTLA4 mutantinės molekulės turintys vektoriai gali turėti replikacijos pradžias, duodančias ekstrachromosominių kopijų susidarymo galimybę.

Nukleorūgščių sekų ekspresijai *Saccharomyces cerevisiae* gali būti naudojama replikacijos pradžia iš endogeninės mielių plazmidės (2 μ ratas) (Broach, (1983) *Meth. Enz.* 101:307). Kitu atveju gali būti naudojamos sekos iš mielių genomo, galinčios skatinti autonominę replikaciją (žr. pavyzdžiui,

Stinchcomb et al., (1979) *Nature* 282:39); Tschemper et al., (1980) *Gene* 10:157; ir Clarke et al., (1983) *Meth. Enz.* 101:300).

[transkripcijos kontrolės sekas mielių vektoriams įeina glikolizinių fermentų sintezės promotoriai (Hess et al., (1968) *J. Adv. Enzyme Res.* 7:149; Holland et al., (1978) *Biochemistry* 17:4900). Papildomais žinomais promotoriais yra CMV promotorius, pateiktas CDM8 vektoriuje (Toyamma and Okayama, (1990) *FEBS* 268:217-221); 3-fosfogliceratkinazės promotorius (Hitzeman et al., (1980) *J. Biol. Chem.* 255:2073) ir kitų glikolizinių fermentų promotoriai.

Kitais promotoriais yra indukuojami promotoriai, nes juos gali reguliuoti aplinkos stimulai arba ląstelių auginimo terpės. Tokie indukuojami promotoriai apima promotorius iš genų šilumos šoko baltymams, alkoholdehidrogenazei 2, izocitochromui c, rūgštinei fosfatazei, fermentams, susijusiems su azoto katabolizmu, ir fermentams, atsakingiems už maltozės ir galaktozės utilizavimą.

Koduojančios sekos 3'-gale gali būti prijungtos reguliacinės sekos. Tokios sekos gali veikti stabilizuodamos informacinę RNR. Šios baigmės sekos yra randamos 3' netransliuojamoje srityje po koduojančių sekų keliuose išvestuose iš mielių ir žinduolių genuose.

Vektorių augalams ir augalų ląstelėms pavyzdžiais yra, bet jais neapsiribojama, *Agrobacterium T_i* plazmidės, žiedinių kopūstų mozaikos virusas (CaMV) ir pomidorų auksinės mozaikos virusas (TGMV).

Bendruosius žinduolių ląstelių šeimininko sistemos transformavimo aspektus aprašė Axel (JAV patentas Nr. 4,399,216, publikuotas 1983 m. rugpjūčio 16 d.). Žinduolių ląstelės gali būti transformuotos būdais, įskaitant (bet neapsiribojant) transfekciją esant kalcio fosfato, mikroinjekcijomis, elektroporacija arba transdukcija virusiniais vektoriais.

Svetimos DNR įvedimo į augalų ląstelių ir mielių genomus būdai yra:

- (1) mechaniniai būdai, tokie kaip DNR mikroinjekcijos į atskiras ląsteles arba protoplastus, maišant ląsteles su stiklo granulėmis, esant DNR, arba įšaunant DNR padengtus volframo arba aukso rutuliukus į ląsteles arba protoplastus;
- (2) įvedant DNR, kai ląstelių membranos padaromos laidžiomis makromolekulėms, veikiant polietilenglikoliu arba didelės įtampos elektriniais

impulsais (elektroporacija), arba (3) panaudojant liposomas (turinčias DNR), kurios susilieja su ląstelių membranomis.

Gavus šio išradimo CTLA4 mutantinių molekulių ekspresiją, jos gali būti išskirtos specialistams gerai žinomais būdais, tokiais kaip ląstelių lizavimas (pvz., sonikacija, lizocimas ir/arba detergentai) ir baltymas yra išgaunamas naudojant standartinius baltymų gryninimo būdus, pvz. giminingumo chromatografiją arba jonų mainų chromatografiją, gaunant iš esmės gryną produktą (R. Scopes in: "Protein Purification. Principles and Practice", Third Edition, Springer-Verlag (1994); Sambrook et al. (eds.), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, (1989)). CTLA4 mutantinių molekulių ekspresija gali būti nustatyta specialistams žinomais būdais. Pavyzdžiui, mutantinės molekulės gali būti detektuojamos nudažant Coomassie SDS-PAGE gelius ir imunoblotingo būdu, naudojant antikūnus, kurie rišasi su CTLA4.

Toliau duodami pavyzdžiai yra pateikti išradimui pailiuoti ir padėti specialistui pagaminti ir panaudoti jo medžiagas. Šie pavyzdžiai jokių būdu neapriboja išradimo apimtys.

1 PAVYZDYS

Toliau duodamas nukleotidų sekų, koduojančių šio išradimo CTLA4 molekules, generavimo būdų aprašymas.

Pirmiausia buvo sukonstruota CTLA4Ig koduojanti plazmidė ir parodyta, kad ji ekspresuoja CTLA4Ig molekules, kaip aprašyta JAV patentuose Nr. 5,434,131, 5,885,579 ir 5,851,795. Po to iš CTLA4Ig koduojančios sekos buvo generuotos vienos vietos mutantinės molekulės (pvz. L104EIg), ekspresuotos ir ištirta jų susirišimo su įvairiomis B7 molekulėmis kinetika. Ši L104EIg nukleotidų seka (jeina į fig.18 parodytą seką) buvo panaudota kaip matrica dviejų vietų CTLA4 mutantinėms sekoms generuoti (jeina į fig.19-22 parodytas sekas), kurios buvo ekspresuotos kaip baltymai ir ištirta jų susirišimo kinetika. Dviejų vietų CTLA4 mutantinės sekos apima: L104EA29YIg, L104EA29LIg, L104EA29TIg ir L104EA29WLIg. Taip pat buvo generuoti trijų vietų mutantai.

CTLA4Ig konstravimas

CTLA4Ig koduojantis konstruktas, apimantis CTLA4 ekstraląstelinę dalį ir IgC γ 1 dalį, buvo sukonstruotas pagal JAV patentuose 5,434,131, 5,844,095 ir 5,851,795 duotus aprašymus (čia pridedami kaip literatūros šaltiniai). CTLA4 geno ekstraląstelinė dalis buvo klonuota PGS būdu, naudojant sintetinius oligonukleotidus, atitinkančius publikuotą seką (Dariavach et al., *Eur. Journ. Immunol.* 18:1901-1905 (1988)).

Kadangi signalinis peptidas CTL4 nebuvo identifikuotas CTLA4 gene, numatytos CTLA4 sekos N-galas buvo sulietas su onkostatino M signaliniu peptidu (Malik et al., *Mol. and Cell Biol.* 9:2847 (1989)) per dvi stadijas, naudojant persiklojančius oligonukleotidus. Pirmojoje stadijoje kaip priešakinis pradmuo buvo naudojamas oligonukleotidas CTCAGTCTGGTCCTTGCACTC CTGTTTCCAAGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCCAGCC (kuris kodavo 15 C-galo aminorūgščių iš onkostatino M signalinio peptido, sulieto su CTLA4 7 N-galinėmis aminorūgštimis), o kaip atbulinis pradmuo - TTTGGGCTCCTGATCAGAATCTGGGCACGGTTG (koduojantis CTLA4 receptoriaus koduotos aminorūgščių sekos 119-125 liekanas ir turintis Bcl I fermentinio kirpimo vietą). Matrica šiai stadijai buvo kDNR, sintezuota iš 1 μ g pilnos DNR iš H38 ląstelių HTLV II infekuotos T-ląstelių leukeminių ląstelių linijos, pateiktos Drs. Salahudin and Gallo, NCI, Bethesda, MD). PGS produkto dalis iš pirmosios stadijos buvo reamplifikuota, naudojant persidengiantį priešakinį pradmenį, koduojantį onkostatino M signalinio peptido N-galo dalį ir turintį Hind III kirpimo endonukleaze vietą, CTAGCCATC GAAGCTTCACCAATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTC TGGTCCTTGCACTC, ir tą patį atbulinį pradmenį. PGS produktas buvo skaldytas Hind III ir Bcl I ir liguotas su Bcl I/Xba I atskeltu kDNR fragmentu, koduojančiu IgC(γ)1 šarnyro, CH2 ir CH3 sričių aminorūgščių sekas, į Hind III/Xba I skaldomą ekspresijos vektorių, CDM8 arba Hind III/Xba I skaldomą ekspresijos vektorių pILN (taip pat žinomą kaip π LN).

CTLA4Ig atitinkančią aminorūgščių seką koduojanti DNR buvo deponuota ATCC pagal Budapešto sutartį 1991 m. gegužės 31 d., ir jai buvo suteiktas ATCC depozito numeris 68629.

Mutagenėzė CTLA4Ig kodonų pagrindu

Buvo ištobulinta mutagenėzės ir skryningo strategija mutantinėms CTLA4Ig molekulėms, kurios turi lėtesnius disociacijos iš CD80 ir/arba CD86 molekulių komplekso greičius ("iš" greičius), t.y. pagerintą susirišimo gebą, identifikuoti. Šiame įgyvendinimo variante mutacijos buvo įvestos į CTLA4 ekstraląstelinės dalies ir/arba apie liekanas CDR-1, CDR-2 (taip pat žinoma kaip C' grandinė) ir/arba CDR-3 srityse (kaip aprašyta JAV patentuose 6,090,914, 5,773,253 ir 5,844,095; JAV patentinėje paraiškoje Ser. Nr. 60/214,065; ir Peach, R.J., et al. *J. Exp. Med.* 1994 180:2049-2058. Panašios į CDR sritys apima kiekvieną CDR sritį ir tęsiasi per keletą aminorūgščių prieš ir/arba po CDR dalies. Šios vietos buvo pasirinktos chimerinių CD28/CTLA4 sulietų baltymų tyrimais (Peach et al., *J. Exp. Med.*, 1994, 180:2049-2058) ir modeliu, numatančiu, kuri iš aminorūgščių liekanų šoninių grandinių bus išlindusi į tirpiklį, ir kad tam tikrose padėtyse tarp CD28 ir CTLA4 nėra aminorūgščių liekanos identiškumo arba homologijos. Be to, bet kuri liekana, kuri erdviškai yra labai arti (5-20 angstromų) prie identifikuotų liekanų, yra laikoma šio išradimo dalimi.

Tirpių CTLA4 mutantinių molekulių, turinčių pakeistus afiniškumus CD80 ir/arba CD86, sintezei ir skryningui buvo pritaikyta dvistadijinė strategija. Eksperimentai pirmiausia pareikalavo sukurti mutacijų biblioteką prie specifinio CTLA4 ekstraląstelinės dalies kodono ir po to atlikti jų skryningą BIAcore analizės būdu, identifikuojant mutantus su pakeistu reakingumu B7 atžvilgiu. Biacore testo sistema (Pharmacia, Piscataway, N.J.) naudoja paviršiaus plazmonų rezonanso detektoriaus sistemą, kurioje iš esmės dalyvauja kovalentinis CD80Ig, arba CD86Ig susirišimas su dekstranu padengta plokštele, kuri yra įtaisyta detektoriuje. Tada testuojama molekulė gali būti įleidžiama į kamerą, kurioje yra detektoriaus plokštelė, ir gali būti įvertinamas komplementaraus susirišančio baltymo kiekis pagal molekulinės masės pokytį, kuris atsiranda dėl fizikinės asociacijos su dekstranu padengta sensoriaus plokštelės puse; šį molekulinės masės pokytį gali išmatuoti detektoriaus sistema.

Konkrečiau, vienos vietos mutantinės nukleotidų sekos buvo generuotos matrica panaudojant nemutuotą (t.y. laukinio tipo) DNR, koduojančią CTLA4Ig (JAV patentai Nr. 5,434,131, 5,844,095; 5,851,795; ir 5,885,796; ATCC depozito Nr. 68629). Mutageniniai oligonukleotidiniai PGS pradmenys buvo sukurti specifinio kodono atsitiktinei mutagenizei, imant bet kokią bazę kodono 1 ir 2 padėtyse, bet 3 padėtyje turi būti tik guaninas arba timinas (XXG/T arba dar pažymėtas kaip NNG/T). Šiuo būdu konkretus aminorūgštį koduojantis kodonas gali būti atsitiktinai mutuotas į kodą kiekvienai iš 20 aminorūgščių. Šiuo požiūriu XXG/T mutagenizė duoda 32 potencialius kodonus, koduojančius kiekvieną iš 20 aminorūgščių. PGS produktai, koduojantys mutacijas greta CTLA4Ig CDR-3 tipo kilpos (MYPPPY), buvo suskaldyti SacI/XbaI ir įklonuoti į panašiai sukarpytą CTLA4Ig (kaip parodyta fig.24) π LN ekspresijos vektorių. Šis būdas buvo naudotas generuoti vienos vietos CTLA4 mutantinei molekulei L104Eig (kaip parodyta fig.18).

Mutagenizei prie CTLA4Ig panašios į CDR-1 kilpos, panaudojant PGS į pradmenį nukreiptą mutagenizę, pirmiausia į šią kilpą 5' buvo įvesta tyli NheI kirpimo vieta. PGS produktai buvo skaldomi NheI/XbaI ir įklonuoti į panašiai sukarpytus CTLA4Ig arba L104Eig ekspresijos vektorius. Šis būdas buvo panaudotas dvigubos vietos CTLA4 mutantinei molekulei L104EA29YIg (kaip parodyta fig.19) generuoti. Konkrečiau, nukleorūgšties molekulė, koduojanti vienos vietos CTLA4 mutantinę molekulę, L104Eig, buvo panaudota kaip matrica dvigubos vietos CTLA4 mutantinei molekulei, L104EA29YIg, gauti.

Dviejų vietų mutantinės nukleotidų sekos, koduojančios CTLA4 mutantines molekules, tokias kaip L104EA29YIg (deponuota 2000 m. birželio 19 d. Amerikos tipinių kultūrų kolekcijoje (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 ir gavusi ATCC depozito numerį PTA-2104) buvo generuotos kartojant aukščiau aprašytą mutagenizės procedūrą, matrica naudojant L104Eig. Šis būdas buvo naudojamas generuoti daugybei dviejų vietų mutantinių nukleotidų sekų, tokių kaip sekos, koduojančios CTLA4 molekules L104EA29YIg (tokios kaip esančios sekose, parodytose fig. 19), L104EA29Llg (tokios kaip esančios sekose, parodytose fig.20), L104EA29Tlg

(tokios kaip esančios sekose, parodytose fig.21) ir L104EA29WIg (tokios kaip esančios sekose, parodytose fig.22). Taip pat buvo generuoti trijų vietų mutantai, tokie kaip koduojantys L104EA29YS25KIg, L104EA29YS25NIg ir L104EA29YS25RIg.

Tirpios CTLA4 molekulės buvo ekspresuotos iš šių nukleotidų sekų ir panaudotos II fazės klinikiniuose tyrimuose, kaip aprašyta 3 pavyzdyje toliau.

Specialistai turėtų suprasti, kad nukleorūgščių sekų replikacija, ypačiai PGS amplifikacija, lengvai įveda bazių pakeitimus į DNR grandines. Tačiau nukleotidų pakeitimai nebūtinai pavirs į aminorūgščių pakeitimus, kadangi kai kurie keli kodonai koduoja tą pačią aminorūgštį. Bet kokius nukleotidų pakeitimus, lyginant su originalia arba laukinio tipo seka, tylius (t.y. nesukeliančius transliuotos aminorūgšties pakeitimo) arba kitokius, nors čia nėra aiškiai aprašyta, apima šis išradimas.

2 PAVYZDYS

Toliau duodamas skryningo metodų, naudojamų identifikavimui vienos vietos ir dvigubos vietos mutantinių CTLA4 polipeptidų, ekspresuotų iš 1 pavyzdyje aprašytų konstrukto, kurie turi didesnę surišimo su B7 molekulėmis gebą nei nemutuotos CTLA4Ig molekulės, aprašymas.

Dabartiniai *in vitro* ir *in vivo* tyrimai rodo, kad pats CTLA4Ig negali pilnai blokuoti antigenui specifinių aktyvuotų T ląstelių atsiradimo. CTLA4Ig ir bet kurio iš CD80 arba CD86 specifinių monokloninių antikūnų *in vitro* tyrimai, matuojant T ląstelių proliferacijos inhibavimą rodo, kad anti-CD80 monokloninis antikūnas nedidina CTLA4Ig inhibavimo. Tačiau anti-CD86 monokloninis antikūnas didina inhibavimą, kas rodo, kad CTLA4Ig nėra veiksmingas blokuojant CD86 sąveikas. Šie duomenys patvirtina ankstesnius Linsley et al. (*Immunity*, (1994) 1:793-801) duomenis, rodančius, kad CD80 tarpininkaujamiems ląstelių atsakams inhibuoti reikia maždaug 100 kartų mažesnių CTLA4Ig koncentracijų, nei CD86 tarpininkaujamiems atsakams. Remiantis šiais duomenimis buvo daroma prielaida, kad tirpios CTLA4 mutantinės molekulės, turinčios didesnę polinkį į CD86 nei laukinio tipo CTLA4, turėtų geriau blokuoti antigenui specifinių aktyvuotų ląstelių atsiradimą, nei CTLA4Ig.

Šiuo tikslu buvo atliekamas aukščiau duotame 1 pavyzdyje aprašytų mutantinių molekulių skryningas, naudojant naują skryningo metodiką, identifikuojant keletą mutacijų ekstraląstelinėje CTLA4 dalyje, kurios pagerina susirišimo su CD80 ir CD86 gebą. Ši skryningo strategija davė efektyvų būdą, įgalinantį tiesiogiai identifiкуoti mutantus su pastebimai mažesniais "iš" greičiais, ir jam nereikėjo baltymo išgryninimo arba kiekio nustatymo, nes "iš" greičio nustatymas nepriklauso nuo koncentracijos (O'Shannessy et al., (1993) *Anal. Biochem.*, 212:457-468).

COS ląstelės buvo transfekuotos atskirais išgrynintos plazmidinės DNR minipreparatais ir dauginamos keletą dienų. Trijų dienų kondicionuota auginimo terpė buvo uždėta ant BIAcore biosensoriaus plokštelių (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden), padengtų tirpiu CD80Ig arba CD86Ig. Panaudojant paviršiaus plazmonų rezonansą, buvo matuojamas mutantinių baltymų specifinis surišimas ir disociacija (O'Shannessy et al., (1993) *Anal. Biochem.*, 212:457-468). Visi eksperimentai buvo atlikti naudojant BIAcore™ arba BIAcore™ 2000 biosensorius 25 °C temperatūroje. Ligandai buvo imobilizuoti ant tyrimų markės NCM5 sensoriaus plokštelių (Pharmacia), naudojant standartinį N-etil-N'-(dimetilaminopropil)karbodiimid-N-hidroksisukcinimidinį kopuliavimą (Johnson, B., et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277; Khilko, S.N., et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:5425-15434).

Skryningo metodas

COS ląstelės, augintos 24 duobučių auginimo plokštelėse, buvo viena po kitos transfekuotos mutantiniu CTLA4Ig. Po trijų dienų buvo surinkta sekretuotą tirpų mutantinį CTLA4Ig turinti auginimo terpė.

Kondicionuota COS ląstelių auginimo terpė buvo leidžiama per BIAcore biosensoriaus plokšteles, padengtas CD86Ig arba CD80Ig (kaip aprašyta Green et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271:26762-26771) ir buvo identifiкуotos mutantinės molekulės, kurių "iš" greičiai buvo mažesni nei laukinio tipo CTLA4Ig. Buvo sekvenuotos DNR, atitinkančios atrinktus terpės mėginius, ir buvo pagaminta daugiau DNR, kad būtų galima atlikti didesnio masto COS ląstelių pereinamąją transfekciją, iš kurių po baltymo A išskyrimo iš auginimo terpės buvo pagamintas mutantinis CTLA4Ig baltymas.

BIAcore analizės sąlygos ir pusiausvyrinio surišimo duomenų analizė buvo atlikta pagal Green et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271:26762-26771 ir JAV patentinėse paraiškose Ser. Nr. 09/579,927 ir 60/214,065, kurios čia nurodytos kaip literatūros šaltiniai, duotą aprašymą.

BIAcore duomenų analizė

Prieš analizę sensogramų bazinės linijos buvo normalizuotos iki nulinio atsako vienetų (RU). Mėginiai buvo perleidžiami per kontrolines derivatizuotas pratekamas celes, nustatant fonines RU reikšmes, atsiradusias dėl tūrinių lūžio rodiklių skirtumų tarp tirpalų. Pusiausvyrinės disociacijos konstantos (K_d) buvo išskaičiuotos iš R_{eq} priklausomybės nuo C grafikų, kur R_{eq} yra pusiausvyrinis atsakas minus kontrolinės derivatizuotos plokštelės atsakas, o C yra analitės molinė koncentracija. Surišimo kreivės buvo analizuotos naudojant komercinę netiesinės kreivės aproksimacijos programą (Prism, GraphPAD Software).

Pirmiausia eksperimentiniai duomenys buvo derinami su vieno ligando surišimo su vienu receptoriumi modeliu (1 vietos modelis, t.y. paprasta Langmiuro sistema, $A+B \leftrightarrow AB$), o pusiausvyrinės asociacijos konstantos ($K_d=[A] \cdot [B]/[AB]$) buvo apskaičiuoti iš lygties $R=R_{max} \cdot C/(K_d+C)$. Po to duomenys buvo derinami su paprasčiausiu dviejų vietų ligando surišimo modeliu (t.y. su receptoriumi, turinčiu dvi nesąveikojančias nepriklausomas surišimo vietas, aprašant lygtimi $R=R_{max1} \cdot C/(K_{d1}+C) + R_{max2} \cdot C/(K_{d2}+C)$).

Šių dviejų modelių aproksimacijos tinkamumas buvo analizuojamas vizualiai, lyginant su eksperimentiniais duomenimis ir statistškai pagal kvadratų sumos F testą. Kaip geriausias atitikimas buvo pasirinktas paprasčiausias vienos vietos modelis, jeigu dviejų vietų modelis nebuvo žymiai geresnis ($p < 0,1$).

Asociacijos ir disociacijos analizės buvo vykdomos naudojant BIA įvertinimo 2.1 programą (Pharmacia). Asociacijos greičio konstantos k_i buvo apskaičiuotos dviem būdais, priimant ir homogenines vienos vietos sąveikas, ir lygiagrečias dviejų vietų sąveikas. Vienos vietos sąveikų atveju k_i reikšmės buvo apskaičiuotos pagal lygtį $R_t=R_{eq}(1-\exp^{-k_s(t-t_0)})$, kur R_t yra atsakas duotu

laiku t , R_{eq} yra pusiausvyrinis atsakas, t_0 yra injekcijos pradžios laikas, o $k_s = dR/dt = k_i \cdot C_{k_{is}}$ ir kur C yra analitės koncentracija, apskaičiuota išreiškiant monomerinėmis surišimo vietomis. Dviejų vietų sąveikų atveju k_i reikšmės buvo apskaičiuotos pagal lygtį $R_t = R_{eq1}(1 - \exp^{-k_{s1}(t-t_0)}) + R_{eq2}(1 - \exp^{-k_{s2}(t-t_0)})$. Kiekvienam modeliui k_i reikšmės buvo nustatytos iš apskaičiuoto k_s priklausomybės nuo C polinkio (iki maždaug 70 % maksimalios asociacijos).

Disociacijos duomenys buvo analizuojami pagal vienos vietos ($AB = A + B$) arba dviejų vietų ($A_i B_j = A_i + B_j$) modelius, o greičio konstantos (k_{is}) buvo apskaičiuotos iš geriausios aproksimacijos kreivių. Buvo naudotas vienos vietos surišimo modelis, išskyrus tuos atvejus, kai liekamosios vertės buvo didesnės nei mašininis fonas (pagal mašiną 2-10 RU); tokiu atveju buvo naudojamas dviejų vietų modelis. Naudojant priklausomybę $t_{1/2} = 0,693/k_{is}$, buvo apskaičiuoti receptoriaus surišimo puslaikiai.

Srauto citometrija

Pelės mAb L307.4 (anti-CD80) buvo gauti iš Becton Dickinson (San Jose, California), o IT2.2 (anti-B7-0 [dar žinomi kaip CD86]) iš Pharmingen (San Diego, Kalifornija). Imuniniam nudažymui CD80-teigiamos ir/arba CD86-teigiamos CHO ląstelės buvo išimtos iš jų auginimo indų inkubuojant fosfatiniame ir druskos buferyje (PBS), turinčiame 10 mM EDTA. CHO ląstelės ($1-10 \times 10^5$) buvo pirmiausia inkubuojamos su mAb arba imunoglobuliniais sulietais baltymais DMEM, turinčioje 10 % fetalinio veršiuko serumo (FBS), po to plaunamos ir inkubuojamos su konjuguotu su fluoresceino izotiocianatu ožkos anti-pelės arba anti-žmogaus imunoglobulino antrosios stadijos reagentais (Tago, Burlingame, Kalifornija). Ląstelės paskutinį kartą perplaunamos ir analizuojamos FACScan (Becton Dickinson).

SDS-PAGE ir molekulinų sietų chromatografija

SDS-PAGE buvo vykdomas naudojant Tris/glicino 4-20 % akrilamidinius gelius (Novex, San Diego, CA). Analitiniai geliai buvo dažomi Coomassie Blue ir skaitmeninio skanavimo būdu buvo gaunami šlapių gelių

atvaizdai. CTLA4Ig (25 µg) ir L104EA29YIg (25 µg) buvo analizuojami molekulinį sietų chromatografijos metodu, naudojant TSK-GEL G300 SW_{XL} kolonėlę (7,8 x 300 mm, Tosohaas, Montgomeryville, PA), pusiausvyriną fosfatiname druskos buferyje, turinčiame 0,02 % NaN₃, naudojant 1,0 ml/min. srauto greitį.

CTLA4X_{C120S} ir L104EA29YX_{C120S}

Viengrandininė CTLA4X_{C120S} buvo paruošta pagal anksčiau duotą aprašymą (Linsley et al., (1995) *J. Biol. Chem.*, 270:15417-15424). Trumpai tariant, onkostatino M CTLA4 (OMCTLA4) ekspresijos plazmidė buvo naudojama kaip matrica, priešakinis pradmuo

GAGGTGATAAAGCTTCACCAATGGGTGTACTGCTCACACAG buvo

pasirinktas taip, kad atitiktų vektoriaus sekas, o atvirkštinis pradmuo

GTGGTGTATTGGTCTAGATCAATCAGAATCTGGGCACGGTTC

atitiko paskutines septynias aminorūgštis (t.y. aminorūgštis 118-124) ekstraląstelinėje CTLA4 dalyje ir turėjo restrikcijos fermento vietą ir stop-kodoną (TGA). Atvirkštinis pradmuo apibrėžė C120S (cisteinas keičiamas serinu 120 padėtyje) mutaciją. Konkrečiau, aukščiau parodyta atvirkštinio pradmens nukleotidų seka GCA (34-36 nukleotidai) yra pakeista viena iš tokių nukleotidų sekų: AGA, GGA, TGA, CGA, ATC arba GCT. Specialistai supras, kad nukleotidų seka GCA yra atvirkščia komplementariai cisteino kodono sekai. Panašiu būdu nukleotidų sekos AGA, GGA, TGA, CGA, ATC arba GCT yra atvirkščios komplementarioms serino kodonų sekoms. Polimerazinės grandinės sintezės produktai buvo skaldomi *HindIII/XbaI* ir tiesiogiai įklonuoti į ekspresijos vektorių π LN (Bristol-Myers Squibb Company, Princeton, NJ). L104EA29YX_{C120S} buvo pagaminta analogišku būdu. Abu konstruktai buvo patikrinti nustatant DNR sekas.

Didelės surišimo gebos mutantų identifikavimas ir biocheminis charakterizavimas

Mutagenezei buvo pasirinktos 24 aminorūgštys ir ištirtas susidariusių ~2300 mutantinių baltymų susirišimas su CD86lg panaudojant paviršiaus plazmonų rezonansą (SPR; kaip aprašyta aukščiau). Dominuojantys mutagenezės kiekvienoje vietoje efektai susumuoti toliau duotoje II lentelėje. Atrodo, kad atsitiktinė kai kurių aminorūgščių mutagenezė CDR-1 (S25-R33) srityje nekeičia susirišimo su ligandu. Atrodo, kad E31 ir R33 ir M97-Y102 liekanų mutagenezė duoda sumažintą susirišimą su ligandu. S25, A29 ir T30, K93, L96, Y103, L104 ir G105 liekanų mutagenezė davė baltymus su mažais „[“ ir/arba mažais „iš“ greičiais. Šie rezultatai patvirtina ankstesnius duomenis, kad liekanos CDR-1 (S25-R33) srityje ir liekanos M97-Y102 srityje arba netoli jos veikia susirišimą su ligandu (Peach et al., (1994) *J. Exp. Med.* 180:2049-2058).

S25, T30, K93, L96, Y103 ir G105 vietų mutagenezė leido identifikuoti kai kuriuos mutantinius baltymus, kurie turi mažesnius CD86lg komplekso „iš“ greičius. Tačiau šiais atvejais mažesnis „iš“ greitis buvo kompensuojamas mažesnio „[“ greičio, ir gauti mutantiniai baltymai, kurių bendra susirišimo su CD86lg geba buvo maždaug panaši į laukinio tipo CTLA4lg gebą. Be to, K93 mutagenezė sukėlė žymią agregaciją, kuri gali būti atsakinga už pastebėtus kinetikos pokyčius.

Atsitiktinė L104 mutagenezė, po kurios buvo vykdoma COS ląstelių transfekcija ir auginimo terpės mėginių skryningas SPR metodu pagal imobilizuotą CD86lg, davė šešis terpės mėginius, kuriuose buvo mutantiniai baltymai su maždaug 2 kartus mažesniais „iš“ greičiais nei laukinio tipo CTLA4lg. Kai buvo sekvenuotos atitinkamos šių mutantų kDNR, buvo rasta, kad kiekviena iš jų koduoja leucino mutaciją į glutamo rūgštį (L104E). Taigi, leucino 104 pakeitimas asparto rūgštimi, matyt, neveikia susirišimo su CD86lg.

Tada buvo pakartota mutagenezė kiekvienoje II lentelėje išvardintoje vietoje, šį kartą PGS matrica naudojant L104E vietą laukinio tipo CTLA4lg,

kaip aprašyta aukščiau. SPR analizė, vėl gi naudojant imobilizuotą CD86Ig, leido identifikuoti šešis auginimo terpės mėginius iš alanino 29 mutagenėzės, turinčius baltymų, kurių "iš" greičiai yra 4 kartus mažesni nei laukinio tipo CTLA4Ig. Du lėčiausi turėjo tirozino pakeitimą (L104EA29Y), du – leucino (L104EA29L), vienas – triptofano (L104EA29W) ir vienas – treonino (L104EA29T). Taigi, nebuvo nustatyta mažo "iš" greičio mutantų, kai tik vienas alaninas 29 buvo atsitiktinai mutuotas laukinio tipo CTLA4Ig.

Išgryninto L104E ir L104EA29YIg molekulinė masė ir agregacijos būseną buvo nustatyta SDS-PAGE ir molekulių sietų chromatografijos metodais. L104EA29YIg (~1 µg; 3 juostelė) ir L104EIg (~1 µg; 2 juostelė) aiškiai turi tą patį elektroforetinį judrumą kaip ir CTLA4Ig (~1 µg; 1 juostelė) redukuojančiomis (~50 kDa; +βME; plius 2-merkaptoetanolis) ir neredukuojančiomis (~100 kDa; -βME) sąlygomis (Fig.25A). Molekulių sietų chromatografija parodė, kad L104EA29YIg (Fig.25C) aiškiai turi tą patį judrumą, kaip ir dimerinis CTLA4Ig (Fig.25B). Didžiausios smailės reiškia baltymo dimerą, o greičiau eliuuojama mažesnė smailė fig.25B reiškia didesnės molekulinės masės agregatus. Maždaug 5,0 % CTLA4Ig yra didesnės molekulinės masės agregatų pavidalo, bet nėra L104EA29YIg arba L104EIg agregacijos požymių. Taigi stipresnis stebimas L104EIg ir L104EA29YIg susirišimas su CD86Ig negali būti priskiriamas mutagenėzės sukeltai agregacijai.

Pusiausvyros ir surišimo kinetikos analizė

Pusiausvyros ir surišimo kinetikos analizė buvo atlikta naudojant išgrynintus A baltymą CTLA4Ig, L104EIg ir L104EA29YIg paviršiaus plazmonų rezonanso (SPR) metodu. Rezultatai parodyti I lentelėje toliau. Stebimos pusiausvyrinės disociacijos konstantos (K_d ; I lentelė) buvo apskaičiuotos iš surišimo kreivių, gautų koncentracijų (5,0-200 nM) ribose. L104EA29YIg su CD86Ig rišasi stipriau nei L104EIg arba CTLA4Ig. Mažesnė L104EA29YIg K_d (3,21 nM) nei L104EIg (6,06 nM) arba CTLA4Ig (13,9 nM) rodo didesnę L104EA29YIg susirišimo su CD86Ig gebą. Mažesnė

L104EA29YIg K_d (3,66 nM) nei L104Elg (4,47 nM) arba CTLA4Ig (6,51 nM) rodo didesnę L104EA29YIg susirišimo su CD80Ig gebą.

Surišimo kinetikos analizė parodė, kad palyginamieji CTLA4Ig, L104Elg ir L104EA29YIg susirišimo su CD80 "į" greičiai yra panašūs į susirišimo su CD86Ig "į" greičius (I lentelė). Tačiau šių molekulių "iš" greičiai yra neekvivalentiški (I lentelė). Lyginant su CTLA4Ig, L104EA29YIg turi maždaug 2 kartus mažesnę CD80Ig komplekso "iš" greitį ir maždaug 4 kartus mažesnę CD86Ig komplekso "iš" greitį. L104E turi tarpinius "iš" greičius tarp L104EA29YIg ir CTLA4Ig. Kadangi šių mutacijų įvedimas nežymiai veikia "į" greičius, stebima didesnė L104EA29YIg susirišimo su CD80Ig ir CD86Ig geba tikriausia yra dėl "iš" greičių sumažėjimo.

Norint nustatyti ar L104EA29YIg surišimo su CD80Ig ir CD86Ig gebos padidėjimas yra dėl mutacijų, veikiančių kiekvieno monomero asociacijos į dimerą būdą, ar šį gebos padidėjimą sukelia struktūriniai kiekvieno monomero pokyčiai, buvo pagaminti viengrandiniai CTLA4 ir L104EA29Y ekstraląstelinės dalies konstruktai po cisteino 120 mutagenezės į seriną, kaip aprašyta *supra* ir Linsley et al., (1995) *J. Biol. Chem.* 270:15417-15424. Prieš jų susirišimo su ligandu analizę SPR metodu, analizuojant gelchromatografijos metodu (Linsley et al., (1995), *supra*) buvo parodyta, kad išgryninti CTLA4X_{C120S} ir L104EA29YX_{C120S} baltymai yra monomeriniai. Rezultatai parodė, kad abiejų monomerinių baltymų susirišimo su CD86Ig geba yra maždaug 35-80 kartų mažesnė nei jų atitinkamų dimerų (I lentelė). Tai patvirtina anksčiau publikuotus duomenis, rodančius kad didelei susirišimo su ligandu gebai yra reikalinga CTLA4 dimerizacija (Greene et al., (1990) *J. Biol. Chem.*, 271:26762-26771).

L104EA29YX_{C120S} rišasi su CD80Ig ir CD86Ig maždaug 2 kartus stipriau nei CTLA4X_{C120S}. Šis padidintas afiniškumas yra dėl maždaug 3 kartus mažesnio atskilimo nuo abiejų ligandų greičio. Taigi, stipresnis L104EA29YX susirišimas su ligandu tikriausiai yra dėl gebą sustiprinančių struktūrinių pokyčių, kurie buvo įvesti į monomerinę grandinę, o ne dėl molekulinės dimerizacijos pokyčių.

Surišimo gebą didinančių mutacijų padėties ir struktūrinė analizė

Neseniai BMR spektroskopijos metodu buvo nustatyta CTLA4 IgV-tipo ekstraląstelinės dalies struktūra tirpale (Metzler et al., (1997) *Nature Struct. Biol.*, 4:527-531. Tai leido identifikuoti leucino 104 ir alanino 29 tikslią padėtį trimatėje struktūroje (Fig.11A-B). Leucinas 104 yra netoli labai konservatyvios MYPPPY aminorūgščių sekos. Alaninas 29 yra ties CDR-1 (S25-R33) srities C-galu, kuris yra erdviškai greta MYPPPY srities. Nors yra stipri sąveika tarp šių dviejų sričių bazių liekanų, tikriausiai nėra tiesioginės sąveikos tarp L104 ir A29, nors jos abi sudaro dalį gretimos baltymo hidrofobinės šerdies. Abiejų surišimo gebą stiprinančių mutantų struktūriniai padariniai buvo įvertinti modeliuojant. A29Y mutacija gali būti nesunkiai pritaikyta plyšyje tarp CDR-1 (S25-R33) srities ir MYPPPY srities ir gali stabilizuoti MYPPPY srities konformaciją. Laukinio tipo CTLA4 L104 sudaro stiprias hidrofobines sąveikas su L96 ir V94 ties MYPPPY sritimi. Labai nepanašu, kad glutamo rūgšties mutacija priima panašią į L104 konformaciją dėl dviejų priežasčių. Pirmiausia, ilgesnei glutamo rūgšties šoninei grandinei nepakanka vietos be žymių CDR-1 (S25-R33) srities perturbacijų. Antra, glutamo rūgšties šoninės grandinės neigiamo krūvio paslėpimas hidrofobinėje srityje energetiškai turėtų būti labai nepalankus. Atvirkščiai, modeliavimo tyrimai rodo, kad glutamo rūgšties šoninė grandinė iššoka į paviršių, kur jos krūvį gali stabilizuoti solvatacija. Tokį konformacijos pokytį galima lengvai pritaikyti G105, tik minimaliai išjudinant kitas šių sričių liekanas.

Didelės surišimo gebos mutantų susijungimas su CD80 arba CD86 ekspresuojančiomis CHO ląstelėmis

CTLA4Ig ir mutantinių molekulių susirišimo su stabiliai transfekuotomis CD80+ ir CD86+ CHO ląstelėmis FACS analizė (fig.27) buvo atlikta čia aprašytu būdu. CD80-teigiamos ir CD86-teigiamos CHO ląstelės buvo inkubuojamos imant didėjančias CTLA4Ig, L104EA29YIg arba L104EIg koncentracijas, o po to perplaunamos. Surištas imunoglobulininis sulietas

baltymas buvo nustatytas naudojant konjuguotą su fluoresceino izocianatu ožkos anti-žmogaus imunoglobuliną.

Kaip parodyta fig.27, CD80-teigiamos arba CD-86-teigiamos CHO ląstelės ($1,5 \times 10^5$) buvo inkubuojamos su nurodytą koncentracijų CTLA4Ig (juodi kvadratai), L104EA29YIg (apskritimai) arba L104EIg (trikampiai) tirpalais 2 val. 23 °C temperatūroje, perplaunama ir inkubuojama su konjuguotu su fluoresceino izotiocianatu ožkos anti-žmogaus imunoglobulininiu antikūnu. FACScan'u buvo analizuotas 5000 gyvybingų ląstelių susirišimas (vienas nustatymas) ir iš histogramų duomenų, naudojant PC-LYSYS, nustatytas fluorescencijos intensyvumo vidurkis (MFI). Duomenys buvo pakoreguoti dėl foninės fluorescencijos, išmatuojant ląsteles, inkubuotas tik su antrosios stadijos reagentu (MFI = 7). Kontrolinis L6 mAb (80 µg/ml) dave MFI < 30. Šie rezultatai būdingi 4 nepriklausomiems matavimams.

L104EA29YIg, L104EIg ir CTLA4Ig susirišimo su žmogaus CD80-transfekuotomis CHO ląstelėmis yra maždaug vienodi (fig.27A). L104EA29YIg ir L104EIg rišasi stipriau su CHO ląstelėmis, stabiliai infekuotomis žmogaus CD86, nei CTLA4Ig (fig.27B).

Funkciniai testai:

Žmogaus CD4-teigiamos T ląstelės buvo išskirtos imunomagnetinės neigiamosios selekcijos metodu (Linsley et al., (1992) *J. Exp. Med.* 176:1595-1604). Išskirtos CD4-teigiamos T ląstelės buvo stimuliuojamos forbalmiristato acetatu (PMA) plius CD80-teigiamomis arba CD86-teigiamomis CHO ląstelėmis esant titruojančioms inhibitoriaus koncentracijoms. CD4-teigiamos T ląstelės ($8-10 \times 10^4$ /duobutei) buvo auginamos esant 1 nM PMA, pridėjus arba ne pridėjus apspinduliuotų CHO ląstelių stimuliatorių. Proliferacijos atsakai buvo matuojami pridėdant 1 µCi/duobutei [³H]timidino, likus 7 val. iki 72 val. trukmės auginimo pabaigos. Buvo vykdomas PMA plius CD80-teigiamų CHO arba CD86-teigiamų CHO stimuliuotų T ląstelių inhibavimas L104EA29YIg ir CTLA4Ig. Rezultatai parodyti fig.28. L104YIg inhibuoja CD80-teigiamų PMA paveiktų CHO ląstelių proliferaciją labiau nei CTLA4Ig (fig.28A). L104EA29YIg taip pat efektyviau nei CTLA4Ig inhibuoja CD86-

teigiamų PMA paveiktų CHO ląstelių proliferaciją (fig.28B). Todėl L104EA29YIg yra veiksmingesnis ir CD80- ir CD86-tarpininkaujamos T ląstelių kostimuliacijos inhibitorius.

Fig.29 parodytas aukščiau pagamintų alostimuliuotų žmogaus T ląstelių ir toliau alostimuliuotų žmogaus B limfoblastoidinių ląstelių linijos (LCL), vadinamos PM, kuri ekspresuoja CD80 ir CD86 (T ląstelių $3,0 \times 10^4$ /duobutei, o PM $8,0 \times 10^3$ /duobutei), inhibavimas L104EA29YIg ir CTLA4Ig. Pirminė alostimuliacija vyko 6 dienas, po to ląstelės buvo apspinduliuotos ^3H -timidinu 7 valandas ir nustatytas radioaktyvios žymės įsiterpimas.

Antrinė alostimuliacija buvo vykdoma tokiu būdu. Septintą pirminės alostimuliacijos dieną T-ląstelės buvo surinktos, užpiltos ant limfocitinės atskyrimo terpės (LSM) (ICN, Aurora, OH) ir paliktos 24 valandoms. Tada T ląstelės buvo restimuliuotos (antrinė stimuliacija) esant titruojantiems kiekiams CTLA4Ig arba L104EA29YIg, pridedant PM tuo pačiu santykiu kaip ir prieš tai. Stimuliavimas vyko 3 dienas, po to ląstelės buvo apspinduliuotos radioaktyvia žyme ir surinktos taip pat, kaip ir prieš tai. L104EA29YIg poveikis į pirminės alostimuliacijos T ląsteles yra parodytas fig.29A. L104EA29YIg poveikis į antrinės alostimuliacijos T ląsteles yra parodytas fig.29B. L104EA29YIg inhibuoja ir pirminį, ir antrinį T ląstelių proliferacinius atsakus geriau nei CTLA4Ig.

Norint išmatuoti citokinų produkciją (fig.30), buvo paruošti antrinės alostimuliacijos dublikatai. Po 3 dienų auginimo, terpė buvo tirta naudojant ELISA rinkinius (Biosource, Camarillo, CA) pagal gamintojo rekomenduojamas sąlygas. Rasta, kad L104EA29YIg veiksmingiau nei CTLA4Ig blokuoja T ląstelių IL-2, IL-4 ir γ -IFN citokinų produkciją po antrinio alogeninio stimulo (fig. 30A-C).

L104EA29YIg ir CTLA4Ig poveikiai į beždžionių mišrų limfocitinį atsaką (MLR) parodyti fig.31. Periferinio kraujo monobranduolinės ląstelės (PBMC; $3,5 \times 10^4$ ląstelių/duobutei iš kiekvienos beždžionės) iš 2 beždžionių buvo išgrynintos panaudojant limfocitų atskyrimo terpę (LSM) ir sumaišytos su 2 $\mu\text{g/ml}$ fitohemaglutinino (PHA). Ląstelės buvo stimuliuojamos 3 dienas, po to

apspinduliuotos 16 valandų ir surinktos. L104EA29YIg inhibavo beždžionės T ląstelių proliferaciją geriau nei CTLA4Ig.

I lentelė:

Šioje lentelėje yra duodamos pusiausvyros ir stebimos kinetinės konstantos (reikšmės yra vidurkis $\pm$ standartinis nukrypimas iš trijų skirtingų eksperimentų):

Imobilizuotas baltymas	Analitė	$k_i (x10^5) M^{-1}S^{-1}$	$k_{is} (x10^5) M^{-1}S^{-1}$	K_d nM
CD80Ig	CTLA4Ig	3,44 $\pm$ 0,29	2,21 $\pm$ 0,18	6,51 $\pm$ 1,08
CD80Ig	L104EIg	3,02 $\pm$ 0,05	1,35 $\pm$ 0,08	4,47 $\pm$ 0,36
CD80Ig	L104EA29YIg	2,96 $\pm$ 0,20	1,08 $\pm$ 0,05	3,66 $\pm$ 0,41
CD80Ig	CTLA4X _{C120S}	12,0 $\pm$ 1,0	230 $\pm$ 10	195 $\pm$ 125
CD80Ig	L104EA29YX _{C120S}	8,3 $\pm$ 0,26	75 $\pm$ 5	85,0 $\pm$ 2,5
CD86Ig	CTLA4Ig	5,95 $\pm$ 0,57	8,16 $\pm$ 0,52	13,9 $\pm$ 2,27
CD86Ig	L104EIg	7,03 $\pm$ 0,22	4,26 $\pm$ 0,11	6,06 $\pm$ 0,05
CD86Ig	L104EA29YIg	6,42 $\pm$ 0,40	2,06 $\pm$ 0,03	3,21 $\pm$ 0,23
CD86Ig	CTLA4X _{C120S}	16,5 $\pm$ 0,5	84 $\pm$ 55	511 $\pm$ 17
CD86Ig	L104EA29YX _{C120S}	11,4 $\pm$ 1,6	300 $\pm$ 10	267 $\pm$ 29

II lentelė:

CD86Ig surišimo efektas panaudojant CTLA4Ig mutagenezę išvardintose vietose buvo nustatytas aukščiau aprašytu SPR metodu. Žymus poveikis pažymėtas "+" ženklu.

Mutagenezės vieta	Mutagenezės efektai		
	nėra stebimo poveikio	lėtas "į" greitis/lėtas "iš" greitis	sumažintas ligando surišimas
S25		+	
P26	+		
G27	+		
K28	+		
A29		+	
T30		+	

E31			+
R33			+
K93		+	
L96		+	
M97			+
Y98			+
P99			+
P100			+
P101			+
Y102			+
Y103		+	
L104		+	
G105		+	
I106	+		
G107	+		
Q111	+		
Y113	+		
Y115	+		

3 PAVYZDYS

Toliau yra duodamas II klinikinės fazės tyrimų su pacientais-žmonėmis aprašymas, skiriant tirpią CTLA4 mutantinę molekulę L104EA29YIg (taip pat žinoma kaip LEA29Y arba LEA) arba CTLA4Ig, kad būtų palengvinamas bent vienas simptomas, susijęs su reumatinio artritu, įskaitant sąnarių patinimo, sąnarių jautrumo, uždegimo, rytinio nejudrumo ir skausmo sumažinimą. Čia naudojama CTLA4Ig molekulė prasideda nuo metionino +1 padėtyje (arba kitu atveju nuo alanino -1 padėtyje) ir baigiasi lizinu +357 padėtyje, kaip parodyta fig.24. DNR, koduojanti gaunamą CTLA4Ig molekulę, buvo deponuota kaip ATCC 68629. Čia naudojama L104EA29YIg molekulė prasideda nuo metionino +1 padėtyje (arba kitu atveju nuo alanino -1 padėtyje) ir baigiasi lizinu +357 padėtyje, kaip parodyta fig.19. DNR, koduojanti gaunamą L104EA29YIg molekulę, buvo deponuota kaip ATCC PTA 2104.

Be to, toliau yra duodamas aprašymas pacientų-žmonių, gavusių L104EA29YIg arba CTLA4Ig, kad būtų pagerinamas bent vienas iš su reumatinio artritu susijusių biologinių pakaitinių rodiklių, įskaitant eritrocitų sedimentacijos greičių, C-reaktyvaus baltymo ir/arba IL1 receptoriaus kiekių serume sumažėjimą.

Pacientų grupės

Tyrimė dalyvavo iš viso 214 pacientų: 54 vyrai ir 160 moterų (fig.1A, 1B). Pagrindiniai pacientai sirgo jau 3,4 ($\pm 2,0$) metų ir jiems nepadėjo bent vienas iš ligą modifikuojančių priešreumatinių vaistų (DMARD). Jiems buvo leista vartoti stabilūs nesteroidinius priešuždegiminius vaistus (NSAID) arba steroidus (≤ 10 mg/per dieną), ir buvo uždrausta kartu vartoti DMARD. Pacientai buvo atsitiktinai išskirstyti į grupes po 25-32 pacientus. Trisdešimt du pacientai gavo placebo, 92 gavo L104EA29Ylg ir 90 gavo CTLA4lg. Pacientai, kurie vykdė protokolinius nurodymus ir nenutraukė gydymo prieš 57-tą dieną, gavo iš viso 4 intravenines infuzijas 1-ą, 15-tą, 29-tą ir 57-tą dieną. Visi pacientai buvo apžiūrimi 1-ą, 15-tą, 29-tą, 43-čią, 57-tą, 71-ą ir 85-tą dieną. Skiriamos dozės buvo 0,5, 2,0 arba 10,0 mg/kg L104EA29Ylg (fig. 1A-1E pažymėta atitinkamai LEA.5, LEA2 ir LEA10) arba CTLA4lg (fig. 1A-1E pažymėta atitinkamai CTLA.5, CTLA2 ir CTLA10).

Visi subjektai buvo stebėti, ar neatsiras peri-infuzinių šalutinių poveikių ir dėl bendros rizikos, panaudojant atsakymus į klausimų sąrašą apie galimus šalutinius poveikius. Pacientai buvo klausinėjami apie galimus šalutinius poveikius, kurie galėjo atsirasti per 24 valandas po infuzijos. Be to, pacientai buvo paraginti tuoj pat pranešti apie bet kokį nemalonų atsitikimą, kurį jie patyrė. Gydytojai paprastai tikrino iš pacientų paimtus laboratorinius mėginius, stebėdami anomalijas kraujo chemijoje ir hematologijoje, pvz. nustatinėjo uždegiminio atsako mediatorių, tokių kaip citokinai (TNF, IL-6), triptazė ir komplementas, kiekius. Svarbiausias dalykas buvo dalis subjektų, patenkinančių ACR 20 kriterijų 85-tą dieną.

Tiriamosios medžiagos laikymas

CTLA4lg ir L104EA29Ylg buvo pateikti vienkartinio naudojimo stiklinėse ampulėse, turinčiose atitinkamai 200 mg/ampulėje CTLA4lg arba 100 mg/ampulėje L104EA29Ylg. Prieš infuziją CTLA4lg ir L104EA29Ylg buvo praskiesti iki 25 mg/ml galutinės koncentracijos steriliu vandeniu injekcijoms (SWFI).

Vartojimo protokolas

Visos infuzijos buvo daromos į veną per 1 val (fig.1-17). Visi pacientai gavo mažiausiai vieną tiriamojo vaisto infuziją.

1 grupė: 32 pacientai, į CTLA4Ig arba L104EA29YIg panašus placebo.

2 grupė: 26 pacientai; CTLA4Ig 0,5 mg/kg dozė.

3 grupė: 32 pacientai; CTLA4Ig 2,0 mg/kg dozė.

4 grupė: 32 pacientai; CTLA4Ig 10,0 mg/kg dozė.

5 grupė: 32 pacientai; L104EA29YIg 0,5 mg/kg dozė.

6 grupė: 29 pacientai; L104EA29YIg 2,0 mg/kg dozė.

7 grupė: 31 pacientai; C L104EA29YIg 10,0 mg/kg dozė.

Klinikinis monitoringas

Prieš infuziją buvo įvertinti pacientų ligos aktyvumo bazinės linijos simptomai. Šie bazinės linijos įvertinimai buvo: sąnarių patinimas, sąnarių jautrumas, uždegimas, rytinis nejudrumas, paciento ir gydytojo įvertintas ligos aktyvumas bei negalia, įvertinta pagal Sveikatos vertinimo klausimyną (HAQ) (fig.1C pažymėta kaip fizinės funkcijos balas) ir skausmas (fig.1A-1D). Be to, į bazinės linijos įvertinimą įėjo eritrocitų sedimentacijos greičiai (ESR) ir C-reaktyvaus baltymo ir tirpaus IL-2 receptoriaus (IL-2r) kiekiai serume (fig.1C ir 1D).

Klinikinio atsako tyrimai buvo paremti Amerikos reumatologijos kolegijos (ACR) nustatytais kriterijais. Subjektas tenkino ACR 20 kriterijų, jeigu buvo jautrių ir patinusių sąnarių skaičiaus 20 procentų pagerėjimas ir trijų iš likusių penkių matuotų simptomų, tokių kaip paciento ir gydytojo įvertinti bendro ligos stovio pakitimai, skausmo, negalios ir ūmios fazės reaktyvumo 20 procentų pagerėjimas (Felson, D.T. et al., 1993 *Arthritis and Rheumatism* 36:729-740; Felson, D.T., et al., 1995 *Arthritis and Rheumatism* 38:1-9).

Biorodikliai

Taip pat buvo įvertinami galimi ligos aktyvumo biorodikliai (reumatinis faktorius, CRP, ESR, tirpus IL-2R, tirpus ICAM-1, tirpus E-selektinas ir MMP-3). IL-2sR α , sICAM-1, sE-selektino ir MMP-3 koncentracijoms serume nustatyti buvo naudojami patvirtinti fermentinio imunotesto (EIA) metodai. Jeigu reikia, TNF α ir IL-6 buvo nustatomi prieš infuziją ir praėjus 2 valandoms po infuzijos.

IL-2sR α , sICAM-1 ir sE-selektinas buvo matuoti naudojant prekybinius kolorimetrinius EIA rinkinius iš R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN). Žemiausia ir aukščiausia kiekybinio nustatymo ribos buvo atitinkamai 312-20000 pg/ml, 40-907 ng/ml ir 10-206 ng/ml. Variacijos koeficientas tarp bandymų buvo atitinkamai 4,48-8,4 %, 3,8-5,0 % ir 5,5-9,0 % ribose. Pagal rinkinio gamintoją normalūs kiekiai serume yra atitinkamai 676-2132 pg/ml.

MMP-3 buvo matuotas naudojant prekybinį kolorimetrinį EIA rinkinį iš Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, Nj). Žemiausia ir aukščiausia kiekybinio nustatymo ribos buvo 30-7680 ng/ml. Variacijos koeficientas tarp bandymų buvo 6,3-10,6 % ribose. Pagal rinkinio gamintoją normalūs kiekiai serume yra 28-99 ng/ml.

IL-6 ir TNF α buvo matuoti naudojant prekybinius chemiliuminescencinius EIA rinkinius iš R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN). Žemiausia ir aukščiausia kiekybinio nustatymo ribos buvo atitinkamai 0,3-3000 pg/ml ir 0,7-7000 pg/ml. Variacijos koeficientas tarp bandymų buvo atitinkamai 3,1-5,7 % ir 6,4-20,7 % ribose. Pagal rinkinio gamintoją normalūs kiekiai serume yra atitinkamai <0,3-12 pg/ml ir <0,7-7,5 pg/ml.

Antikūnų tyrimas

Prieš duodant pirmą dozę 1-ą dieną ir maždaug 15-tą, 29-tą, 57-tą, 85-tą ir 169-tą dieną buvo imami serumo mėginiai vaistui specifiniams antikūnams nustatyti. Dėl didelių jau esančių titrų prieš molekulės

imunoglobulino (Ig) dalį, taip pat buvo nustatomas specifinių antikūnų susidarymas prieš CTLA4Ig ir LEA29Y be Ig pastoviosios srities.

Devyniasdešimt šešių duobučių Immulon II ELISA plokštelės (Dynex, Chantilly, Virginia) buvo padengtos CTLA4Ig, CTLA4Ig be Ig pastoviųjų sričių, LEA29Y arba LEA29Y be Ig pastoviųjų sričių, imant atitinkamai 2,4, 2 arba 1 µg/ml fosfatiniame buferyje su NaCl (PBS), ir inkubuojamos per naktį 2-8 °C temperatūroje. Plokštelės buvo plaunamos PBS, turinčiu 0,05 % Tween 20 ir blokuojamos 1 val 37 °C temperatūroje PBS, turinčiu 1 % jaučio serumo albumino (BSA). Po to plokštelės buvo plaunamos, į atitinkamas duobutes buvo pridedama serijinių praskiedimų tiriamojo serumo arba kokybės kontrolės (QC) serumo ir inkubuojama 2 valandas 37 °C temperatūroje. Serumai buvo skiedžiami tris kartus PBS su 0,25 % BSA ir 0,05 % Tween 20, pradedant nuo 1:10 praskiedimo. Plokštelės buvo perplaunamos ir pridedama su šarmine fosfataze konjuguoto ožkos anti-žmogaus kapa ir lambda (Southern Biotechnology Associates, Inc. Birmingham, Alabama) antikūnų kokteilio. Po 1 val. inkubavimo 37 °C temperatūroje plokštelės buvo perplaunamos ir į kiekvieną duobutę pridedama 1 mg/ml para-nitrofenilfosfato dietanolamino buferyje. Palaikius 30 minučių 25 °C temperatūroje, reakcija stabdoma 3N NaOH ir registruojamas optinis tankis (du bangos ilgiai: 405 ir 550 nm). Rezultatai išreiškiami kaip galinio taško titras (EPT), apibrėžiamas kaip didžiausio praskiedimo, kuris davė optinio tankio atskaitymus, penkis kartus didesnius arba lygius plokštelės fono vidurkiui, atvirkštinis dydis. Plokštelės fonas buvo nustatytas matuojant optinį tankį ne pridėjus serumo. Reikšmės yra laikomos teigiamomis serumo konversijos prasme, jeigu jos buvo mažiausiai dviejų serijinių praskiedimų (devynis kartus) arba didesnių nei EPT reikšmės prieš vaisto dozės įvedimą. Serumo QC mėginiai, teigiami arba CTLA4Ig- arba LEA29Y-specifiniams antikūnams, buvo gauti iš imunizuotų beždžionių. Atitinkamo QC mėginio alikvota buvo testuojama kiekvienos analizės metu. Analizės buvo įskaitytos tik tada, kai QC mėginiai atitiko testo priimtino kriterijus.

Rezultatai

Paprastai buvo gerai toleruojamos visos CTLA4Ig ir L104EA29YIg dozės. Peri-infuziniai nepalankūs atsitikimai buvo panašūs visų dozių grupėse, išskyrus galvos skausmus. Pacientų galvos skausmo atsakas 85-tą dieną padidėjo priklausomai nuo dozės 23 %, 44 % ir 53 % CTLA4Ig gydytų pacientų atveju ir 34 %, 45 % ir 61 % L104EA29YIg gydytų pacientų atveju, duodant atitinkamai 0,5, 2,0 ir 10,0 mg/kg dozės. Priešingai, 31 % pacientų patyrė placebo sukeltus galvos skausmus.

Pacientų, kurie nutraukė šį klinikinį tyrimą dėl artrito paūmėjimų ir kitų nepalankių atsitikimų, procentai susumuoti fig.2. Daug didesnis procentas placebo gavusių pacientų nutraukė gydymą dėl artrito paūmėjimo. Mažesnis skaičius CTLA4Ig gydytų pacientų nutraukė gydymą didėjant dozėms. Labai nedaug L104EA29YIg gydytų pacientų nutraukė gydymą. Šie rezultatai rodo gerą nuo dozės priklausančią atvirkštinį atsaką į CTLA4Ig ir stipresnį terapinį atsaką gydant L104EA29YIg.

Pacientų, gydytų CTLA4Ig, L104EA29YIg arba placebo ACR-20, -50 ir -70 atsakai 85-tą dieną susumuoti fig.3A. Panašiai fig.3B ir C aprašo atsakus su 95 % patikimumo ribomis. Pasirodo, kad atsakai priklauso nuo dozės, esant aiškiai išreikštam atsakui, kai duota dozė yra 10 mg/kg paciento kūno masės.

Procentas pacientų, turinčių sumažintą patinusių ir jautrių sąnarių skaičių, lyginant su pacientais, nedavusiais atsako į gydymą CTLA4Ig, L104EA29Yig arba placebo, yra parodytas fig.4A ir B. Pasirodo, kad terapiniai atsakai priklauso nuo dozės. Didesnis procentas pacientų rodo pagerėjimą 20, 50, 70 ir netgi 100 % abiejų produktų 2 ir 10 mg/kg grupėse.

Procentas pacientų, turinčių sumažintą skausmą, ligos aktyvumą pagal paciento ir gydytojo įvertintus vidutinio balo vienetus, gydant CTLA4Ig, L104EA29YIg arba placebo, yra parodytas fig.5A, B, C ir D. Pasirodo, kad terapiniai atsakai, vertinant pagal Likerto skalę, priklauso nuo dozės 85-tą dieną veikliojo gydymo grupių naudai, lyginant su placebo. Likerto skalė yra patvirtinta reitingavimo skalė, naudojant koeficientus simptomų klasifikacijai (The American College of Rheumatology Preliminary Core Set of Disease

Activity Measures for Rheumatoid Arthritis Clinical Trials: *Arthritis and Rheumatism*, June 1993, 36(6):729-740).

Paciento ir gydytojo ligos aktyvumo pokyčio nuo bazinės linijos mažiausiai 2 vienetais, atsiradusio dėl gydymo CTLA4Ig, L104EA29YIg arba placebo, įvertinimai yra parodyti fig.6A ir B. Pasirodo, kad atsakai priklauso nuo dozės ir labiausiai išreikštas pagerėjimas yra didesnių veikliojo vaisto dozių atveju.

Pacientų, gydytų CTLA4Ig, L104EA29YIg arba placebo, C-reaktyvaus baltymo (CRP) procentinis sumažėjimas yra parodytas fig.7A ir B. Pasirodo, kad atsakai priklauso nuo dozės, ir aiškus sumažėjimas yra veikliojo gydymo 2 ir 10 mg/kg grupėse. Be to, fig.7B rodo, kad skirtumas yra pakankamai žymus lyginant su placebo su 95 % patikimumo intervalais. Fig.7C rodo pokyčio kiekio serume pokyčius nuo bazinės linijos 85-tą dieną.

Pacientų, gydytų CTLA4Ig, L104EA29YIg arba placebo, tirpaus IL-2 receptoriaus kiekiai serume yra parodyti fig.8. Pasirodo, kad tirpaus IL-2 receptoriaus kiekiai priklauso nuo dozės.

Pacientų, gydytų CTLA4Ig, L104EA29YIg arba placebo, tirpaus ICAM-1 ir tirpaus E-selektino kiekiai serume yra parodyti fig.8. Pasirodo, kad tirpaus ICAM-1 ir tirpaus E-selektino kiekiai priklauso nuo dozės.

Pacientų, gydytų CTLA4Ig arba placebo, tarpinio ir vidutinio jautrių sąnarių skaičiaus priklausomybė nuo laiko yra parodyta fig.9A ir B. Pasirodo, kad pokytis nuo bazinės linijos (pvz. jautrių sąnarių skaičiaus sumažėjimas) yra svarbesnis 2 ir 10 mg/kg gydymo grupėse nei placebo arba 0,5 mg/kg grupėse.

Pacientų, gydytų CTLA4Ig arba placebo, tarpinio ir vidutinio patinusių sąnarių skaičiaus priklausomybė nuo laiko yra parodyta fig.10A ir B. Pasirodo, kad pokytis nuo bazinės linijos (pvz. patinusių sąnarių skaičiaus sumažėjimas) yra svarbesnis 2 ir 10 mg/kg gydymo grupėse nei placebo arba 0,5 mg/kg grupėse.

Pacientų, gydytų CTLA4Ig arba placebo, vidutinių skausmo įvertinimo balų priklausomybė nuo laiko yra parodyta fig.11. Pasirodo, kad pokytis nuo bazinės linijos (pvz. skausmo sumažinimas) yra svarbesnis 2 ir 10 mg/kg gydymo grupėse nei placebo arba 0,5 mg/kg grupėse.

Pacientų, gydytų CTLA4Ig arba placebo, pacientų ir gydytojo vidutinių ligos aktyvumo įvertinimo balų priklausomybė nuo laiko yra parodyta fig.12A ir B. Pasirodo, kad pokytis nuo bazinės linijos (pvz. ligos aktyvumo sumažinimas) yra svarbesnis 2 ir 10 mg/kg gydymo grupėse nei placebo arba 0,5 mg/kg grupėse.

Pacientų, gydytų L104EA29YIg (figūrose pažymėtas LEA) arba placebo, tarpinio ir vidutinio jautrių sąnarių skaičiaus priklausomybė nuo laiko yra parodyta fig.13A ir B. Pasirodo, kad pokytis nuo bazinės linijos (pvz. jautrių sąnarių skaičiaus sumažėjimas) priklauso nuo dozės.

Pacientų, gydytų L104EA29YIg (figūrose pažymėtas LEA) arba placebo, tarpinio ir vidutinio patinusių sąnarių skaičiaus priklausomybė nuo laiko yra parodyta fig.14A ir B. Pasirodo, kad pokytis nuo bazinės linijos (pvz. patinusių sąnarių skaičiaus sumažėjimas) yra svarbesnis 2 ir 10 mg/kg gydymo grupėse nei placebo arba 0,5 mg/kg grupėse.

Pacientų, gydytų L104EA29YIg (figūrose pažymėtas LEA) arba placebo, vidutinių skausmo įvertinimo balų priklausomybė nuo laiko yra parodyta fig.15. Pasirodo, kad pokytis nuo bazinės linijos (pvz. skausmo sumažinimas) priklauso nuo dozės.

Pacientų, gydytų L104EA29YIg (figūrose pažymėtas LEA) arba placebo, pacientų ir gydytojo vidutinių ligos aktyvumo įvertinimo balų priklausomybė nuo laiko yra parodyta fig.16A ir B. Pasirodo, kad pokytis nuo bazinės linijos (pvz. ligos aktyvumo sumažinimas) priklauso nuo dozės.

Pacientų, gydytų CTLA4Ig, L104EA29YIg arba placebo fizinės negalios, įvertintos pagal HAQ 85-tą dieną, procentinis pagerėjimas parodytas fig.17 (Health Assessment Questionnaire (HAQ); Fries, J.F., et al., 1982 *J. of Rheumatology* 9:789-793). Stebimas aiškus šio parametro pagerėjimas.

Tirpaus IL-2r ir C-reaktyvaus baltymo kiekių pokyčiai nuo bazinės linijos priklauso nuo dozės abiejose gydymo grupėse. Po gydymo tirpaus IL-2r kiekiai CTLA4Ig atveju buvo -2%, -10% ir -22% ir L104EA29YIg atveju -4%, -18% ir -32%, duodant atitinkamai 0,5, 2,0 ir 10,0 mg/kg, lyginant su +3% placebo atveju. C-reaktyvaus baltymo kiekiai CTLA4Ig atveju buvo +12%, -15% ir -32% ir L104EA29YIg atveju -47%, -33% ir -47% duodant atitinkamai 0,5, 2,0 ir 10,0 mg/kg, lyginant su +20% placebo atveju (fig.7A).

Nebuvo pastebėta kliniškai žymių pokyčių nuo įprastų hematologinių testų rodiklių, cheminių laboratorinių rodiklių, išskyrus nedidelį IgA ir IgG kiekių mažinimą, kai duodamos didesnės abiejų vaistų dozės, fizinių pokyčių arba gyvybingumo pokyčių. Svarbu pažymėti, kad nei vienas vaistas nesukėlė vaistui specifinių antikūnų.

4 PAVYZDYS

Toliau duodamuose pavyzdžiuose aprašyta II fazės klinikiniai tyrimai su pacientais-žmonėmis, kuriems skiriamas L104EA29YIg struktūrinių pakenkimų sumažinimui arba jų prevencijai, įskaitant kaulų arba sąnarių eroziją, naudojant patvirtintas radiografines skales. Šis struktūrinių pakenkimų sumažinimas arba jų prevencija yra lygiagretus klinikiniam pagerinimui, išmatuotam pagal klinikinius parametrus.

Pacientų kaulų struktūros stovis yra kontroliuojamas prieš gydant CTLA4Ig arba L104EA29YIg. Šiems pacientams buvo skiriama 0,5-20 mg/kg CTLA4Ig arba L104EA29Yig pastoviai kas 2-12 savaičių (vieno arba derinyje su kitais agentais) terapinio pagerinimo palaikymui laikui bėgant. Tam tikrais laiko intervalais buvo matuojamos paciento rankų ir kojų radiogramos: po 6 mėnesių ir po to kasmet, kaip rekomenduoja FDA instrukcijos. Norint nustatyti ar gydymas CTLA4Ig arba L104EA29YIg mažina kaulų degradacijos progresavimą, šie pacientai yra stebimi po 6 ir 12 mėnesių, o po to kasmet. Pacientai kontroliuojami radiografiniais metodais, įskaitant Rentgeno spindulių ir/arba magnetinio rezonanso (MRI) vaizdo gavimo metodus, pagal standartinę gydymo praktiką (Larsen, A.K. and M. Eek 1977 *Acta Radiol. Diag.* 18:481-491; Sharp, J.T., et al., 1985 *Arthritis and Rheumatism* 28:1326-1335). Radiografinių duomenų rezultatai yra įvertinti struktūrinio pažeidimo atžvilgiu, įskaitant kaulų erozijos ir kremzlių sužalojimo progresavimo sulėtinimą, sąnario tarpo susiaurėjimą ir/arba naujų erozijų prevenciją.

Išradimo apibrėžtis

1. Pirmojo agento ir antrojo agento panaudojimas, kur:

- a) pirmasis agentas yra tirpi CTLA4 molekulė, turinti CTLA4 molekulės ekstraląstelinę dalį, kuri rišasi su B7 antigenu, ekspresuotu ant aktyvuotų B ląstelių, o
- b) antrasis agentas yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš kortikosteroidų, nesteroidinių priešuždegiminių vaistų, prednizono, azatioprino, metotreksato, $\text{TFN}\alpha$ blokatorių arba antagonistų, infliksimabo, bet kokio biologinio agento nukreipto į uždegiminį citokiną, hidroksichlorokvino, sulfasalazoprino, aukso druskų, etanercepto, anakinros, ciklofosfamido ir leflunomido, farmacinės kompozicijos, skirtos B7 sąveikoms su CTLA4 ir/arba CD28 blokuoti, gamyboje.

2. Pirmojo agento ir antrojo agento panaudojimas, kur:

- a) pirmasis agentas yra tirpi CTLA4 molekulė, turinti CTLA4 molekulės ekstraląstelinę dalį, kuri rišasi su B7 antigenu, ekspresuotu ant aktyvuotų B ląstelių, o
- b) antrasis agentas yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš kortikosteroidų, nesteroidinių priešuždegiminių vaistų, prednizono, azatioprino, metotreksato, $\text{TFN}\alpha$ blokatorių arba antagonistų, infliksimabo, bet kokio biologinio agento nukreipto į uždegiminį citokiną, hidroksichlorokvino, sulfasalazoprino, aukso druskų, etanercepto, anakinros, ciklofosfamido ir leflunomido, farmacinės kompozicijos, skirtos imuninės sistemos ligai gydyti, gamyboje.

3. Tirpios CTLA4 molekulės, turinčios CTLA4 molekulės ekstraląstelinę dalį, kuri rišasi su B7 antigenu, ekspresuotu ant aktyvuotų B ląstelių, panaudojimas farmacinės kompozicijos, skirtos įvesti subjektui nuo maždaug 0,5 iki 100 mg/kg subjekto masės, 0,5 mg/kg subjekto masės, 2 mg/kg subjekto masės, 10 mg/kg subjekto masės, nuo maždaug 0,5 iki 10 mg/kg subjekto masės

arba nuo maždaug 0,1 iki 20 mg/kg subjekto masės tirpios CTLA4 molekulės B7 sąveikoms su CTLA4 ir/arba CD28 blokuoti, gamyboje.

4. Tirpios CTLA4 molekulės, turinčios CTLA4 molekulės ekstraląstelinę dalį, kuri rišasi su B7 antigenu, ekspresuotu ant aktyvuotų B ląstelių, panaudojimas farmacinės kompozicijos, skirtos įvesti subjektui nuo maždaug 0,5 iki 100 mg/kg subjekto masės, 0,5 mg/kg subjekto masės, 2 mg/kg subjekto masės, 10 mg/kg subjekto masės, nuo maždaug 0,5 iki 10 mg/kg subjekto masės arba nuo maždaug 0,1 iki 20 mg/kg subjekto masės tirpios CTLA4 molekulės imuninės sistemos ligai gydyti, gamyboje.

5. Panaudojimas pagal 1, 2, 3 arba 4 punktą, besiskiriantis tuo, kad tirpi CTLA4 molekulė yra CTLA4 sulieta molekulė, turinti CTLA4 molekulės ekstraląstelinę dalį, kuri rišasi su B7 antigenu, ekspresuotu ant aktyvuotų B ląstelių, sujungtą su ne-CTLA4 molekule, turinčia aminorūgščių seką, kuri pakeičia tirpios CTLA4 molekulės tirpumą arba afiniškumą.

6. Panaudojimas pagal 5 punktą, besiskiriantis tuo, kad aminorūgščių seka, kuri pakeičia tirpumą arba afiniškumą, turi imunoglobulino liekaną.

7. Panaudojimas pagal 6 punktą, besiskiriantis tuo, kad imunoglobulino liekana yra imunoglobulino pastovioji sritis arba jos dalis.

8. Panaudojimas pagal 7 punktą, besiskiriantis tuo, kad imunoglobulino pastovioji sritis arba jos dalis yra mutuota efektorinei funkcijai sumažinti.

9. Panaudojimas pagal 6 punktą, besiskiriantis tuo, kad imunoglobulino liekana turi vieną arba daugiau mutacijų efektorinei funkcijai sumažinti.

10. Panaudojimas pagal 7 punktą, besiskiriantis tuo, kad imunoglobulino pastovioji sritis apima imunoglobulino molekulės šarnyrą, CH2 ir CH3 sritis.

11. Panaudojimas pagal 5 punktą, besiskiriantis tuo, kad CTLA4 sulieta molekulė yra CTLA4Ig.

12. Panaudojimas pagal 1, 2, 3 arba 4 punktą, besiskiriantis tuo, kad tirpi CTLA4 molekulė yra tirpi CTLA4 mutantinė molekulė, kuri rišasi su B7 antigenu, ekspresuotu ant aktyvuotų B ląstelių, ir turi mutaciją CTLA4 molekulės ekstraląstelinėje dalyje.

13. Tirpios CTLA4 molekulės ir antrojo agento derinio panaudojimas, kur:

a) tirpi CTLA4 yra CTLA4Ig, prasidedanti +1 padėtyje esančiu metioninu arba -1 padėtyje esančiu alaninu ir besibaigianti lizinu +357 padėtyje, kaip parodyta fig.24 (SEQ ID NO:19), o

b) antrasis agentas yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš kortikosteroidų, nesteroidinių priešuždegiminių vaistų, prednizono, azatioprino, metotreksato, $TFN\alpha$ blokatorių arba antagonistų, infliksimabo, bet kokio biologinio agento nukreipto į uždegiminį citokiną, hidroksichlorokvino, sulfasalazoprino, aukso druskų, etanercepto, anakinros, ciklofosfamido ir leflunomido,

farmacinės kompozicijos, skirtos imuninės sistemos ligai gydyti, gamyboje.

14. Tirpios CTLA4 molekulės ir antrojo agento derinio panaudojimas, kur:

a) tirpi CTLA4 apima CTLA4 molekulės ekstraląstelinę dalį, kaip parodyta fig.23 (SEQ ID NO:17), prasidedančią +1 padėtyje esančiu metioninu arba -1 padėtyje esančiu alaninu ir besibaigiančią asparto rūgštimi +124 padėtyje, o

b) antrasis agentas yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš kortikosteroidų, nesteroidinių priešuždegiminių vaistų, prednizono, azatioprino, metotreksato, $TFN\alpha$ blokatorių arba antagonistų, infliksimabo, bet kokio biologinio agento nukreipto į uždegiminį citokiną, hidroksichlorokvino, sulfasalazoprino, aukso druskų, etanercepto, anakinros, ciklofosfamido ir leflunomido,

farmacinės kompozicijos, skirtos imuninės sistemos ligai gydyti, gamyboje.

15. Tirpios CTLA4 molekulės ir antrojo agento derinio panaudojimas, kur:

- a) tirpi CTLA4 yra CTLA4 mutantinė molekulė, kuri rišasi su B7 molekule, turinti mutaciją CTLA4 +104 padėtyje, kur +104 padėtyje esantis leucinas, kaip parodyta fig.23 (SEQ ID NO:17), yra pakeistas glutamo rūgštimi, ir mutaciją CTLA4 +29 padėtyje, kur +29 padėtyje esantis alaninas, kaip parodyta fig.23 (SEQ ID NO:17), yra pakeistas tirozinu, o
- b) antrasis agentas yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš kortikosteroidų, nesteroidinių priešuždegiminių vaistų, prednizono, azatioprino, metotreksato, $TFN\alpha$ blokatorių arba antagonistų, infliksimabo, bet kokio biologinio agento nukreipto į uždegiminį citokiną, hidroksichlorokvino, sulfasalazoprino, aukso druskų, etanercepto, anakinros, ciklofosfamido ir leflunomido,
- farmacinės kompozicijos, skirtos imuninės sistemos ligai gydyti, gamyboje.

16. Tirpios CTLA4 molekulės ir antrojo agento derinio panaudojimas, kur:

- a) tirpi CTLA4 yra L104EA29YIg, prasidedantis +1 padėtyje esančiu metioninu arba -1 padėtyje esančiu alaninu ir besibaigiantis lizinu +357 padėtyje, kaip parodyta fig.19 (SEQ ID NO:9), o
- b) antrasis agentas yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš kortikosteroidų, nesteroidinių priešuždegiminių vaistų, prednizono, azatioprino, metotreksato, $TFN\alpha$ blokatorių arba antagonistų, infliksimabo, bet kokio biologinio agento nukreipto į uždegiminį citokiną, hidroksichlorokvino, sulfasalazoprino, aukso druskų, etanercepto, anakinros, ciklofosfamido ir leflunomido,
- farmacinės kompozicijos, skirtos imuninės sistemos ligai gydyti, gamyboje.

17. Panaudojimas pagal 2, 4, 13, 14, 15 arba 16 punktą, besiskiriantis tuo, kad imuninės sistemos liga yra reumatinė liga.

18. Panaudojimas pagal 17 punktą, besiskiriantis tuo, kad reumatinė liga yra reumatinis artritas.

19. Panaudojimas pagal 2, 4, 13, 14, 15 arba 16 punktą, besiskiriantis tuo, kad imuninės sistemos liga yra pasirinkta iš autoimuninių ligų, psoriazės,

su implantų atmetimu susijusių imuninių sutrikimų, T ląstelių limfomos, T ląstelių ūmiosios limfoblastinės leukemijos, sėklidinės angiocentrinės T ląstelių limfomos, gerybinio limfocitinio angiito, raudonosios vilkligės, Hashimoto tiroidito, pirminės miksedemos, Graves'o ligos, piktybinės mažakraujystės, autoimuninio atrofino gastrito, Adisono ligos, nuo insulino priklausančio cukrinio diabeto, geros ganyklos sindromo, sunkiosios miastenijos, pūslinės, ileito, simpatinės oftalmijos, autoimuninio uveito, išsėtinės sklerozės, autoimuninės hemolitinės anemijos, idiopatinės trombocitopenijos, pirminės tulžies cirozės, chroninio hepatito, opinio kolito, Sjogren'o sindromo, reumatinės ligos, reumatinio artrito, polimiozito, sklerodermos, mišrios jungiamojo audinio ligos, uždegiminio reumato, degeneracinio reumato, ekstraartikulinio reumato, kolageno ligų, lėtinio poliartrito, artropatinės psoriazės, ankilozinio spondilito, jaunatvinio reumatinio artrito, žastikaulio ir menties periartrito, mazginio panarterito, sisteminės raudonosios vilkligės, progresuojančios sisteminės sklerodermijos, uratinio artrito, dermatomiozito, raumenų reumato, miozito ir miogeliozės.

20. Panaudojimas pagal 1, 2, 13, 14, 15 arba 16 punktą įvesti subjektui nuo maždaug 0,5 iki 100 mg/kg subjekto masės tirpios CTLA4 kiekį.

21. Panaudojimas pagal 1, 2, 13, 14, 15 arba 16 punktą įvesti subjektui 0,5 mg/kg subjekto masės tirpios CTLA4 kiekį.

22. Panaudojimas pagal 1, 2, 13, 14, 15 arba 16 punktą įvesti subjektui 2 mg/kg subjekto masės tirpios CTLA4 kiekį.

23. Panaudojimas pagal 1, 2, 13, 14, 15 arba 16 punktą įvesti subjektui 10 mg/kg subjekto masės tirpios CTLA4 kiekį.

24. Panaudojimas pagal 1, 2, 13, 14, 15 arba 16 punktą įvesti subjektui nuo maždaug 0,5 iki 10 mg/kg subjekto masės tirpios CTLA4 kiekį.

25. Panaudojimas pagal 1, 2, 13, 14, 15 arba 16 punktą įvesti subjektui nuo maždaug 0,1 iki 20 mg/kg subjekto masės tirpios CTLA4 kiekį.

26. Tirpios CTLA4 mutantinės molekulės, turinčios fig.19 parodytą seką (SEQ ID NO:9), prasidedančios +1 padėtyje esančiu metioninu arba -1 padėtyje esančiu alaninu ir besibaigiančią asparto rūgštimi +124 padėtyje, panaudojimas farmacinės kompozicijos, skirtos gydyti ligai, pasirinktai iš autoimuninių ligų, psoriazės, su implantų atmetimu susijusių imuninių sutrikimų, T ląstelių limfomos, T ląstelių ūmiosios limfoblastinės leukemijos, sėklidinės angiocentrinės T ląstelių limfomos, gerybinio limfocitinio angiito, raudonosios vilkligės, Hashimoto tiroidito, pirminės miksedemos, Graves'o ligos, piktybinės mažakraujystės, autoimuninio atrofinio gastrito, Adisono ligos, nuo insulino priklausančio cukrinio diabeto, geros ganyklos sindromo, sunkiosios miastenijos, pūslinės, ileito, simpatinės oftalmijos, autoimuninio uveito, išsėtinės sklerozės, autoimuninės hemolitinės anemijos, idiopatinės trombocitopenijos, pirminės tulžies cirozės, chroninio hepatito, opinio kolito, Sjogren'o sindromo, reumatinės ligos, reumatinio artrito, polimiozito, sklerodermos, mišrios jungiamojo audinio ligos, uždegiminio reumato, degeneracinio reumato, ekstraartikulinio reumato, kolageno ligų, chroniško poliartrito, artropatinės psoriazės, ankilozinio spondilito, jaunatvinio reumatinio artrito, žastikaulio ir menties periartrito, mazginio panarterito, sisteminės raudonosios vilkligės, progresuojančios sisteminės sklerodermijos, uratinio artrito, dermatomiozito, raumenų reumato, miozito ir miogeliozės, gamyboje.

27. Tirpios CTLA4 mutantinės molekulės L104EA29Ylg, turinčios fig.19 parodytą seką (SEQ ID NO:9), prasidedančią +1 padėtyje esančiu metioninu arba -1 padėtyje esančiu alaninu ir besibaigiančią lizinu +357 padėtyje, panaudojimas farmacinės kompozicijos, skirtos gydyti ligai, pasirinktai iš autoimuninių ligų, psoriazės, su implantų atmetimu susijusių imuninių sutrikimų, T ląstelių limfomos, T ląstelių ūmiosios limfoblastinės leukemijos, sėklidinės angiocentrinės T ląstelių limfomos, gerybinio limfocitinio angiito, raudonosios vilkligės, Hashimoto tiroidito, pirminės miksedemos, Graves'o ligos, piktybinės mažakraujystės, autoimuninio atrofinio gastrito, Adisono ligos, nuo insulino priklausančio cukrinio diabeto, geros ganyklos sindromo, sunkiosios miastenijos, pūslinės, ileito, simpatinės oftalmijos, autoimuninio uveito, išsėtinės sklerozės, autoimuninės hemolitinės anemijos, idiopatinės

trombocitopenijos, pirminės tulžies cirozės, chroninio hepatito, opinio kolito, Sjogren'o sindromo, reumatinės ligos, reumatinio artrito, polimiozito, sklerodermos, mišrios jungiamojo audinio ligos, uždegiminio reumato, degeneracinio reumato, ekstraartikulinio reumato, kolageno ligų, chroniško poliartrito, artropatinės psoriazės, ankilozinio spondilito, jaunatvinio reumatinio artrito, žastikaulio ir menties periartrito, mazginio panarterito, sisteminės raudonosios vilkligės, progresuojančios sisteminės sklerodermijos, uratinio artrito, dermatomiozito, raumenų reumato, miozito ir miogeliozės, gamyboje.

28. Panaudojimas pagal 26 arba 27 punktą reumatinei ligai gydyti.

29. Panaudojimas pagal 26 arba 27 punktą įvesti subjektui nuo maždaug 0,5 iki 100 mg/kg subjekto masės, 0,5 mg/kg subjekto masės, 2 mg/kg subjekto masės, 10 mg/kg subjekto masės, nuo maždaug 0,5 iki 10 mg/kg subjekto masės arba nuo maždaug 0,1 iki 20 mg/kg subjekto masės tirpios CTLA4 mutantinės molekulės kiekį.

30. Panaudojimas pagal 11 arba 13 punktą, besiskiriantis tuo, kad CTLA4Ig koduoja nukleorūgšties molekulė, pažymėta ATCC Nr.68629.

31. Panaudojimas pagal 16 arba 27 punktą, besiskiriantis tuo, kad L104EA29YIg koduoja DNR seka, pažymėta ATCC PTA-2104.

32. Farmacinė kompozicija, susidedanti iš farmaciškai priimtino nešiklio ir efektyvaus kiekio pirmojo agento ir antrojo agento, kur

- a) pirmasis agentas yra tirpi CTLA4 molekulė, turinti CTLA4 molekulės ekstraląstelinę dalį, kuri rišasi su B7 antigenu, ekspresuotu ant aktyvuotų B ląstelių, o
- b) antrasis agentas yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš kortikosteroidų, nesteroidinių priešuždegiminių vaistų, prednizono, azatioprino, metotreksato, $TFN\alpha$ blokatorių arba antagonistų, infliksimabo, bet kokio biologinio agento nukreipto į uždegiminį citokiną,

hidroksichlorokvino, sulfasalazoprino, aukso druskų, etanercepto, anakinros, ciklofosfamido ir leflunomido.

33. Farmacinė kompozicija pagal 32 punktą, besiskirianti tuo, kad tirpi CTLA4 yra CTLA4 sulieta molekulė, turinti CTLA4 molekulės ekstraląstelinę dalį, kuri rišasi su B7 antigenu, ekspresuotu ant aktyvuotų B ląstelių, sujungtą su ne-CTLA4 molekule.

34. Farmacinė kompozicija pagal 32 punktą, besiskirianti tuo, kad tirpi CTLA4 turi aminorūgščių seką, kuri pakeičia CTLA4 molekulės tirpumą arba afiniškumą, kur tirpumą arba afiniškumą pakeičianti aminorūgščių seka apima imunoglobulino liekaną.

35. Farmacinė kompozicija pagal 34 punktą, besiskirianti tuo, kad imunoglobulino liekana yra imunoglobulino pastovioji sritis arba jos dalis, mutuota efektorinei funkcijai sumažinti.

36. Farmacinė kompozicija pagal 32 punktą, besiskirianti tuo, tuo, kad tirpi CTLA4 turi ekstraląstelinę CTLA4 dalį, prasidedančią +1 padėtyje esančiu metioninu arba -1 padėtyje esančiu alaninu ir besibaigiančią asparto rūgštimi +124 padėtyje, kaip parodyta fig.24 (SEQ ID NO:19).

37. Farmacinė kompozicija pagal 32 punktą, besiskirianti tuo, tuo, kad tirpi CTLA4 molekulė yra CTLA4Ig, kaip parodyta fig.24 (SEQ ID NO:19), prasidedanti +1 padėtyje esančiu metioninu arba -1 padėtyje esančiu alaninu ir besibaigianti lizinu +357 padėtyje.

38. Farmacinė kompozicija pagal 32 punktą, besiskirianti tuo, tuo, kad tirpi CTLA4 yra tirpi CTLA4 mutantinė molekulė, kaip parodyta fig.19 (SEQ ID NO:9), prasidedanti +1 padėtyje esančiu metioninu arba -1 padėtyje esančiu alaninu ir besibaigianti asparto rūgštimi +124 padėtyje.

39. Farmacinė kompozicija pagal 32 punktą, besiskirianti tuo, tuo, kad tirpi CTLA4 yra tirpi CTLA4 mutantinė molekulė L104EA29YIg, kaip parodyta

fig.19 (SEQ ID NO:9), prasidedanti +1 padėtyje esančiu metioninu arba -1 padėtyje esančiu alaninu ir besibaigianti lizinu +357 padėtyje.

Demografinės charakteristikos

	Placebo N=32	CTLA .5 N=26	CTLA 2 N=32	CTLA 10 N=32	LEA .5 N=32	LEA 2 N=29	LEA 10 N=31	Bendras N=214
Lytis								
Vyrai	6 (19%)	4 (15%)	9 (28%)	10 (31%)	9 (28%)	9 (31%)	7 (23%)	54 (25%)
Moterys	26 (81%)	22 (85%)	23 (72%)	22 (69%)	23 (72%)	20 (69%)	24 (77%)	160 (75%)
Rasė								
Baltieji	30 (94%)	23 (88%)	30 (94%)	30 (94%)	29 (91%)	25 (86%)	27 (87%)	194 (91%)
Juodieji	2 (6%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (3%)	1 (3%)	3 (10%)	2 (6%)	9 (4%)
Kiti	0 (0%)	3 (12%)	2 (6%)	1 (3%)	2 (6%)	1 (3%)	2 (6%)	11 (5%)
Ligos trukmė								
< 2 metai	12 (38%)	5 (19%)	8 (25%)	12 (38%)	10 (31%)	10 (34%)	11 (35%)	68 (32%)
2-5 metai	14 (44%)	11 (42%)	18 (56%)	13 (41%)	14 (44%)	14 (48%)	12 (39%)	96 (45%)
5-7 metai	6 (19%)	8 (31%)	6 (19%)	6 (19%)	6 (19%)	5 (17%)	7 (23%)	44 (21%)
> 7 metai	0 (0%)	2 (8%)	0 (0%)	1 (3%)	2 (6%)	0 (0%)	1 (3%)	6 (3%)
Ligos trukmė (metai)								
N	32	26	32	32	32	29	31	214
Vidurkis	3.2	4.2	3.3	3.4	3.7	3.1	3	3.4
Sd	2	2	1.7	2.1	2	1.8	2.2	2
Min	0.3	0.2	0.4	0	0.7	0.4	0	0
Max	7	7.5	6.8	7.3	7.6	7	7.1	7.6

FIG. 1A

Demografinės charakteristikos

	Placebo N=32	CTLA.5 N=26	CTLA.2 N=32	CTLA.10 N=32	LEA.5 N=32	LEA.2 N=29	LEA.10 N=31	Bendras N=214
Lytis								
Vyrai	6 (19%)	4 (15%)	9 (28%)	10 (31%)	9 (28%)	9 (31%)	7 (23%)	54 (25%)
Moterys	26 (81%)	22 (85%)	23 (72%)	22 (69%)	23 (72%)	20 (69%)	24 (77%)	160 (75%)
Amžius								
N	32	26	32	32	32	29	31	214
Vidurkis	48.3	46.9	46.2	51.5	49.3	50.8	45.6	48.4
Sd	11.7	12.2	13.4	11.5	8.8	10.7	10.1	11.3
Min	22	25	21	24	27	24	28	21
Max	66	64	64	66	66	65	64	66
Masė (kg)								
N	32	26	32	32	32	29	31	214
Vidurkis	72.9	70.6	72.7	70	69.8	68.9	71.7	71
Sd	13.5	17.4	14.4	16.7	12.8	12.1	15.8	14.6
Min	46.7	45	50	40.1	48	47	39.2	39.2
Max	98.2	101.3	99	101.3	95	93.8	99	101.3
Ligos aktyvumas (pagal pacientą)								
N	32	26	32	32	32	29	31	215
Vidurkis	3.6	3.6	3.7	3.6	3.5	3.6	3.5	3.6
Sd	0.9	0.9	0.9	0.9	0.8	0.8	0.7	0.8
Min	2	2	2	2	2	2	2	2
Max	5	5	5	5	5	5	5	5

FIG. 1B

Demografinės ir ligos charakteristikos

Vidurkis

Ligos aktyvumas (pagal gydytoją)	N	Placebo	CTLA .5	CTLA 2	CTLA 10	LEA .5	LEA 2	LEA 10	Iš viso N=214
		N=32	N=26	N=32	N=32	N=32	N=29	N=31	
ESR	N	32	26	32	32	32	29	31	214
	Vidurkis	3.6	3.5	3.5	3.7	3.4	3.4	3.5	3.5
	Sd	0.7	0.6	0.8	1	0.6	0.8	0.6	0.7
	Min	2	3	2	2	2	2	3	2
Fizinė funkcija (balai)	Max	5	5	5	5	5	5	5	5
	N	32	26	32	32	32	29	30	213
	Vidurkis	43.3	35.2	41.6	36.3	29.8	40.9	39.3	38.1
	Sd	29.4	22.5	27.4	27.9	24.2	30.2	24.6	26.8
CRP	Min	2	4	4	3	0	6	2	0
	Max	116	90	94	98	91	110	102	116
	N	32	26	31	32	32	29	31	213
	Vidurkis	16.8	15.5	16.2	17.1	15.3	16.3	16.1	16.2
Fizinė funkcija (balai)	Sd	5.4	4.2	5.5	5.7	3.7	4.8	3.8	4.8
	Min	8	8	8	8	8	8	9	8
	Max	32	23	26	28	24	26	26	32
CRP	N	30	23	31	31	31	28	31	205
	Vidurkis	56.7	26.4	48	33.6	28.1	48.1	37.5	40.1
	Sd	62.7	30.3	47.3	46	39.1	64.5	35.2	48.6
	Min	2	5	3	3	3	3	3	2
Fizinė funkcija (balai)	Max	248	115	198	182	200	333	135	333

FIG. 1C

Demografinės ir ligos charakteristikos

	Placebo N=32	CTLA.5 N=26	CTLA.2 N=32	CTLA.10 N=32	LEA.5 N=32	LEA.2 N=29	LEA.10 N=31	Iš viso N=214
Jautrus sąnariai (balai)								
N	32	26	32	32	32	29	31	214
Vidurkis	32.1	32.5	32.1	29.4	25.6	30.7	30.6	30.4
Sd	14.8	14.8	15	14.6	12	13.3	12.9	13.9
Min	12	14	11	12	12	12	12	11
Max	63	64	68	68	61	63	59	68
Patinę sąnariai (balai)								
N	32	26	32	32	32	29	31	214
Vidurkis	23.9	18.6	26.9	22.7	18.3	22.6	19.9	21.9
Sd	10	6.3	11.4	12.7	7.6	8.5	8.9	10
Min	10	10	10	10	10	10	10	10
Max	51	33	53	58	36	40	44	58
Skausmas (balai)								
N	32	26	32	32	32	29	31	214
Vidurkis	3.5	3.4	3.5	3.5	3.5	3.3	3.5	3.5
Sd	0.9	0.6	0.6	1	0.7	0.8	0.7	0.8
Min	2	2	2	1	2	2	3	1
Max	5	5	5	5	5	5	5	5
Rytinis nejudrumas (min.)								
N	31	26	32	31	32	29	30	211
Vidurkis	156.6	211.5	145.2	149.5	160.9	160.3	147.5	160.5
Sd	121.5	370.6	102.1	148.7	151.1	152.3	258.3	198.1
Min	30	0	5	35	30	0	15	0
Max	600	1440	420	720	600	720	1440	1440

FIG. 1D

Demografinės charakteristikos prieš gydymą

		Placebo N=32	CTLA .5 N=26	CTLA 2 N=32	CTLA 10 N=32	LEA .5 N=32	LEA 2 N=29	LEA 10 N=31	Iš viso N=214
Etanerceptas	Taip	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	Ne	32 (100%)	26 (100%)	32 (100%)	32 (100%)	29 (100%)	31 (100%)	214 (100%)	
Metotreksatas	Taip	23 (72%)	22 (85%)	26 (81%)	24 (75%)	24 (75%)	21 (72%)	28 (90%)	168 (79%)
	Ne	9 (28%)	4 (15%)	6 (19%)	8 (25%)	8 (25%)	8 (28%)	3 (10%)	46 (21%)
Kiti DMARD	Taip	28 (86%)	23 (88%)	25 (78%)	26 (81%)	28 (86%)	24 (83%)	25 (81%)	179 (84%)
	Ne	4 (13%)	3 (12%)	7 (22%)	6 (19%)	4 (13%)	5 (17%)	6 (19%)	35 (16%)
C-Steroidai	Taip	31 (97%)	26 (100%)	29 (91%)	27 (84%)	27 (84%)	28 (97%)	24 (77%)	192 (90%)
	Ne	1 (3%)	0 (0%)	3 (9%)	5 (16%)	5 (16%)	1 (3%)	7 (23%)	22 (10%)
NSAID	Taip	27 (84%)	20 (77%)	30 (94%)	29 (91%)	26 (81%)	25 (86%)	25 (77%)	181 (85%)
	Ne	5 (16%)	6 (23%)	2 (6%)	3 (9%)	6 (19%)	4 (14%)	7 (23%)	33 (15%)
Kiti	Taip	30 (94%)	22 (85%)	29 (91%)	30 (94%)	31 (97%)	29 (100%)	29 (94%)	200 (93%)
	Ne	2 (6%)	4 (15%)	3 (9%)	2 (6%)	1 (3%)	0 (0%)	2 (6%)	14 (7%)

FIG. 1E

Gydymo nutraukimo prieš 85-tą dieną arba 85-tą dieną
priežasčių suvestinė

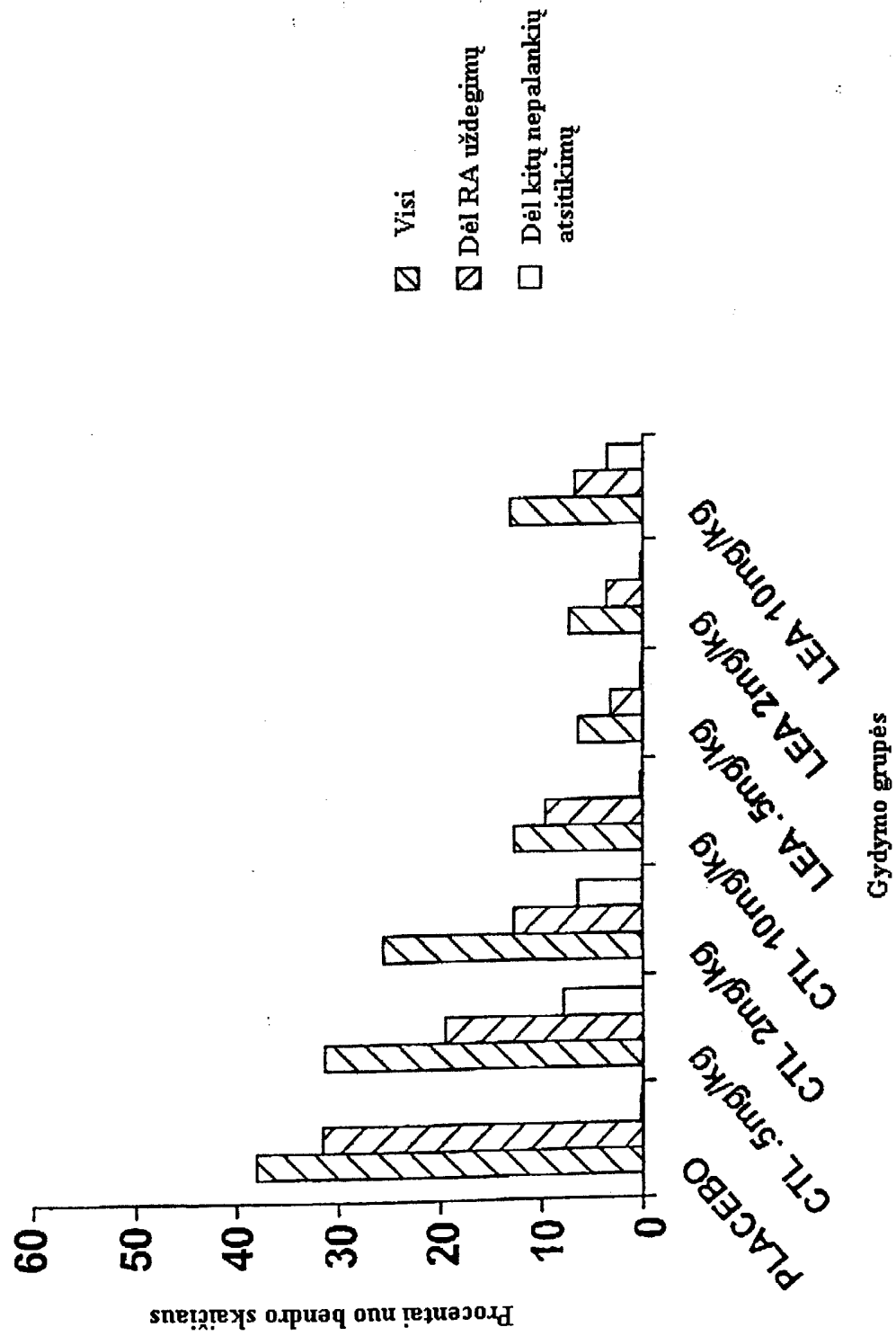


FIG. 2

ACR atsakas 85-tą dieną

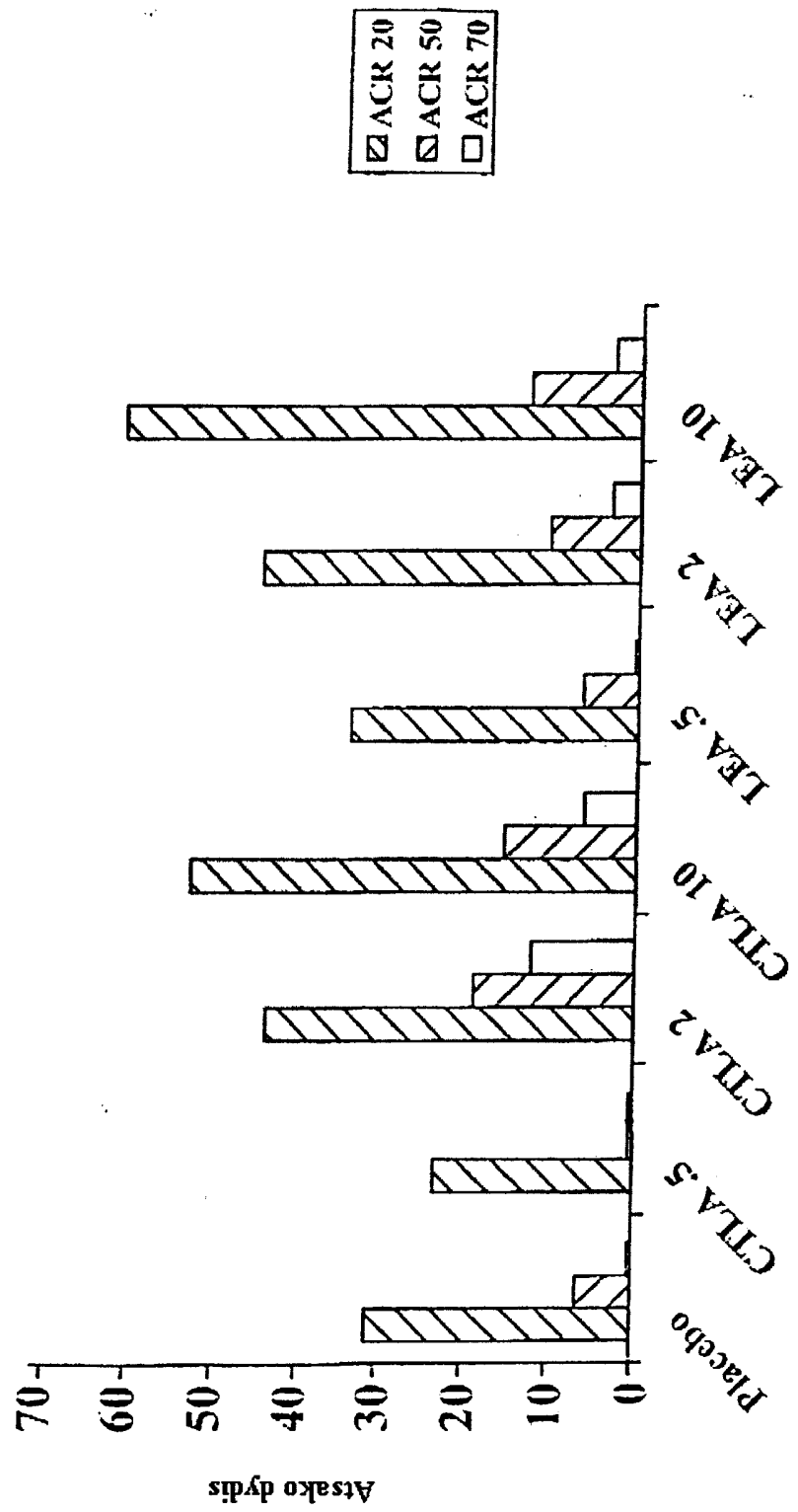


FIG. 3A

ACR20 atsakas 85-tą dieną su 95% patikimumo ribomis

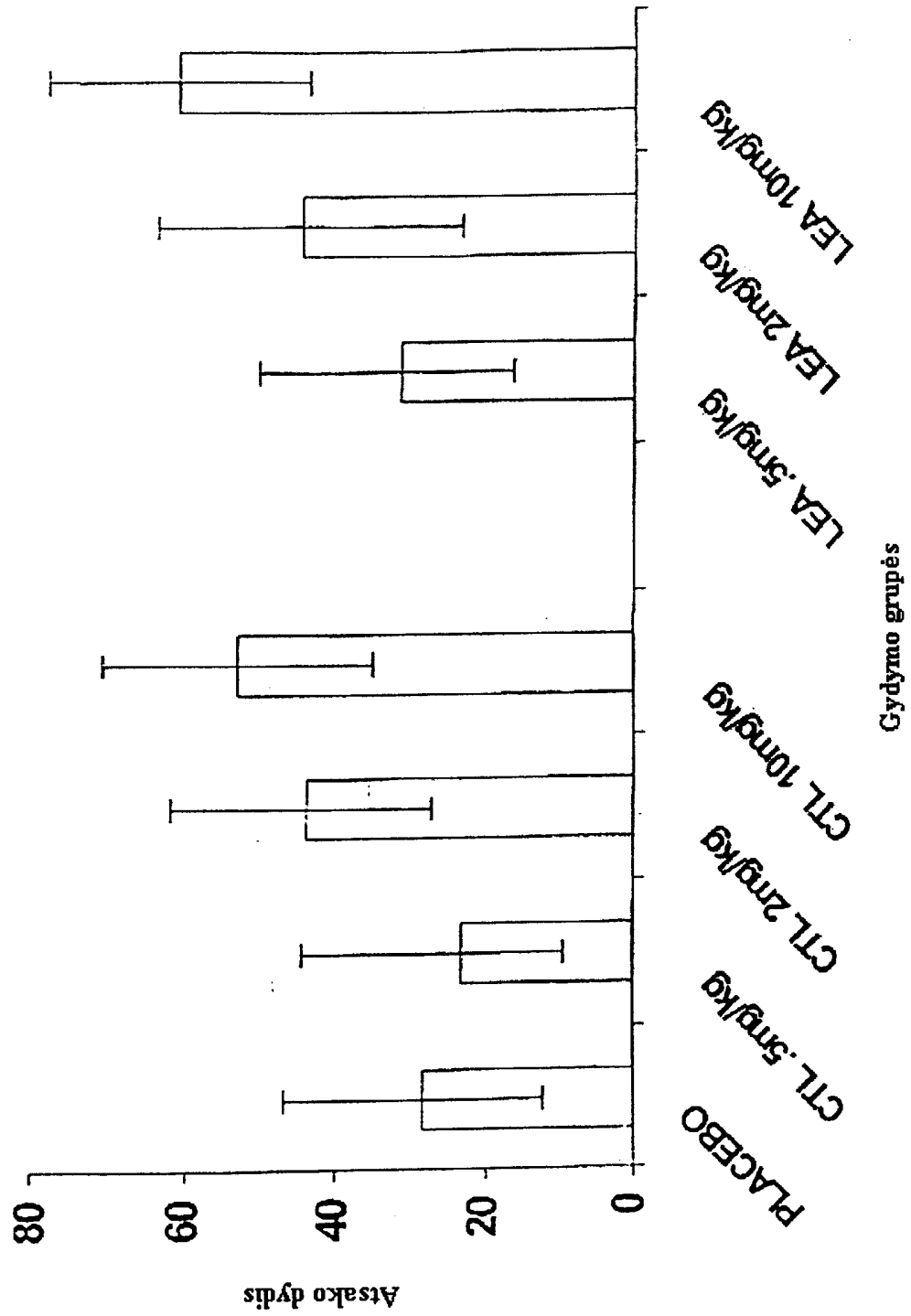


FIG. 3B

ACR20 atsako skirtumai nuo placebo 85-tą
dieną (95% patikimumo ribose))

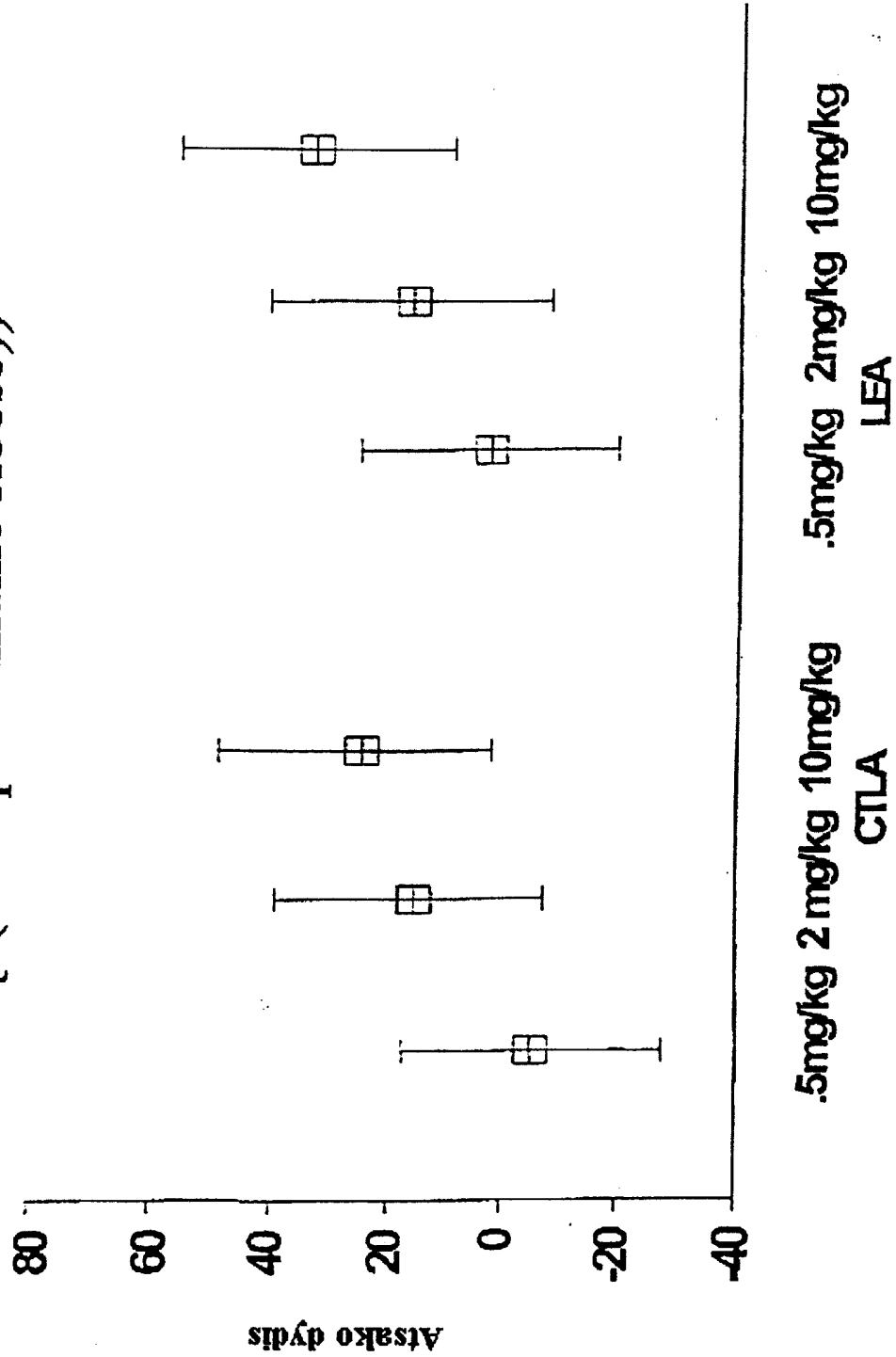


FIG. 3C

Bazinis (20%) kliniškinis atsakas į patinusių ir jautrių sąnarių
skaičių

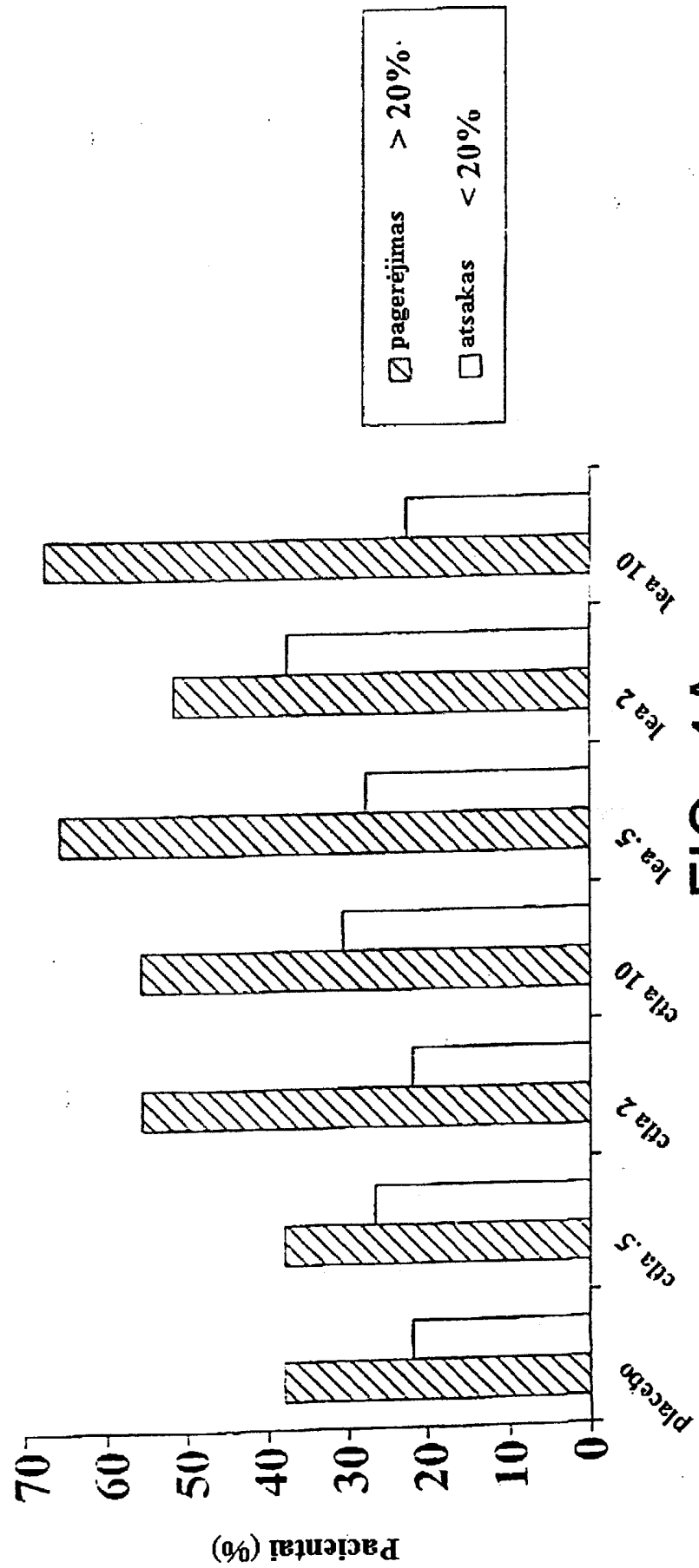


FIG. 4A

Klinikinis atsakas 85-tą dieną

Patinusių ir jautrių sąnarių skaičiaus pokyčio atsakas procentais

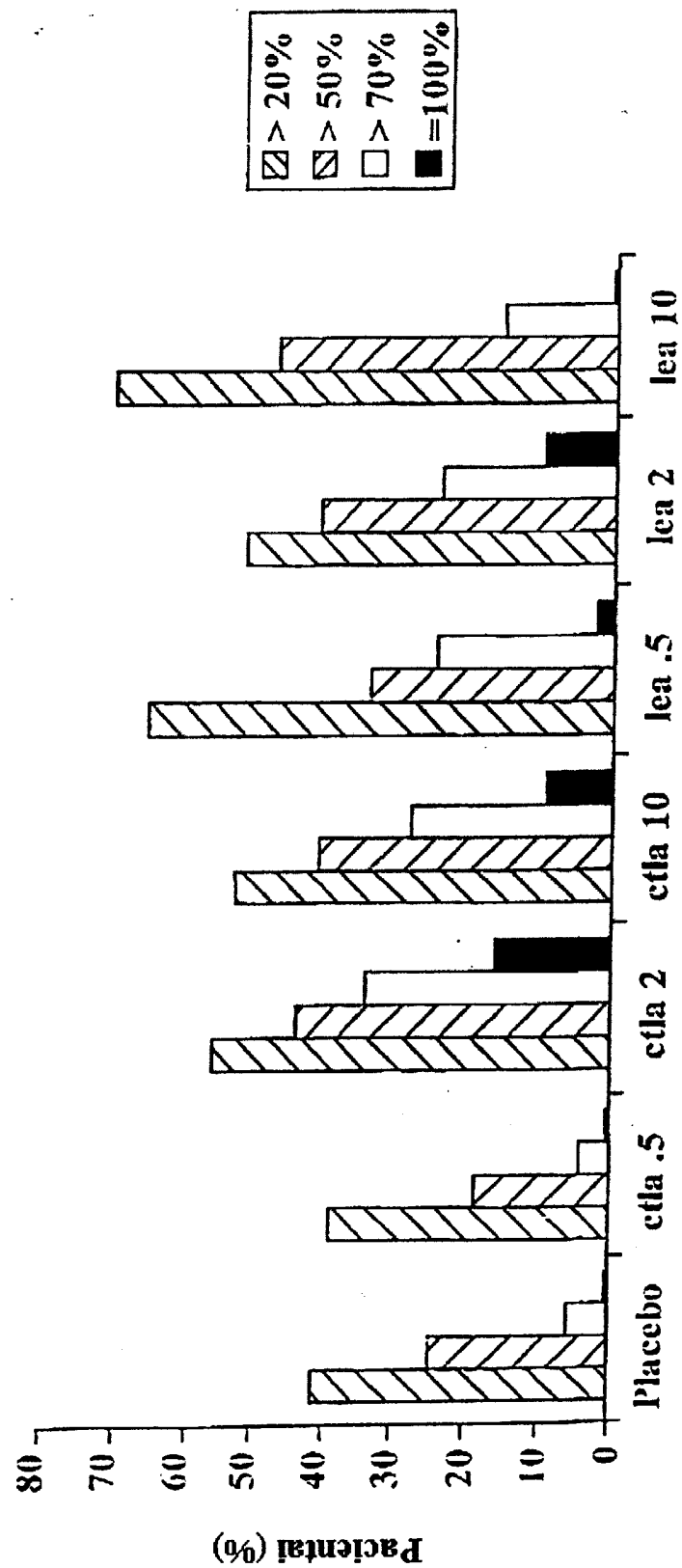


FIG. 4B

Skausmas (Likerto skalės vienetų pokyčiai)

Skausmo balų pokyčiai nuo bazinės linijos

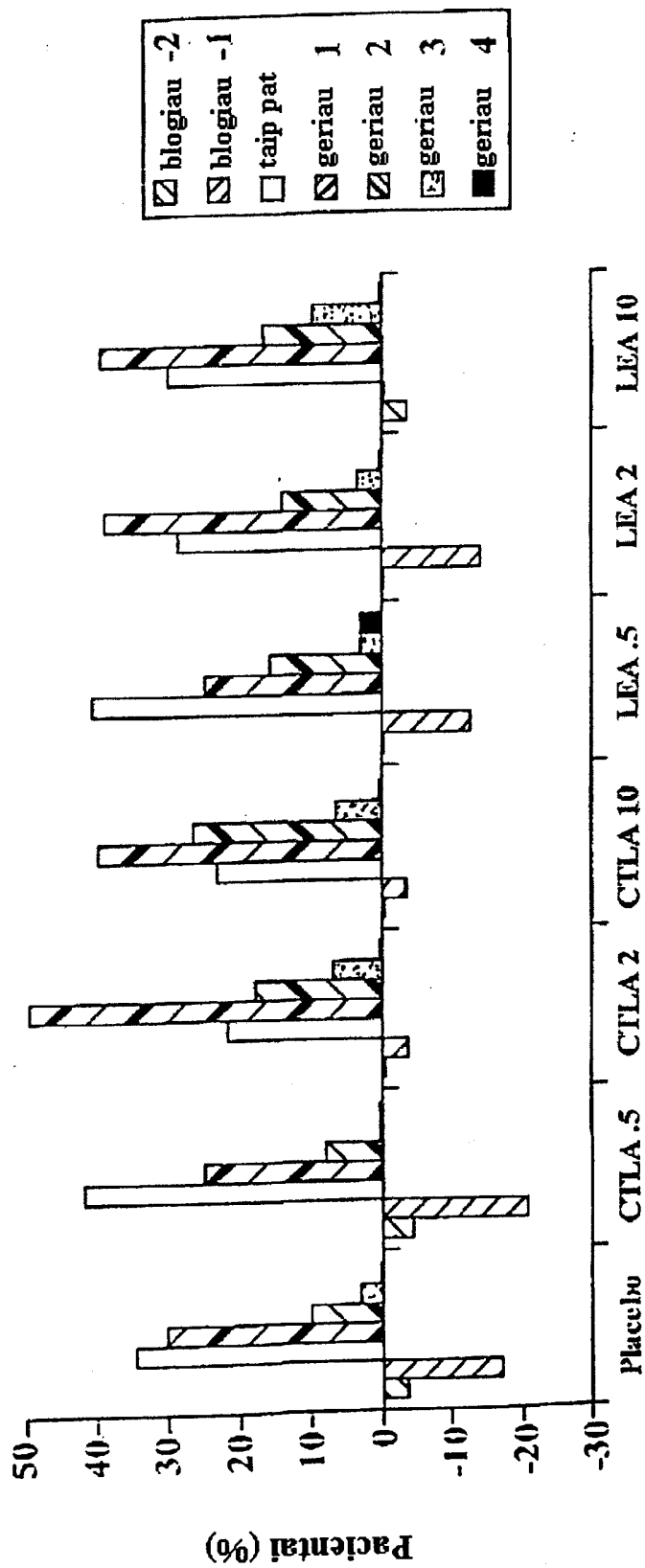


FIG. 5A

Bendri ligos pokyčiai pagal pacientą (Likerto skalės vienetų pokyčiai)

Skausmo balų pokyčiai nuo bazinės linijos

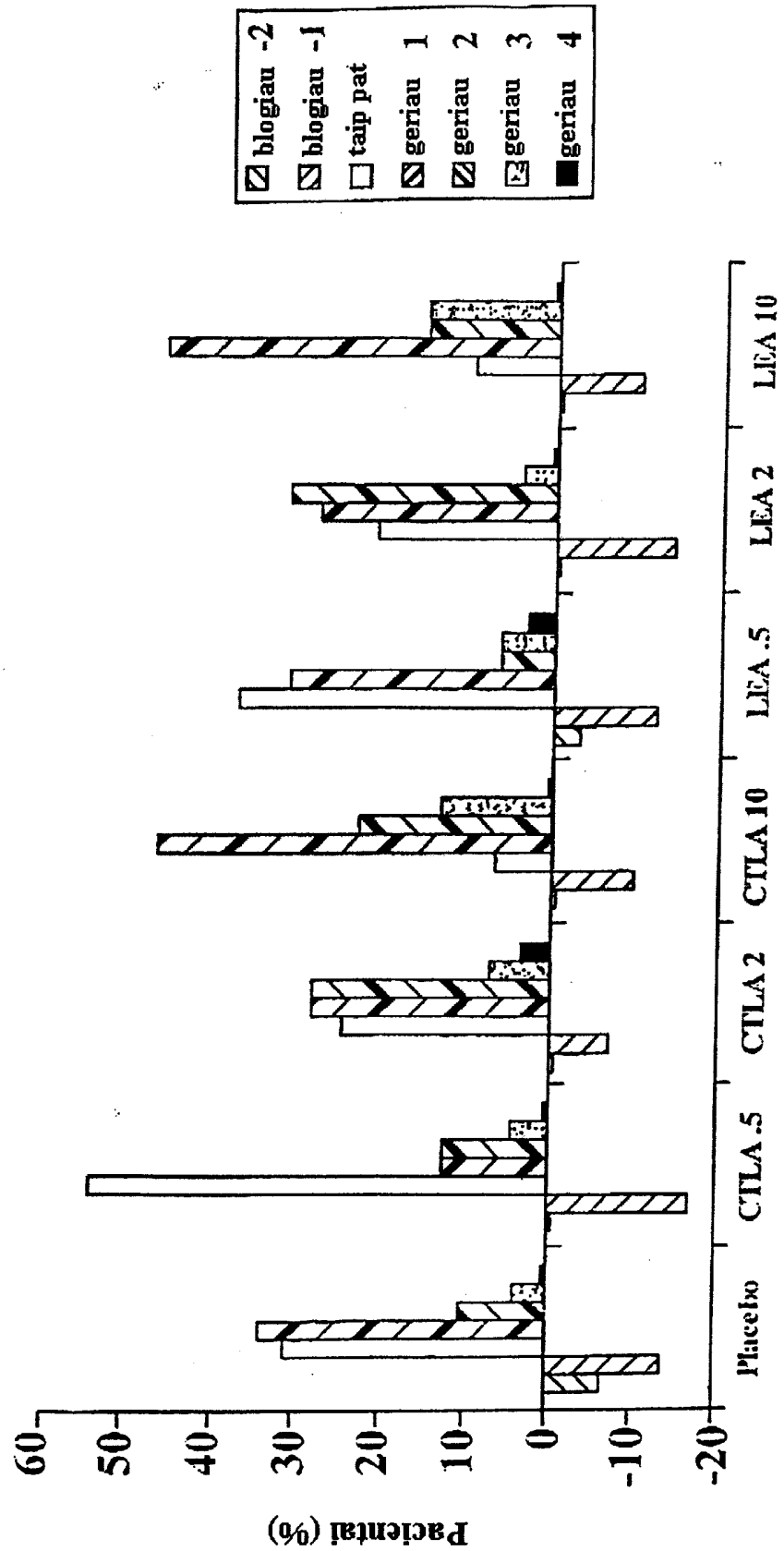


FIG. 5B

Bendri ligos pokyčiai pagal gydytoją (Likerto skalės vienetų pokyčiai)

balų pokyčiai nuo bazinės linijos

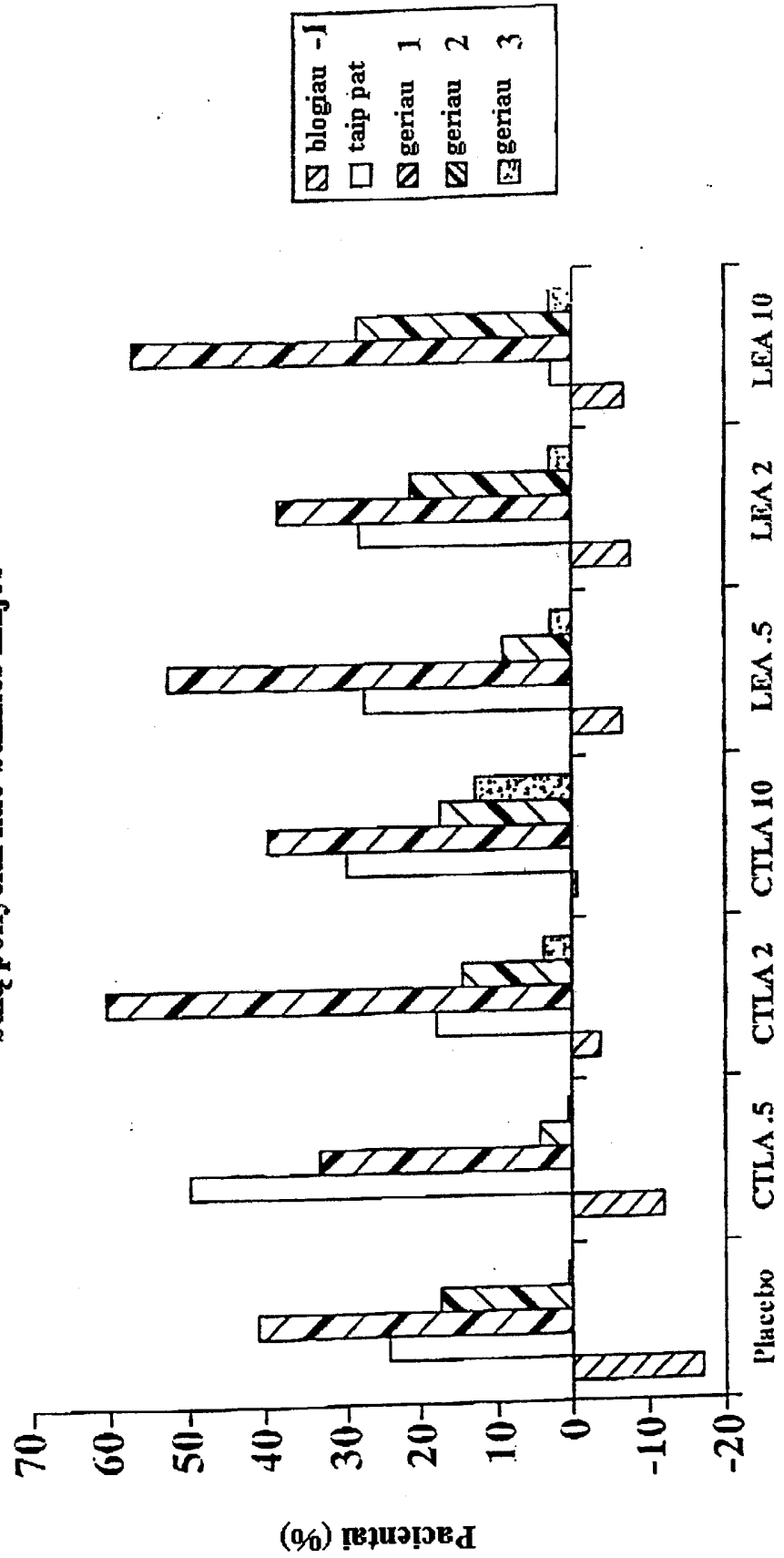


FIG. 5C

Skausmas Pokyčiai buo bazinės linijos

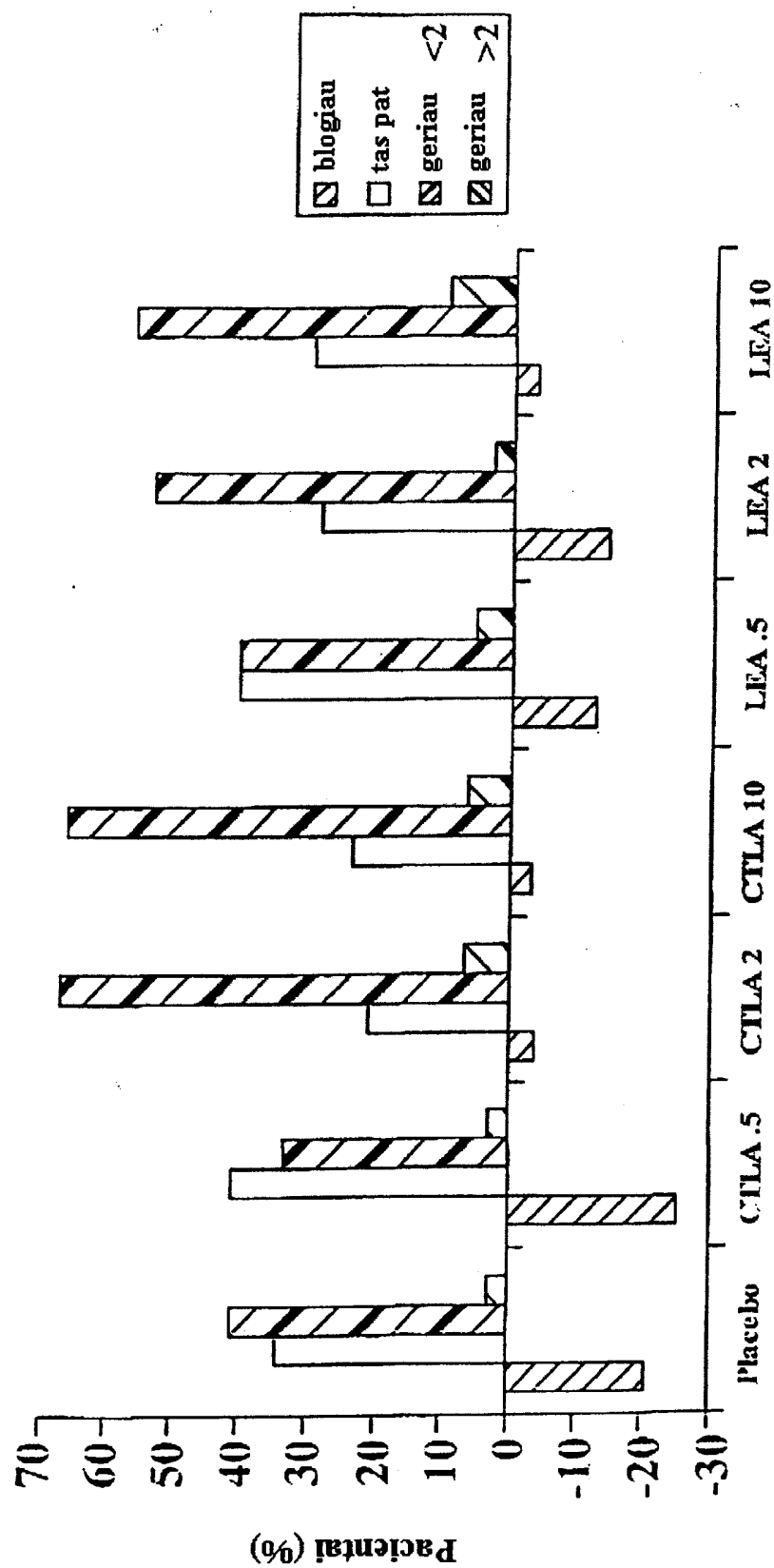


FIG. 5D

Bendras įvertinimas pagal pacientą
Ligos aktyvumo pokytis nuo bazinės linijos

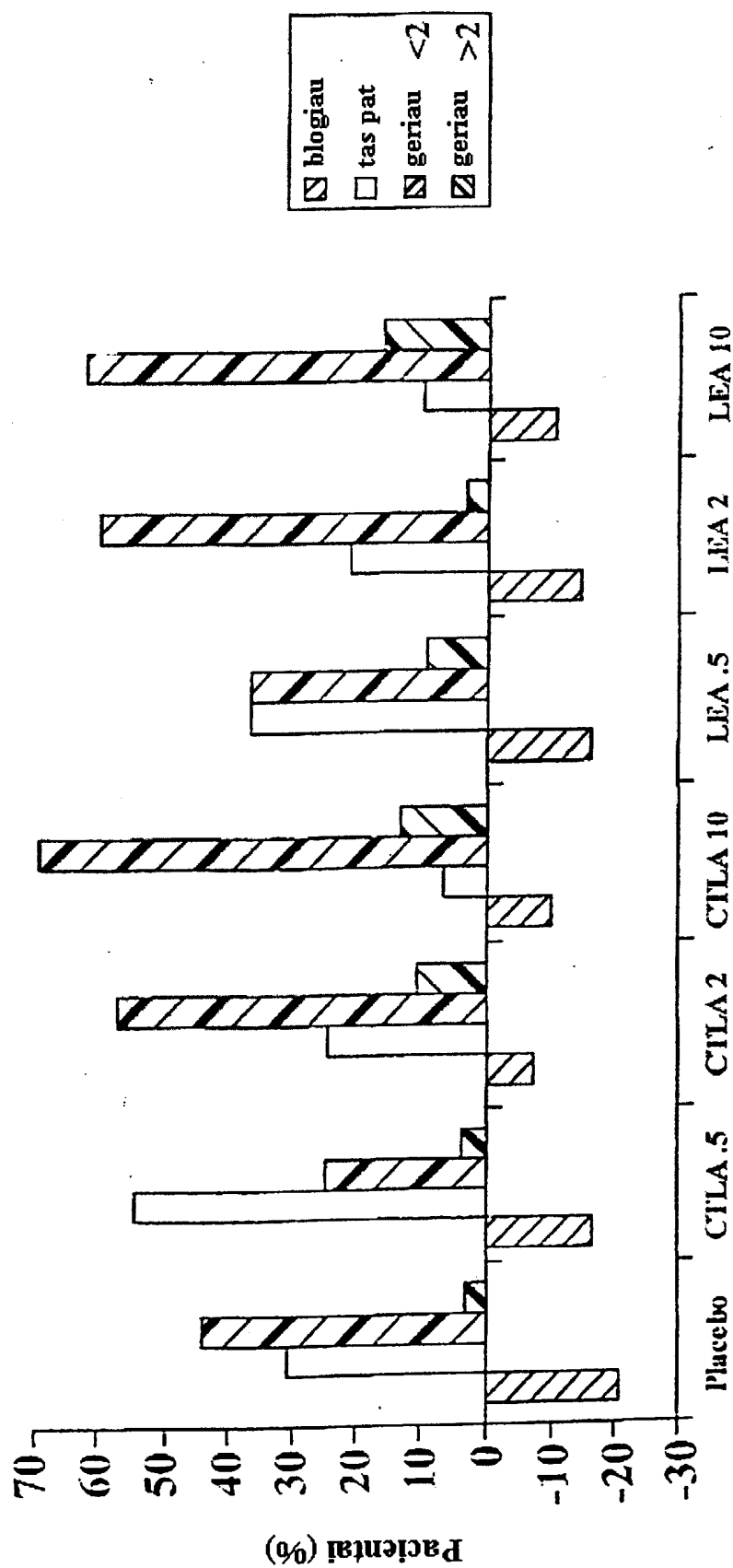


FIG 6A

Bendras įvertinimas pagal gydytoją Ligos aktyvumo pokytis nuo bazinės linijos

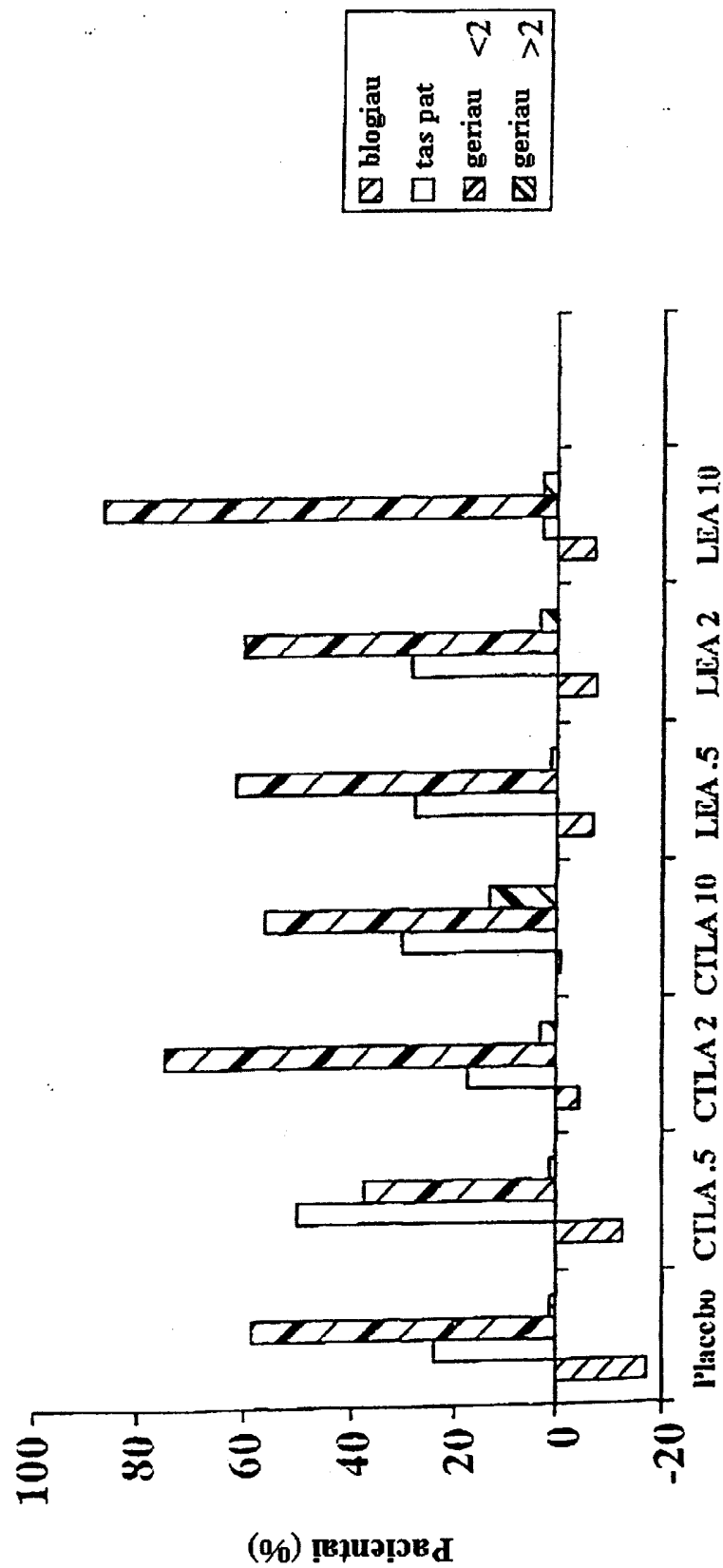


FIG. 6B

CRP kiekių 85-tą dieną procentinis
sumažėjimas lyginant su bazine linija

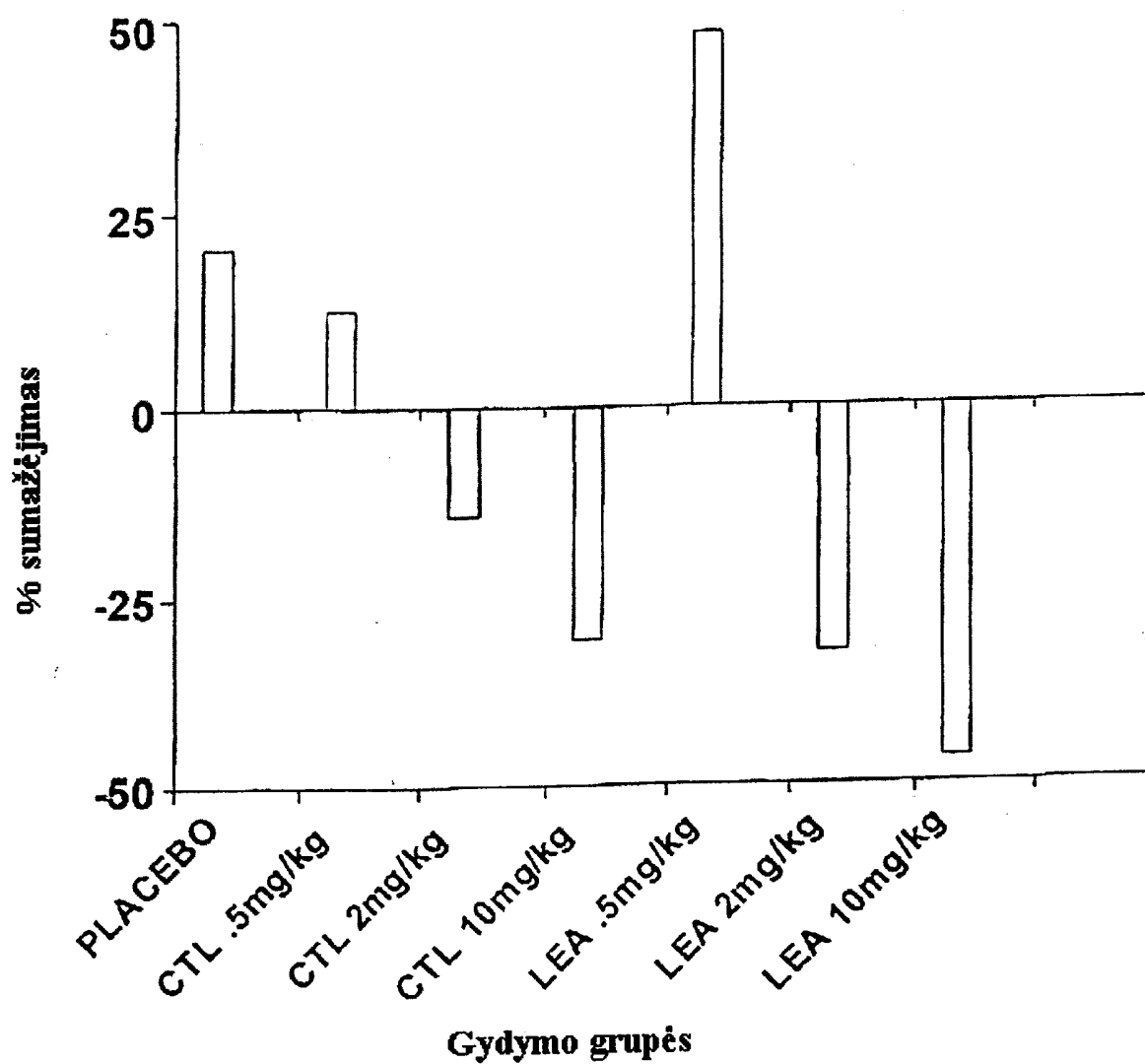


FIG. 7A

CRP sumažėjimo skirtumas 85-tą dieną lyginant su suminėmis placebo grupėmis (95% pat. ribose)

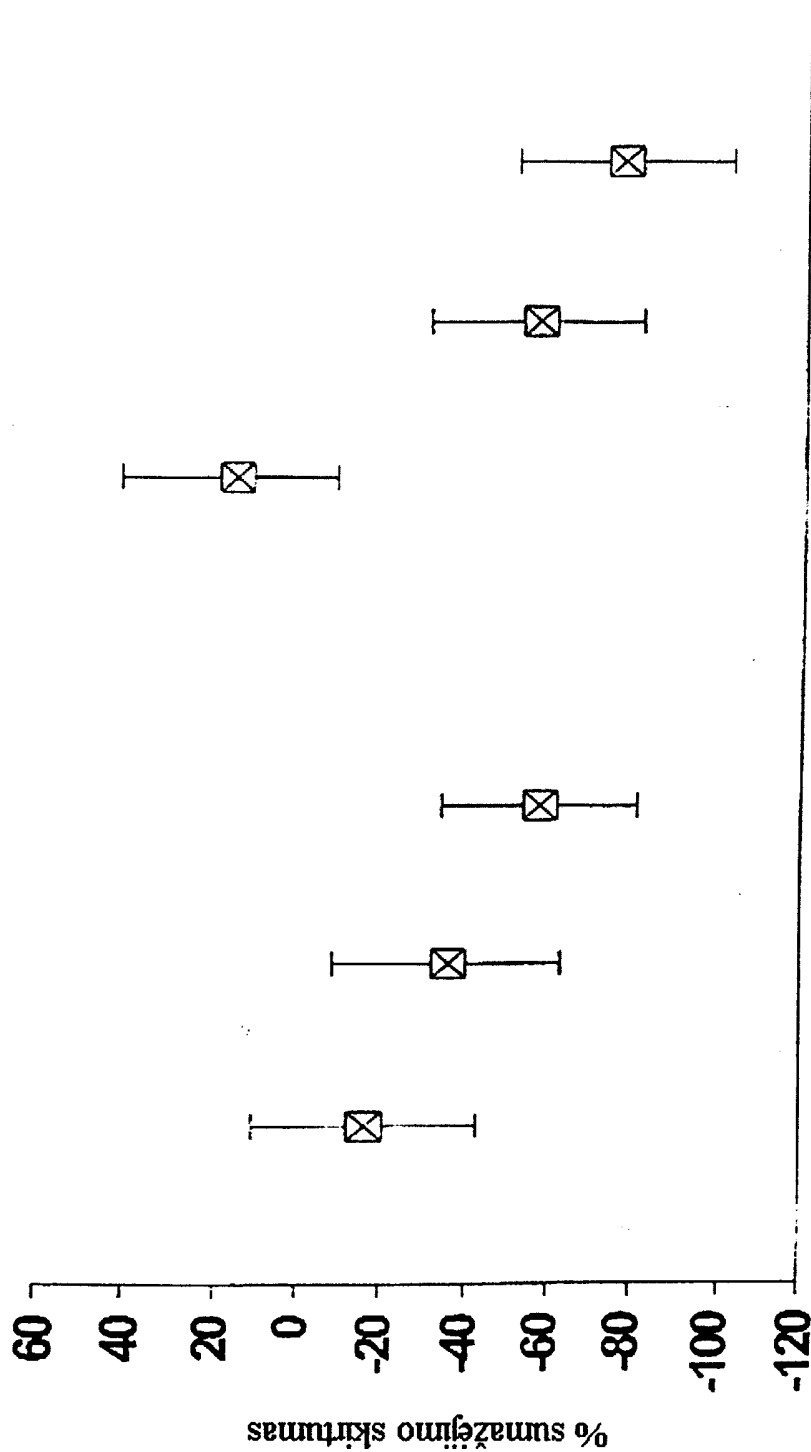


FIG. 7B

CRP

Vidutinis skirtumas nuo bazinės linijos

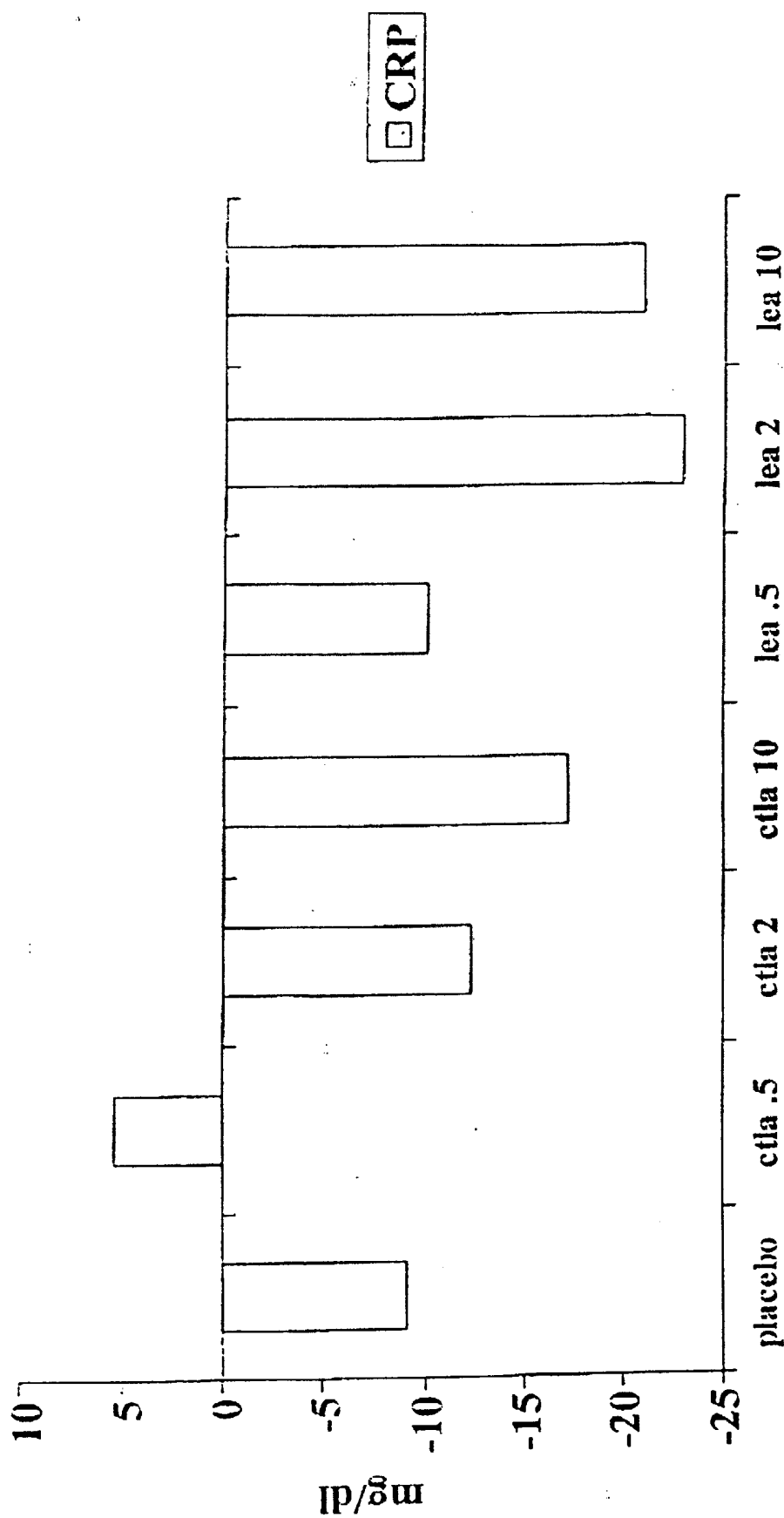


FIG. 7C

IL-2r vidutinis skirtumas nuo bazinės linijos

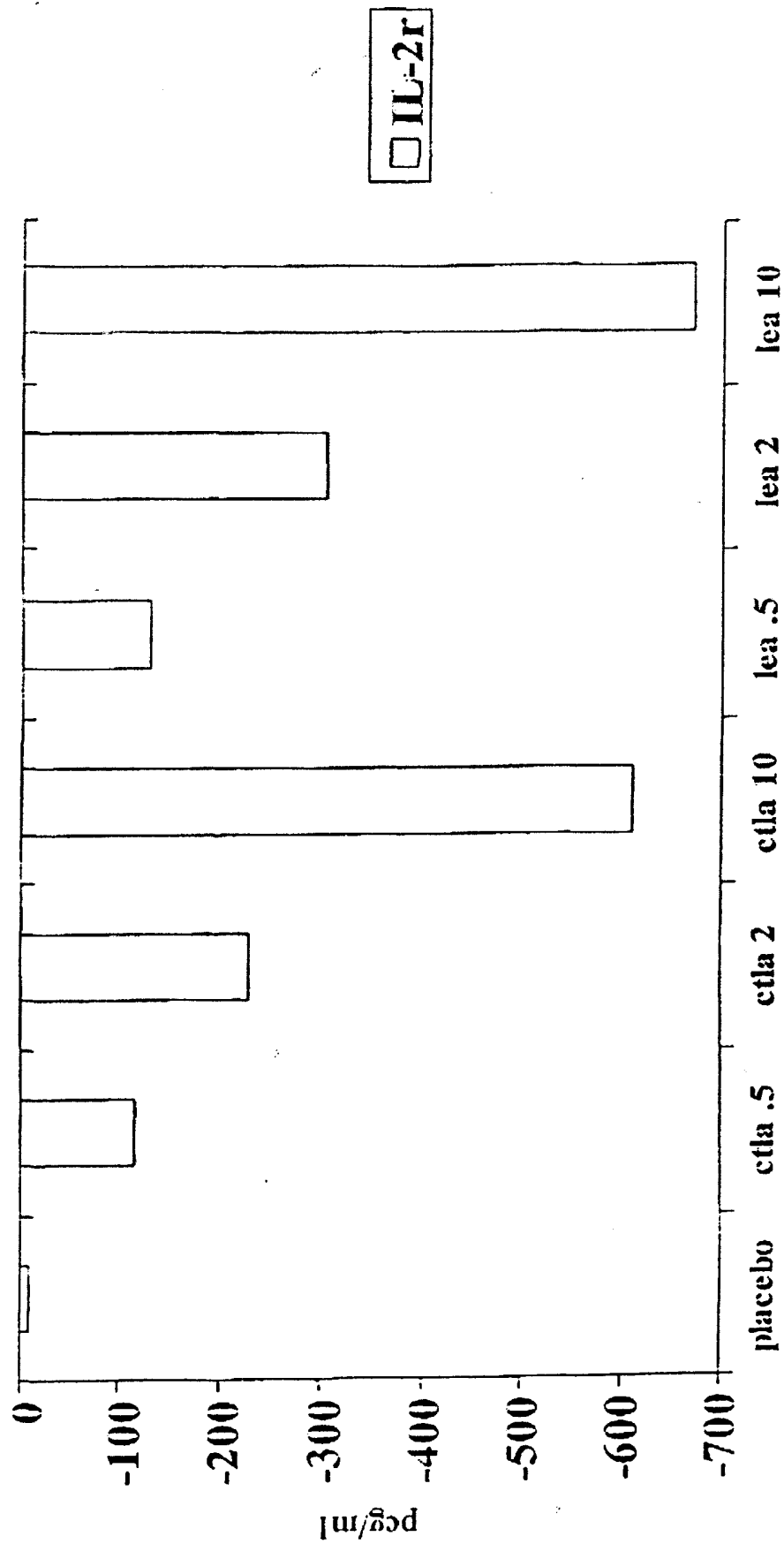


FIG. 8

CTLA jautrūs šanariai
- vidutinis skirtumas nuo bazinės linijos -

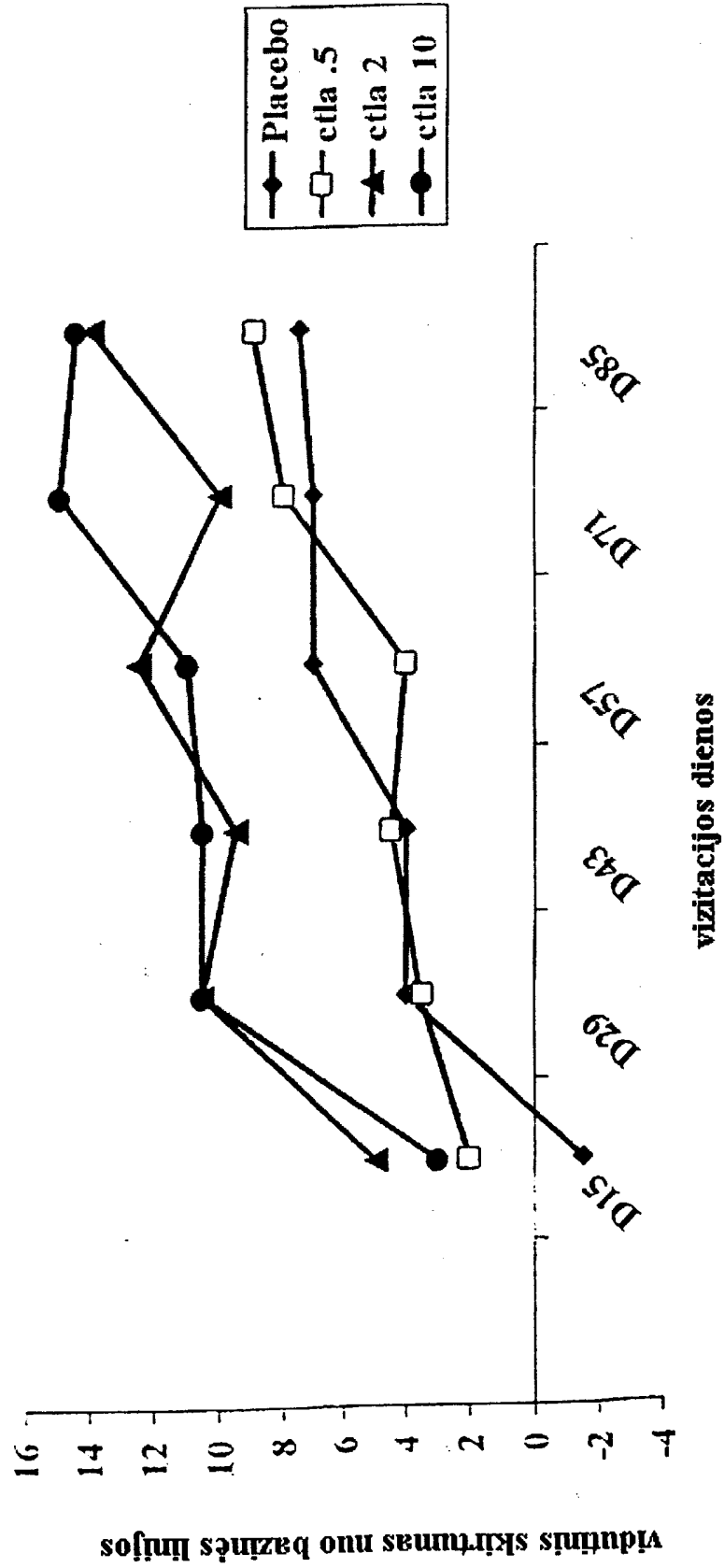
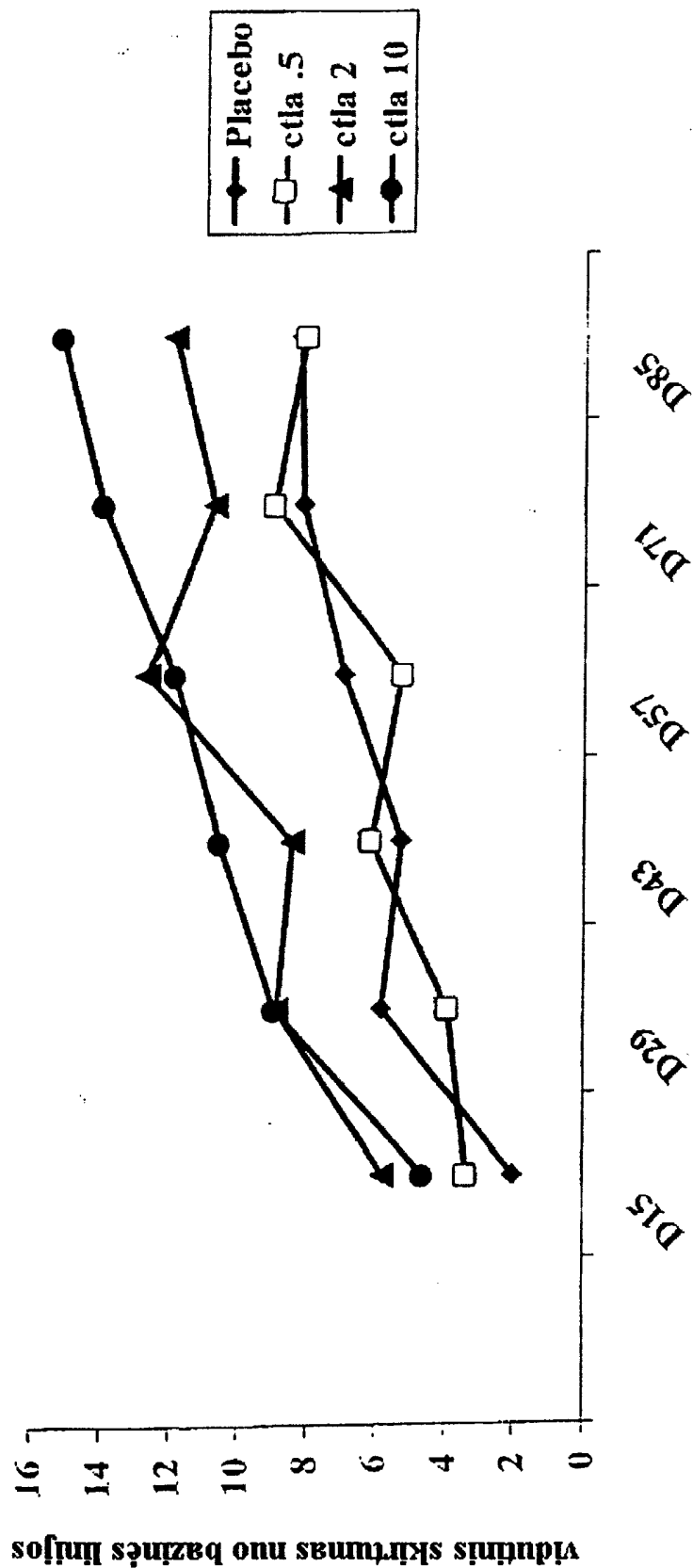


FIG. 9A

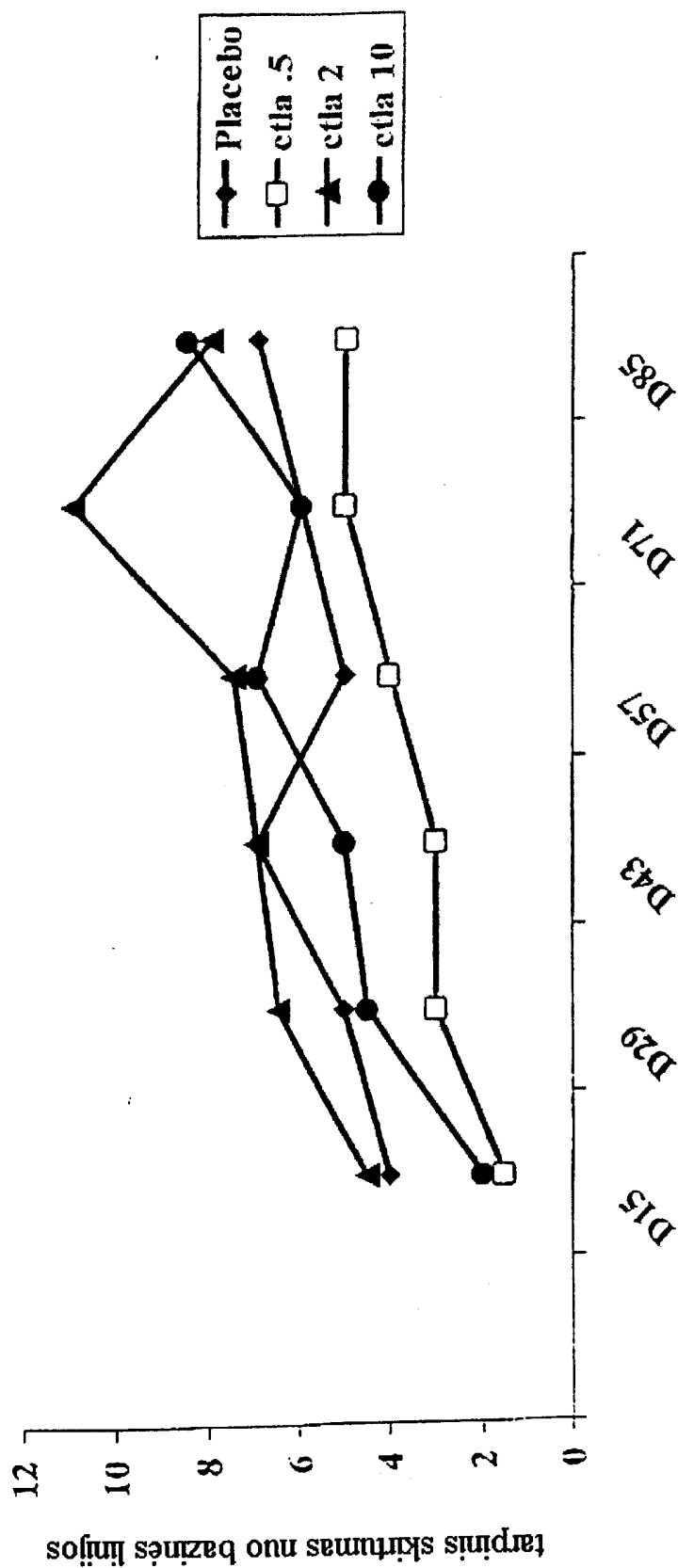
CTLA jautrūs šanariai
- vidutinis skirtumas nuo bazinės linijos -



vizitacijos dienos

FIG. 9B

CTLA patinę sąnariai
- tarpinis skirtumas nuo bazinės linijos -



vizitacijos dienos

FIG. 10A

CTLA patinę sąnariai
- tarpinis skirtumas nuo bazinės linijos -

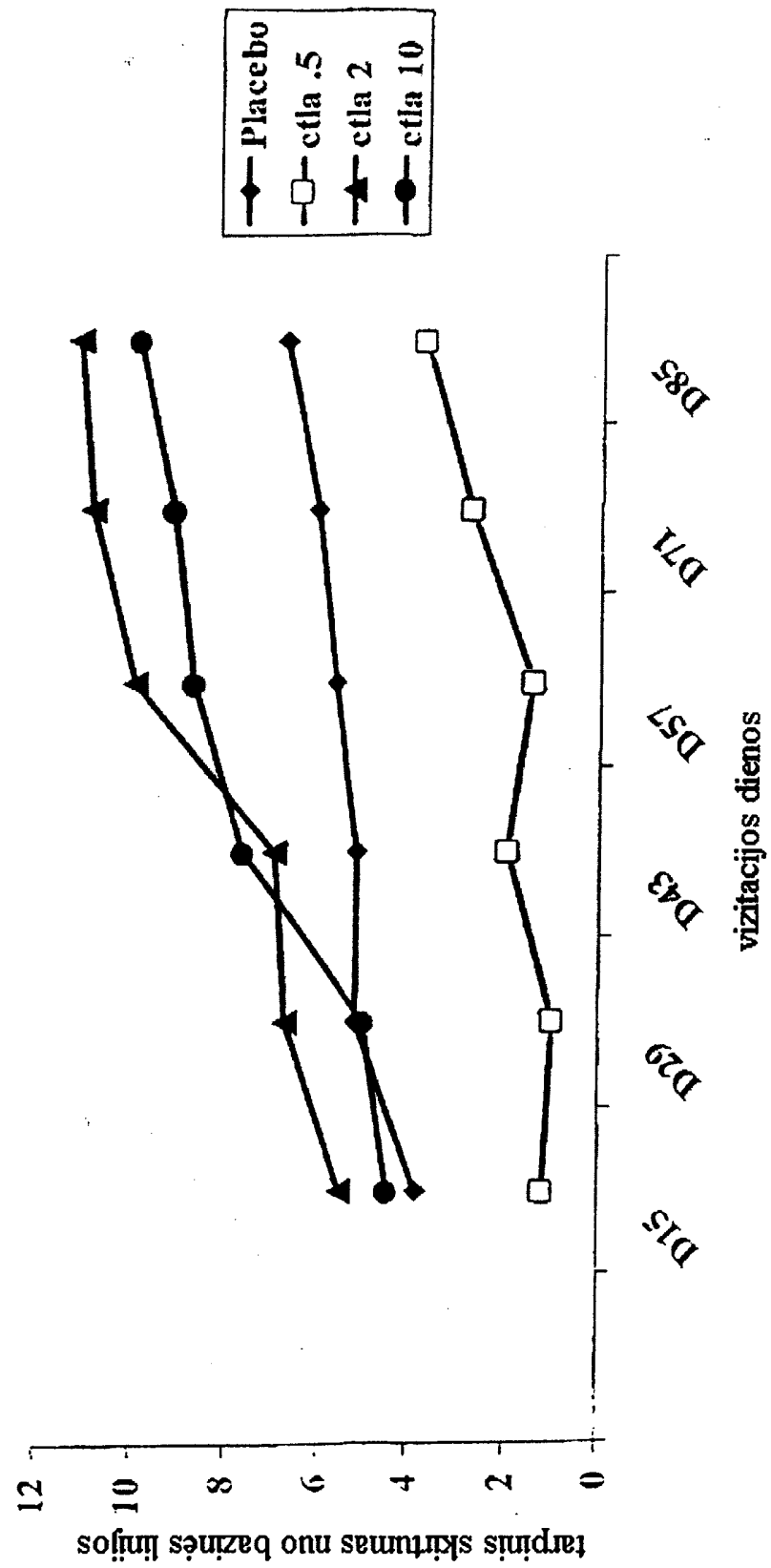


FIG. 10B

Patinę sąnariai
- vidutinis skirtumas nuo bazinės linijos -

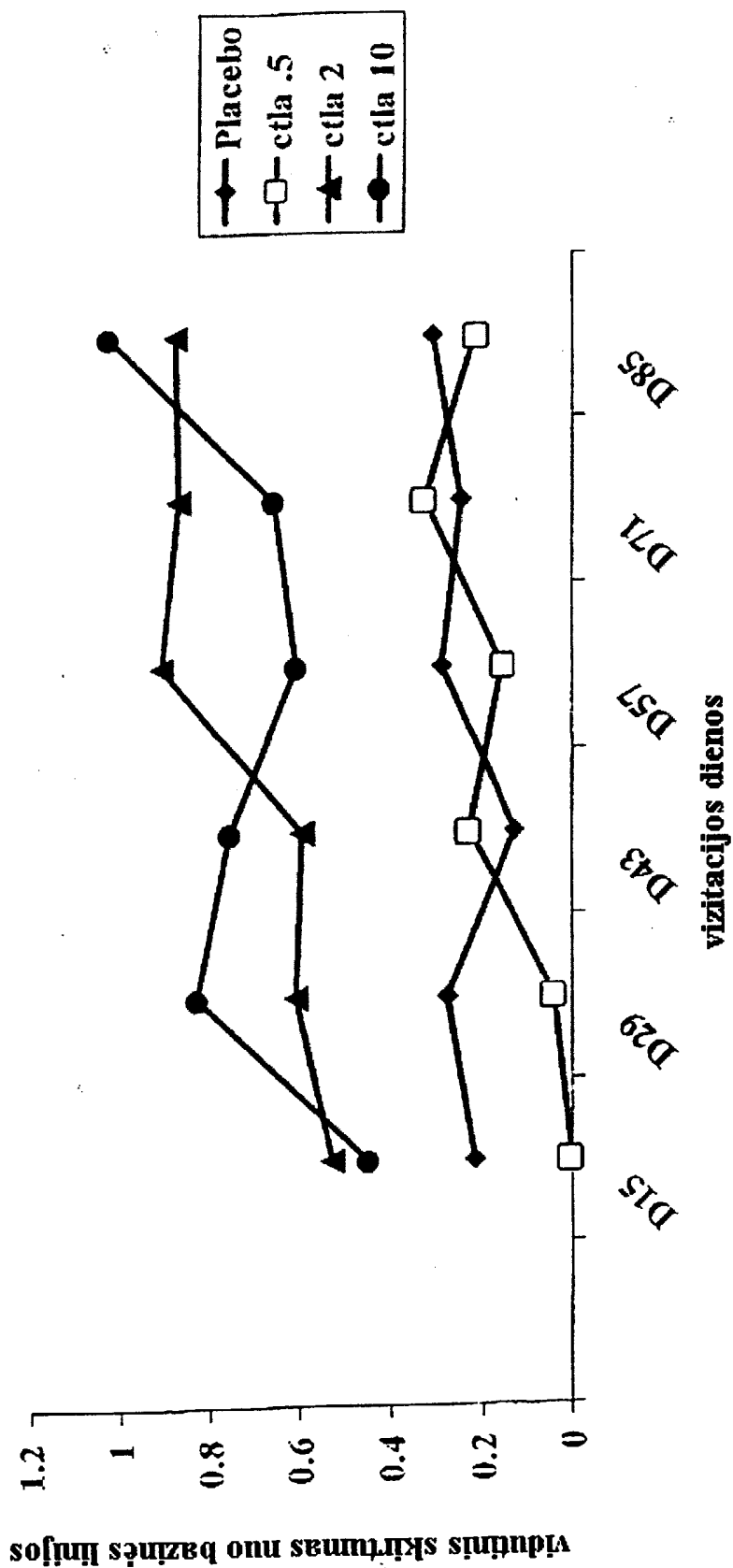


FIG. 11

CTLA

Paciento įvertintas ligos aktyvumas
- vidutinis skirtumas nuo bazinės linijos -

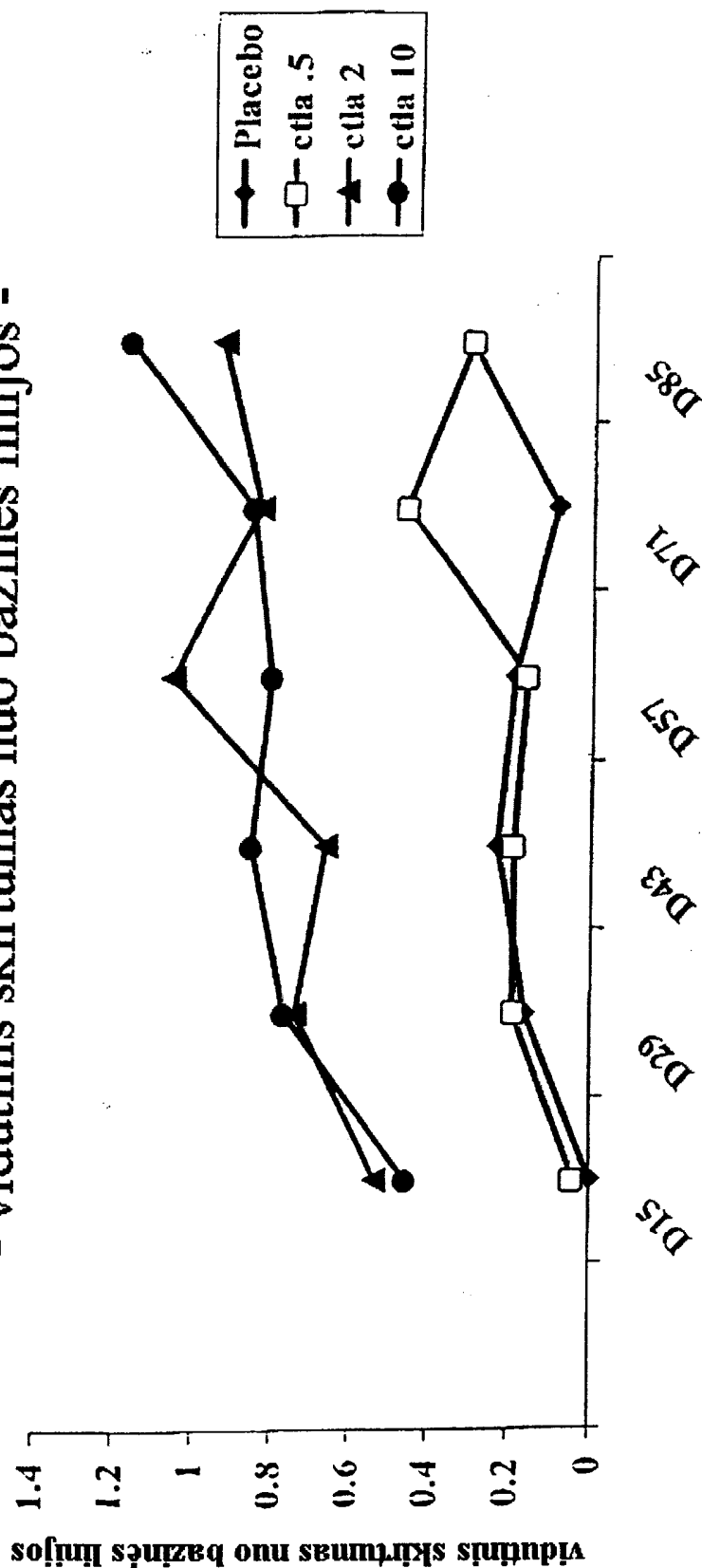


FIG. 12A

CTLA Gydytojo įvertintas ligos aktyvumas - vidutinis skirtumas nuo bazinės linijos -

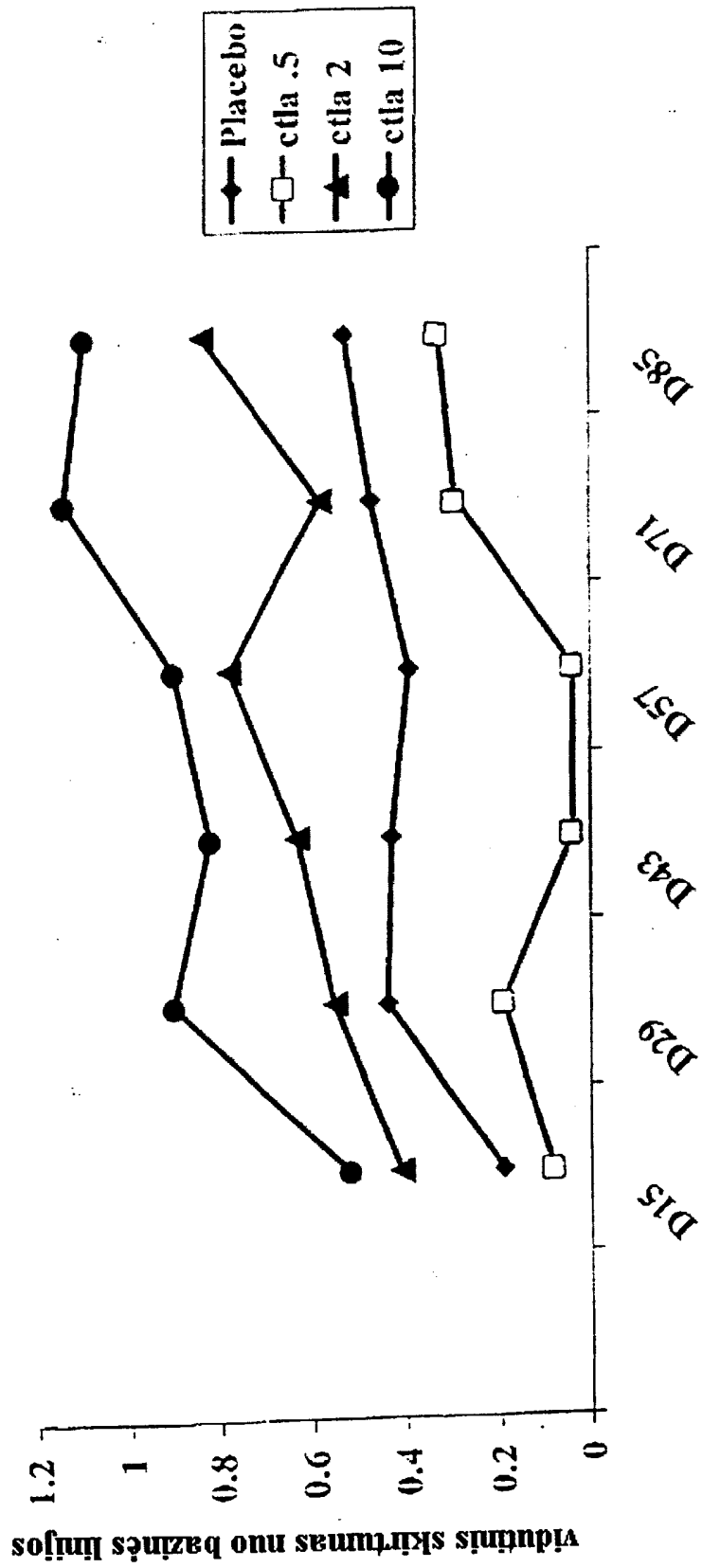


FIG. 12B

LEA jautrūs sanariai
- tarpinis skirtumas nuo bazinės linijos -

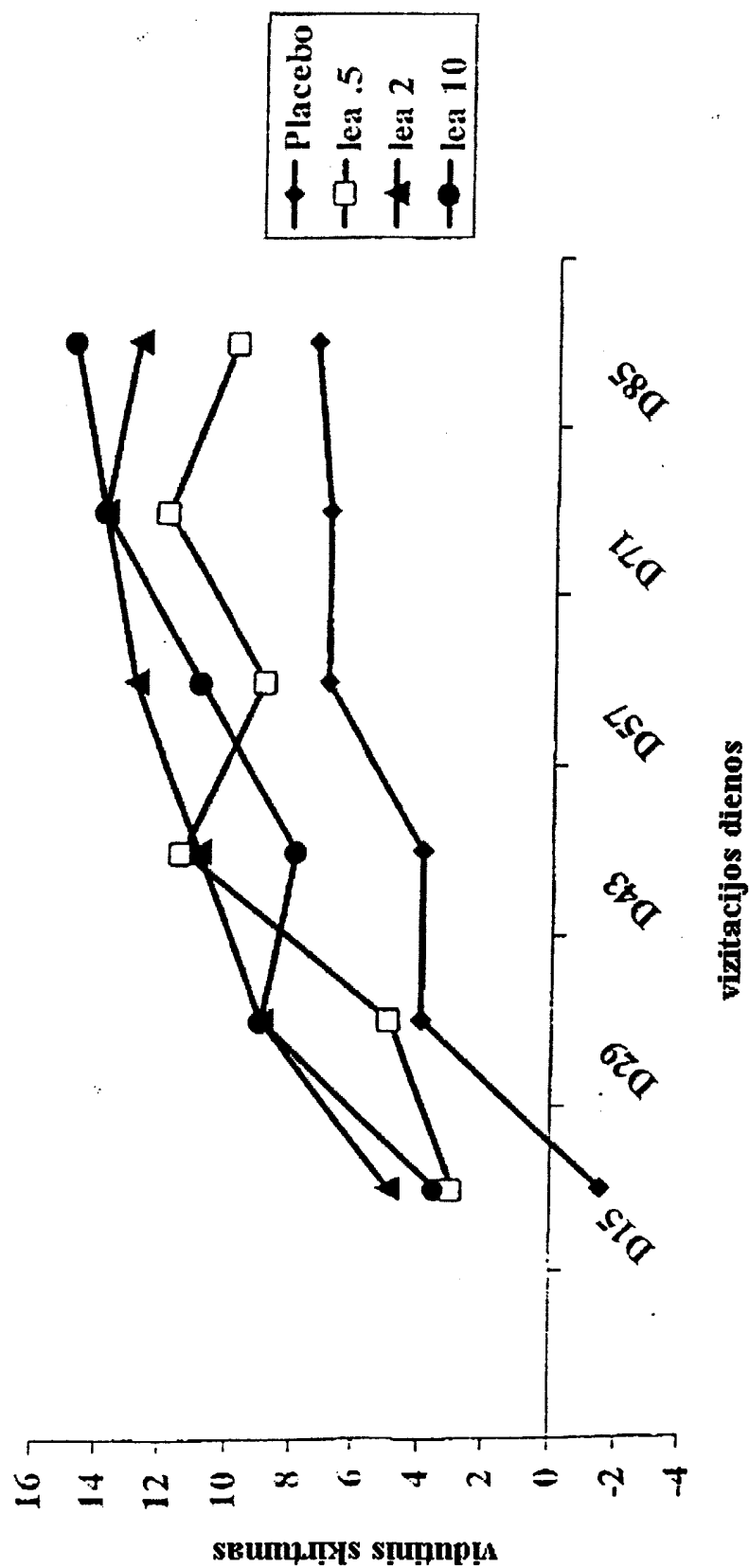
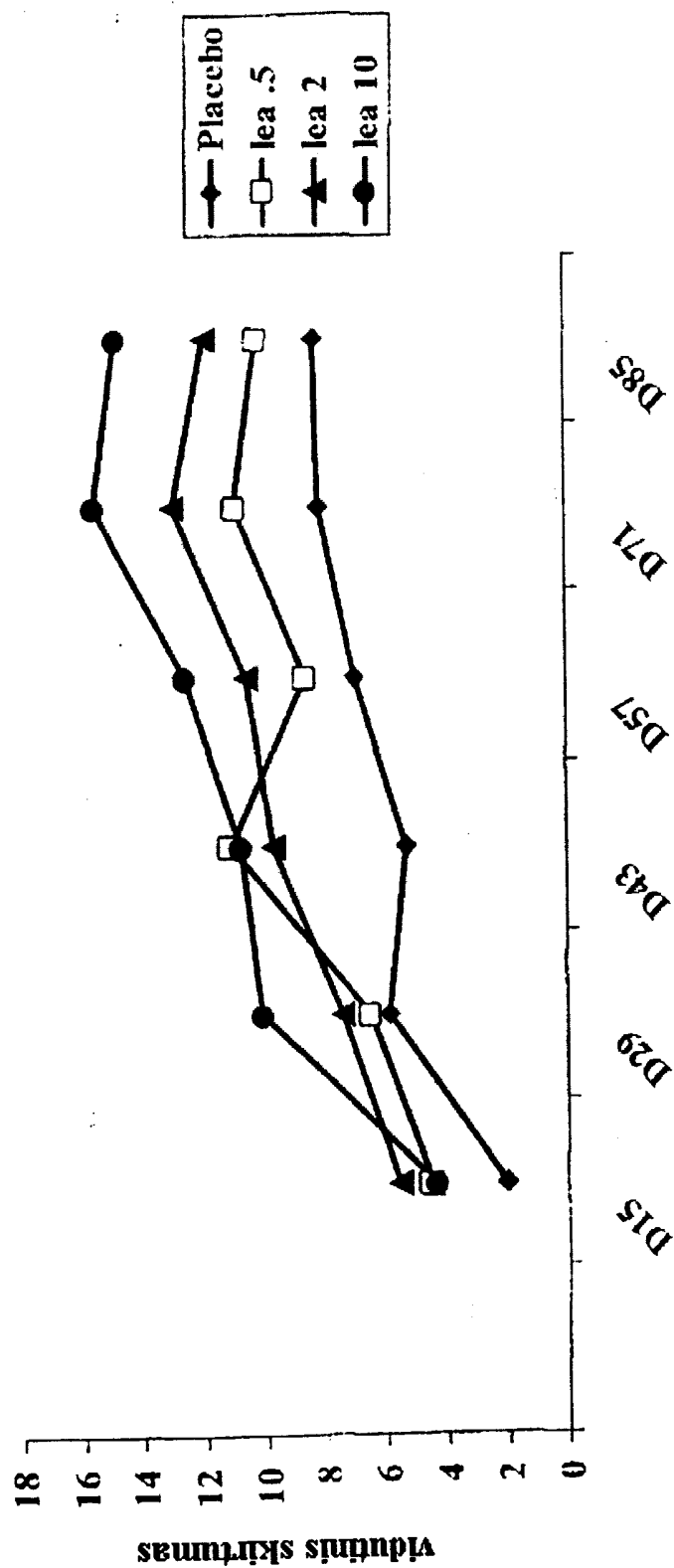


FIG. 13A

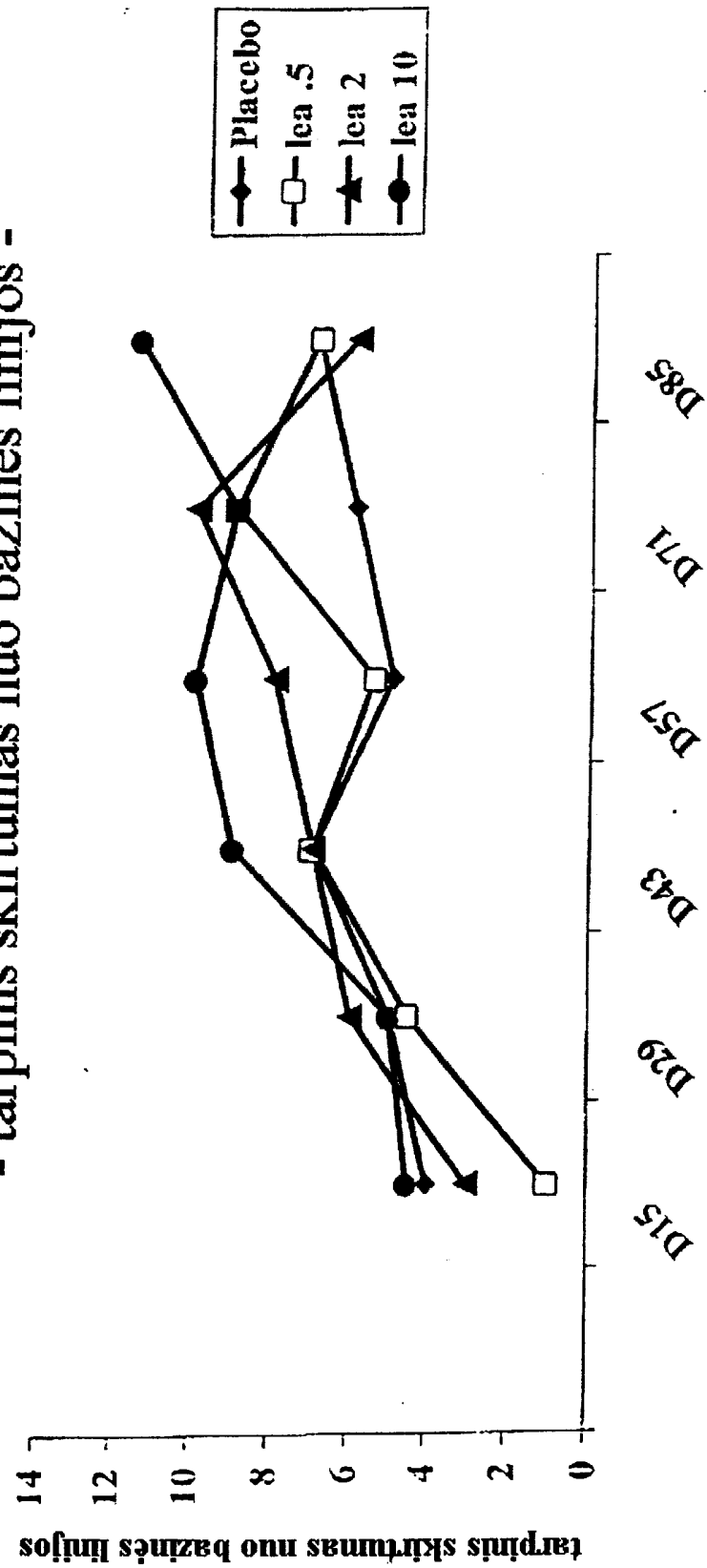
LEA jautrūs sąnariai
- tarpinis skirtumas nuo bazinės linijos -



vizitacijos dienos

FIG. 13B

LEA patinę sąnariai
- tarpinis skirtumas nuo bazinės linijos -



vizitacijos dienos
FIG. 14A

LEA patinė sąnariai
- tarpinis skirtumas nuo bazinės linijos -

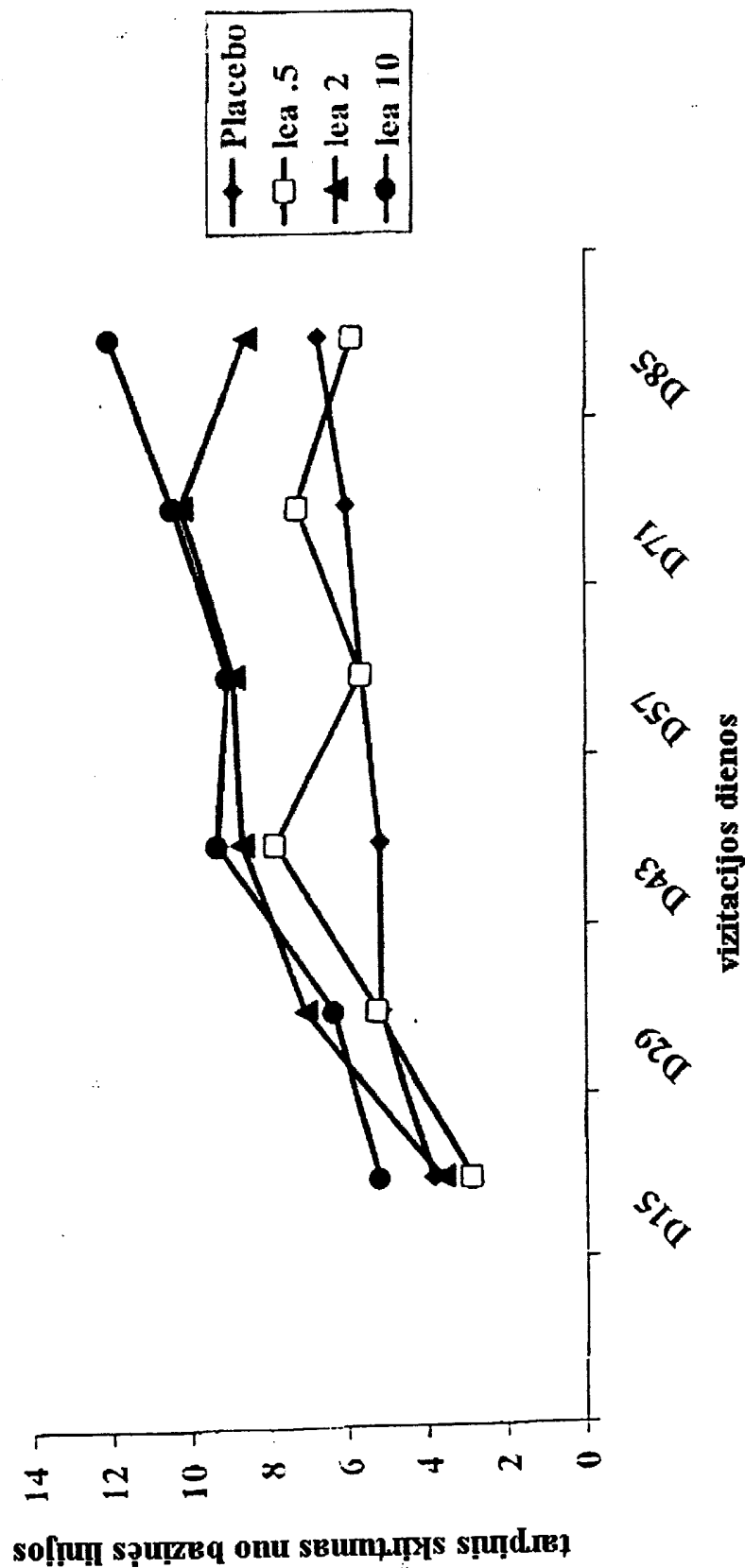


FIG. 14B

LEA skausmo įvertinimas
- vidutinis skirtumas nuo bazinės linijos -

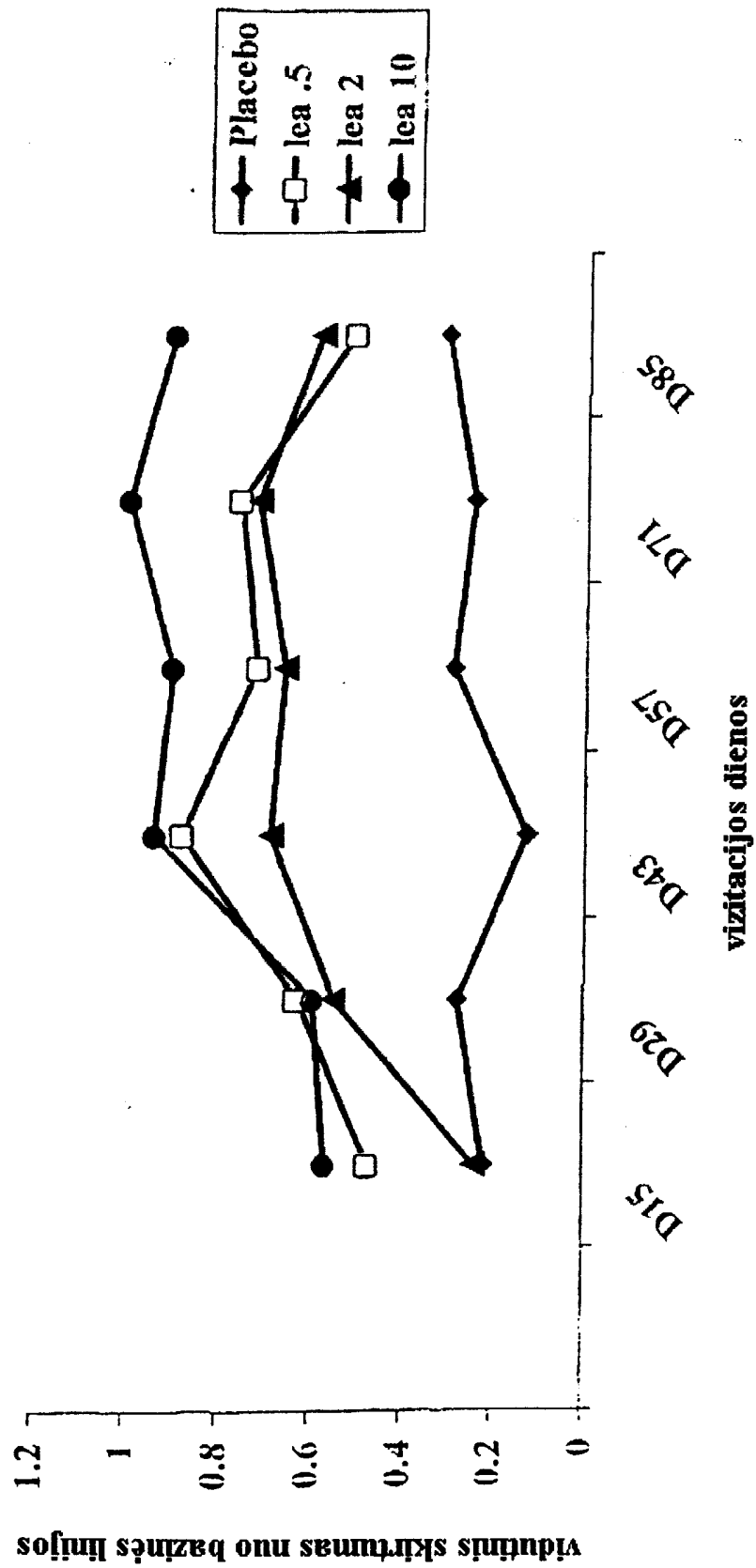


FIG. 15

CTLA paciento įvertintas ligos aktyvumas - vidutinis skirtumas nuo bazinės linijos -

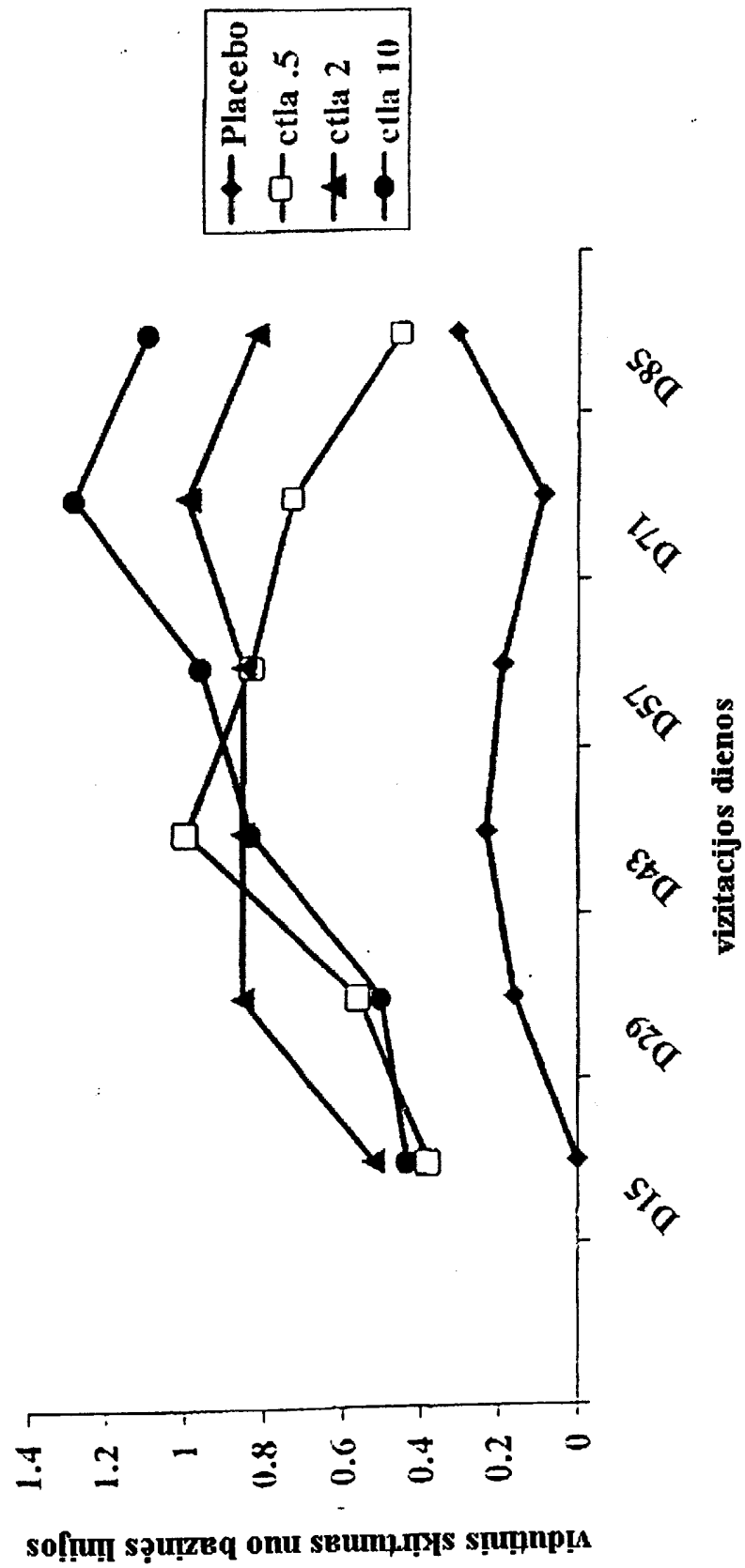
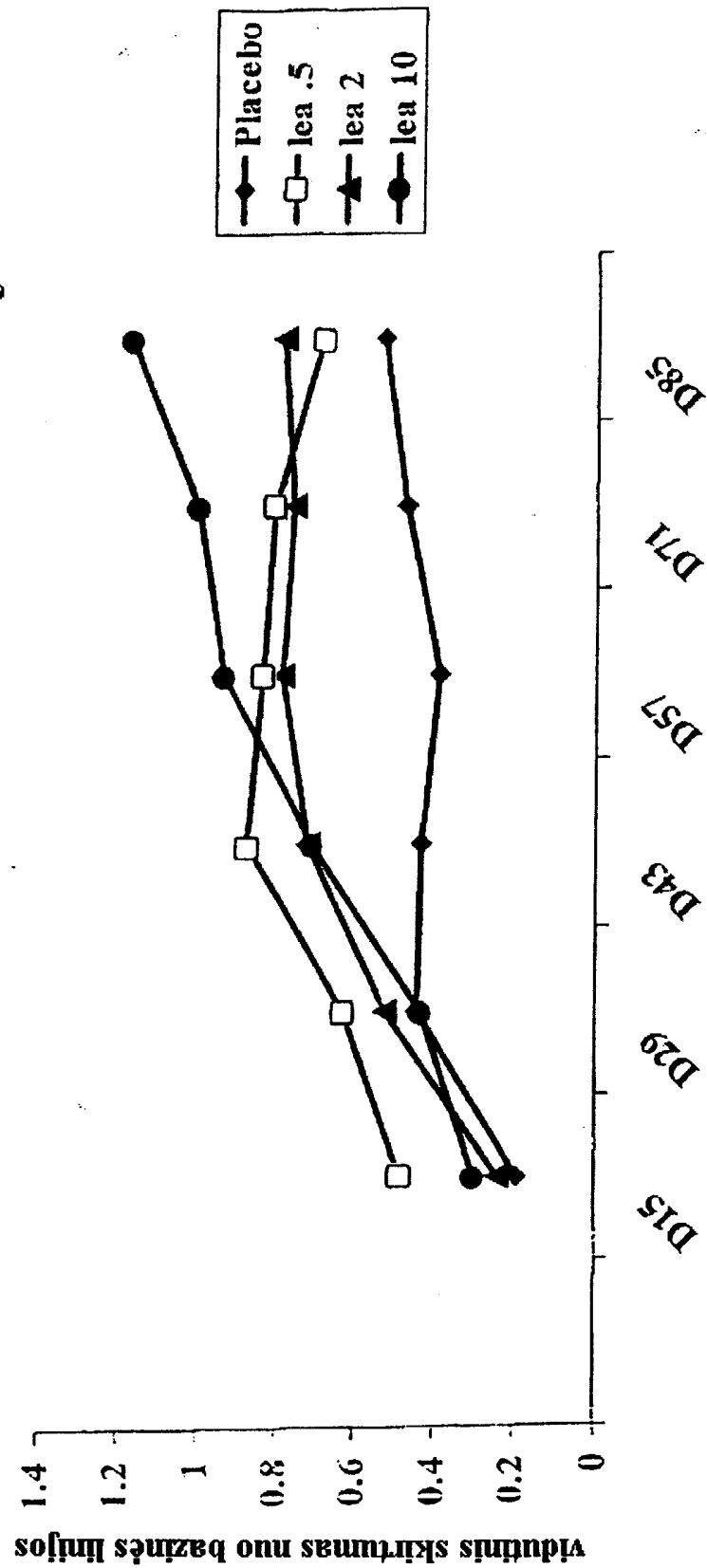


FIG. 16A

CTLA gydytojo įvertintas ligos aktyvumas
- vidutinis skirtumas nuo bazinės linijos -



vizitacijos dienos

FIG. 16B

HAQ lygių procentinis įvertinimas 85-tą dieną
lyginant su bazine linija

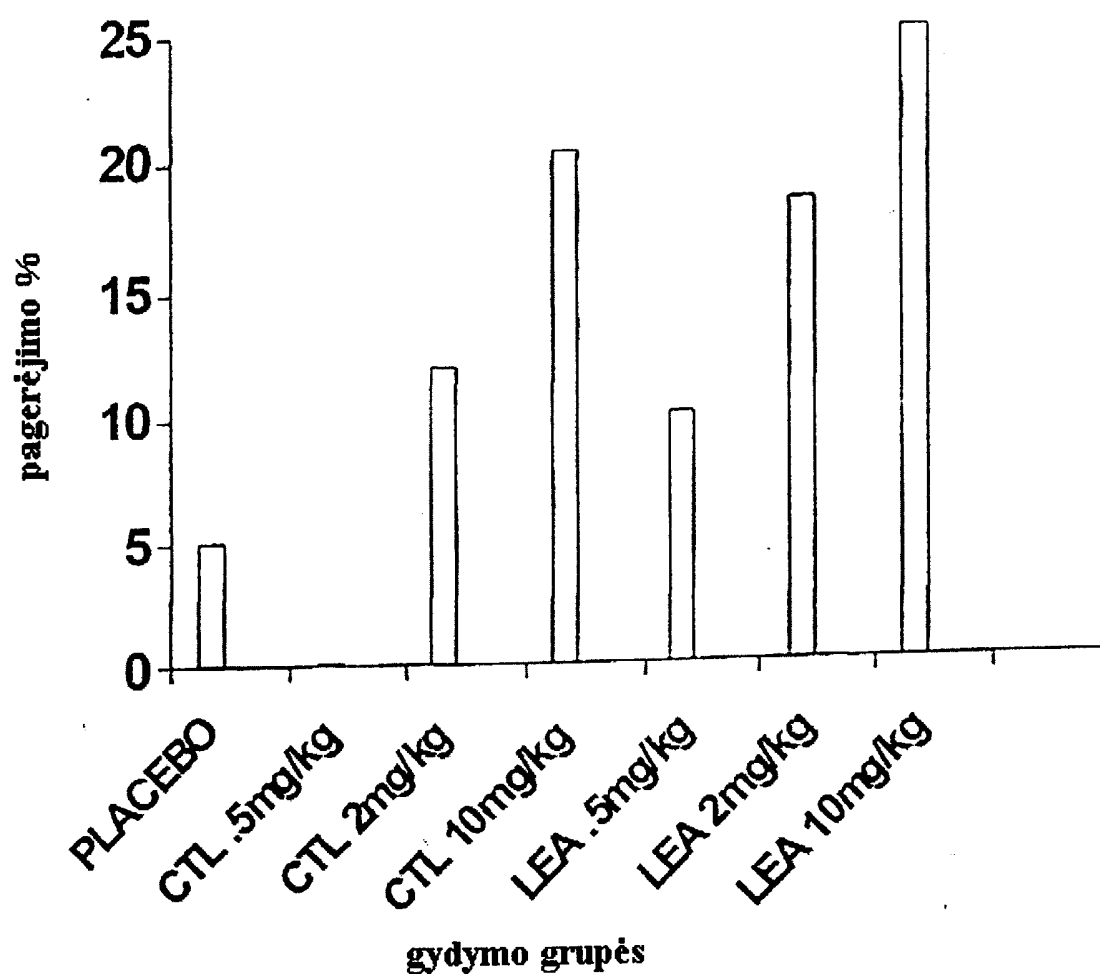


FIG. 17

ATGGGTGCTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCA	-19
M~G~V~L~L~T~Q~R~T~L~L~S~L~V~L~A~L~L~F~P~	-7
AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA	+42
S~M~A~S~M~A~M~H~V~A~Q~P~A~V~V~L~A~S~S~R~	+14
+1	
GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAAGCCACTGAGGTCCGGGTG	+102
G~I~A~S~F~V~C~E~Y~A~S~P~G~K~A~T~E~V~R~V~	+34
ACAGTGCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG	+162
T~V~L~R~Q~A~D~S~Q~V~T~E~V~C~A~A~T~Y~M~M~	+54
GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAATCAA	+222
G~N~E~L~T~F~L~D~D~S~I~C~T~G~T~S~S~G~N~Q~	+74
GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG	+282
V~N~L~T~I~Q~G~L~R~A~M~D~T~G~L~Y~I~C~K~V~	+94
GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACGAGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA	+342
E~L~M~Y~P~P~P~Y~Y~E~G~I~G~N~G~T~Q~I~Y~V~	+114
ATTGATCCAGAACCGTGCCCGAGATTCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCAC	+402
I~D~P~E~P~C~P~D~S~D~Q~E~P~K~S~S~D~K~T~H~	+134
ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGATCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC	+462
T~S~P~P~S~P~A~P~E~L~L~G~G~S~S~V~F~L~F~P~	+154
CCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG	+522
P~K~P~K~D~T~L~M~I~S~R~T~P~E~V~T~C~V~V~V~	+174
GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG	+582
D~V~S~H~E~D~P~E~V~K~F~N~W~Y~V~D~G~V~E~V~	+194
CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC	+642
H~N~A~K~T~K~P~R~E~E~Q~Y~N~S~T~Y~R~V~V~S~	+214
GTCCTCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC	+702
V~L~T~V~L~H~Q~D~W~L~N~G~K~E~Y~K~C~K~V~S~	+234
AACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA	+762
N~K~A~L~P~A~P~I~E~K~T~I~S~K~A~K~G~Q~P~R~	+254
GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGC	+822
E~P~Q~V~Y~T~L~P~P~S~R~D~E~L~T~K~N~Q~V~S~	+274
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT	+882
L~T~C~L~V~K~G~F~Y~P~S~D~I~A~V~E~W~E~S~N~	+294
GGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC	+942
G~Q~P~E~N~N~Y~K~T~T~P~P~V~L~D~S~D~G~S~F~	+314
TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA	+1002
F~L~Y~S~K~L~T~V~D~K~S~R~W~Q~Q~G~N~V~F~S~	+334
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT	+1062
C~S~V~M~H~E~A~L~H~N~H~Y~T~Q~K~S~L~S~L~S~	+354
CCGGGTAAATGA	
P~G~K~*	

FIG. 18

ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCA	-19
M~G~V~L~L~T~Q~R~T~L~L~S~L~V~L~A~L~L~F~P~	-7
AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA	+42
S~M~A~S~M~A~M~H~V~A~Q~P~A~V~V~L~A~S~S~R~	+14
+1	
GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAATATACTGAGGTCCGGGTG	+102
G~I~A~S~F~V~C~E~Y~A~S~P~G~K~Y~T~E~V~R~V~	+34
ACAGTGCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG	+162
T~V~L~R~Q~A~D~S~Q~V~T~E~V~C~A~A~T~Y~M~M~	+54
GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA	+222
G~N~E~L~T~F~L~D~D~S~I~C~T~G~T~S~S~G~N~Q~	+74
GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG	+282
V~N~L~T~I~Q~G~L~R~A~M~D~T~G~L~Y~I~C~K~V~	+94
GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACGAGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA	+342
E~L~M~Y~P~P~P~Y~Y~E~G~I~G~N~G~T~Q~I~Y~V~	+114
ATTGATCCAGAACCGTGCCAGATTCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCAC	+402
I~D~P~E~P~C~P~D~S~D~Q~E~P~K~S~S~D~K~T~H~	+134
ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGATCGTCAGTCTTCTCTTCCCC	+462
T~S~P~P~S~P~A~P~E~L~L~G~G~S~S~V~F~L~F~P~	+154
CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTG	+522
P~K~P~K~D~T~L~M~I~S~R~T~P~E~V~T~C~V~V~V~	+174
GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG	+582
D~V~S~H~E~D~P~E~V~K~F~N~W~Y~V~D~G~V~E~V~	+194
CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC	+642
H~N~A~K~T~K~P~R~E~E~Q~Y~N~S~T~Y~R~V~V~S~	+214
GTCCTCACCGTCTGTCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCC	+702
V~L~T~V~L~H~Q~D~W~L~N~G~K~E~Y~K~C~K~V~S~	+234
AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA	+762
N~K~A~L~P~A~P~I~E~K~T~I~S~K~A~K~G~Q~P~R~	+254
GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGC	+822
E~P~Q~V~Y~T~L~P~P~S~R~D~E~L~T~K~N~Q~V~S~	+274
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT	+882
L~T~C~L~V~K~G~F~Y~P~S~D~I~A~V~E~W~E~S~N~	+294
GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTC	+942
G~Q~P~E~N~N~Y~K~T~T~P~P~V~L~D~S~D~G~S~F~	+314
TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA	+1002
F~L~Y~S~K~L~T~V~D~K~S~R~W~Q~Q~G~N~V~F~S~	+334
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT	+1062
C~S~V~M~H~E~A~L~H~N~H~Y~T~Q~K~S~L~S~L~S~	+354
CCGGGTAAATGA	
P~G~K~*	

FIG. 19

ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCA
 M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--Y--P--
 AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA
 S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--
 GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAATTGACTGAGGTCCGGGTG
 G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--L--T--E--V--R--V--
 ACAGTGCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG
 T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--
 GGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA
 G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--
 GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG
 V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--X--V--
 GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACGAGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA
 E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--
 ATTGATCCAGAACC GTGCCAGATTCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCAC
 I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--
 ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGATCGTCAGTCTTCTCTTCCCC
 T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P--
 CCAAAACCAAGGACACCCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTG
 P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--
 GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG
 D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V--
 CATAATGCCAAGACAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC
 H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--
 GTCCCTACCGTCTGTCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCC
 V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--Q--K--E--Y--K--C--K--V--S--
 AACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA
 N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--
 GAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGC
 E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--
 CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT
 L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--
 GGGCAGCCGAGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTC
 G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--
 TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA
 F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S--
 TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT
 C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--
 CCGGGTAAATGA-----
 P--G--K--A-----

FIG. 20

ATGGGTGTA CTGCTCACACAGAGGACCGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCA
 M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P--
 AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA
 S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--
 GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAACTACTGAGGTCCGGGTG
 G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--T--T--E--V--R--V--
 ACAGTGTCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGGCGCAACCTACATGATG
 T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--K--
 GGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAATCAA
 G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--
 GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGTG
 V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--
 GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACGAGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA
 E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--
 ATTGATCCAGAACCGTGCCAGATTCTGATCAGGAGGCCAAATCTTCTGACAAAACCTCAC
 I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--
 ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGGATCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC
 T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P--
 CCAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG
 P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--
 GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTG
 D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--N--Y--V--D--G--V--E--V--
 CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC
 H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--
 GTCCTCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC
 V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--
 AACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA
 N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--
 GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACAGC
 E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--
 CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT
 L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--
 GGGCAGCCCGAGAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTC
 G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--
 TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA
 F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S--
 TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT
 C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--
 CCGGGTAAATGA-----
 P--G--K-------

FIG. 21

ATGGGTGCTACTGCTCAGACAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCTTGCACCTCCTGTTTCCA
 M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P--
 AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCAGCCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA
 S--M--A--S--M--A--N--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--
 GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATCATCTCCAGGCAATGGACTGAGGTCCGGGTG
 G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--W--T--E--V--R--V--
 ACAGTGTCTGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGGGCAACCTACATGATG
 T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--
 GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA
 G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--Q--N--Q--
 GTGAACCTCACTATCCAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG
 V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--
 GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACGAGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTATGTA
 E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--
 ATTGATCCAGAACCGTGGCCAGATTCTGTATCAGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCAC
 I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--
 ACATCCGCCACCGTCCCGAGCACCTGAACCTCCTGGGGGATCGTCACTCTTCTCTTCCCC
 T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--P--L--P--P--
 CCAAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCCTGGTGGTG
 P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--
 GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG
 D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V--
 CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC
 H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--
 GTCTCACCCTCCTGCAACGAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC
 V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--
 AACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA
 N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--
 GAACACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGC
 E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--
 CTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCOCCTGGAGTGGGAGAGCAAT
 L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--
 GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTC
 G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--
 TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA
 F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S--
 TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAAGAGCCTCTCCCTGTCT
 C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--
 CCGGGTAAATGA-----
 P--G--K--T-----

FIG. 22

ONKOSTATINO M SIGNALINIS PEPTIDAS

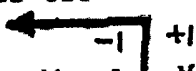
M	G	V	L	L	T	Q	R	T	L	L	S	L	V	L	
ATG	GGT	GTA	CTG	CTC	ACA	CAG	AGG	ACG	CTG	CTC	AGT	CTG	GTC	CTT	
															45
A	L	L	F	P	S	M	A	S	M	A	M	H	V	A	
GCA	CTC	CTG	TTT	CCA	AGC	ATG	GCG	AGC	ATG	GCA	ATG	CAC	GTG	GCC	
															90
Q	P	A	V	V	L	A	S	S	R	G	I	A	S	F	
CAG	CCT	GCT	GTG	GTA	CTG	GCC	AGC	AGC	CGA	GGC	ATC	GCC	AGC	TTT	
															135
V	C	E	Y	A	S	P	G	K	A	T	E	V	R	V	
GTG	TGT	GAG	TAT	GCA	TCT	CCA	GGC	AAA	GCC	ACT	GAG	GTG	CGG	GTG	
															180
T	V	L	R	Q	A	D	S	Q	V	T	E	V	C	A	
ACA	GTG	CTT	CGG	CAG	GCT	GAC	AGC	CAG	GTG	ACT	GAA	GTG	TGT	GCG	
															225
A	T	Y	M	M	G	N	E	L	T	F	L	D	D	S	
GCA	ACC	TAC	ATG	ATG	GGG	AAT	GAG	TTG	ACC	TTC	CTA	GAT	GAT	TCC	
															270
I	C	T	G	T	S	S	G	N	Q	V	N	L	T	I	
ATC	TGC	ACG	GGC	ACC	TCC	AGT	GGA	AAT	CAA	GTG	AAC	CTC	ACT	ATC	
															315
Q	G	L	R	A	M	D	T	G	L	Y	I	C	K	V	
CAA	GCA	CTG	AGG	GCC	ATG	GAC	ACG	GGA	CTC	TAC	ATC	TGC	AAG	GTG	
															360
															Glikozilino vieta
E	L	M	Y	P	P	P	Y	Y	L	G	I	G	N	G	
GAG	CTC	ATG	TAC	CCA	CCG	CCA	TAC	TAC	CTG	GGC	ATA	GGC	AAC	GGA	
															405
T	Q	I	Y	V	I	D	P	E	P	C	P	D	S	D	
ACC	CAG	ATT	TAT	GTA	ATT	GAT	CCA	GAA	CCG	TGC	CCA	GAT	TCT	GAC	
															450
F	L	L	W	I	L	A	A	V	S	S	G	L	F	F	
TTC	CTC	CTC	TGG	ATC	CTT	GCA	GCA	GTT	AGT	TCG	GGG	TTG	TTT	TTT	
															495
Y	S	F	L	L	T	A	V	S	L	S	K	M	L	K	
TAT	AGC	TTT	CTC	CTC	ACA	GCT	GTT	TCT	TTG	AGC	AAA	ATG	CTA	AAG	
															540
K	R	S	P	L	T	T	G	V	Y	V	K	M	P	P	
AAA	AGA	AGC	CCT	CTT	ACA	ACA	GGG	GTC	TAT	GTG	AAA	ATG	CCC	CCA	
															585
T	E	P	E	C	E	K	Q	F	Q	P	Y	F	I	P	
ACA	GAG	CCA	GAA	TGT	GAA	AAG	CAA	TTT	CAG	CCT	TAT	TTT	ATT	CCC	
															630
I	N														636
ATC	AAT														

FIG. 23

ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCA	-19
M~G~V~L~L~T~Q~R~T~L~L~S~L~V~L~A~L~L~F~P~	-7
AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA	+42
S~M~A~S~M~A~M~H~V~A~Q~P~A~V~V~L~A~S~S~R~	+14
+1	
GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAAGCCACTGAGGTCCGGGTG	+102
G~I~A~S~F~V~C~E~Y~A~S~P~G~K~A~T~E~V~R~V~	+34
ACAGTGCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG	+162
T~V~L~R~Q~A~D~S~Q~V~T~E~V~C~A~A~T~Y~M~M~	+54
GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA	+222
G~N~E~L~T~F~L~D~D~S~I~C~T~G~T~S~S~G~N~Q~	+74
GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG	+282
V~N~L~T~I~Q~G~L~R~A~M~D~T~G~L~Y~I~C~K~V~	+94
GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACCTGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA	+342
E~L~M~Y~P~P~P~Y~Y~L~G~I~G~N~G~T~Q~I~Y~V~	+114
ATTGATCCAGAACCGTGCCCGAGATTCTGATCAGGAGCCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCAC	+402
I~D~P~E~P~C~P~D~S~D~Q~E~P~K~S~S~D~K~T~H~	+134
ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGTGGATCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC	+462
T~S~P~P~S~P~A~P~E~L~L~G~G~S~S~V~F~L~F~P~	+154
CCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTG	+522
P~K~P~K~D~T~L~M~I~S~R~T~P~E~V~T~C~V~V~V~	+174
GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG	+582
D~V~S~H~E~D~P~E~V~K~F~N~W~Y~V~D~G~V~E~V~	+194
CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGC	+642
H~N~A~K~T~K~P~R~E~E~Q~Y~N~S~T~Y~R~V~V~S~	+214
GTCCTCACCGTCTTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC	+702
V~L~T~V~L~H~Q~D~W~L~N~G~K~E~Y~K~C~K~V~S~	+234
AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA	+762
N~K~A~L~P~A~P~I~E~K~T~I~S~K~A~K~G~Q~P~R~	+254
GAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACAGC	+822
E~P~Q~V~Y~T~L~P~P~S~R~D~E~L~T~K~N~Q~V~S~	+274
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT	+882
L~T~C~L~V~K~G~F~Y~P~S~D~I~A~V~E~W~E~S~N~	+294
GGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC	+942
G~Q~P~E~N~N~Y~K~T~T~P~P~V~L~D~S~D~G~S~F~	+314
TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA	+1002
F~L~Y~S~K~L~T~V~D~K~S~R~W~Q~Q~G~N~V~F~S~	+334
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT	+1062
C~S~V~M~H~E~A~L~H~N~H~Y~T~Q~K~S~L~S~L~S~	+354
CCGGGTAAATGA	
P~G~K~*	

FIG. 24

FIG. 25A

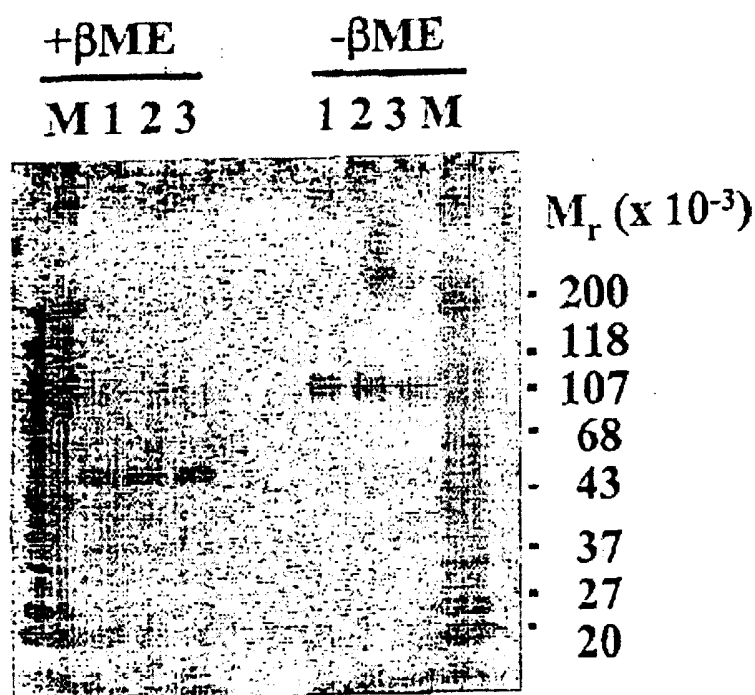


FIG. 25B

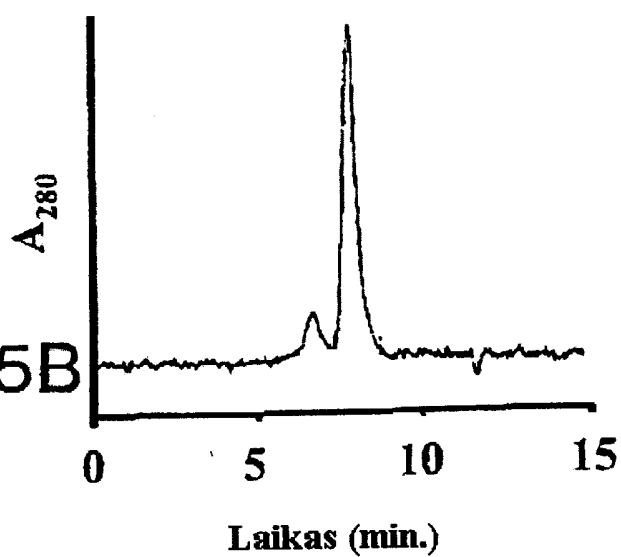
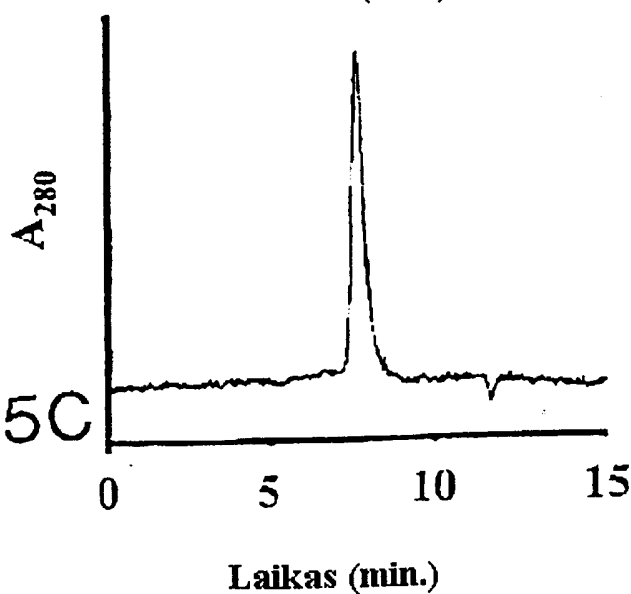


FIG. 25C



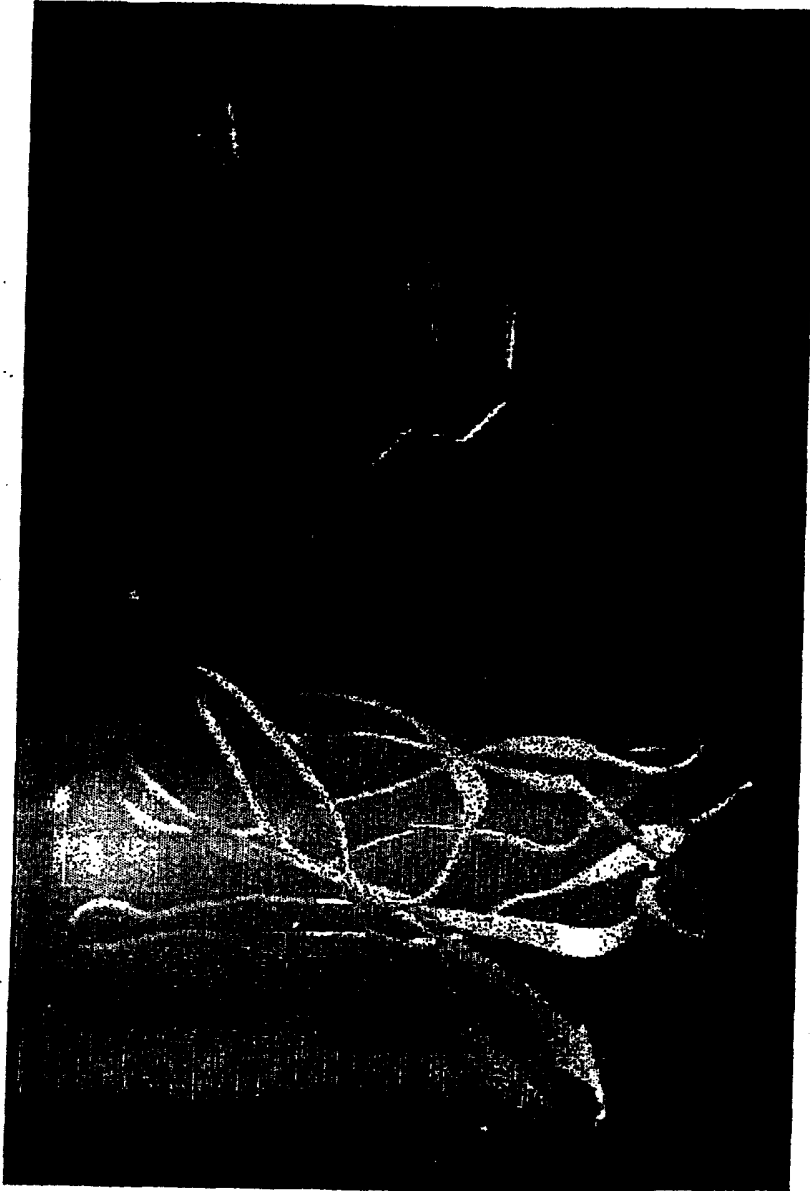


FIG. 26

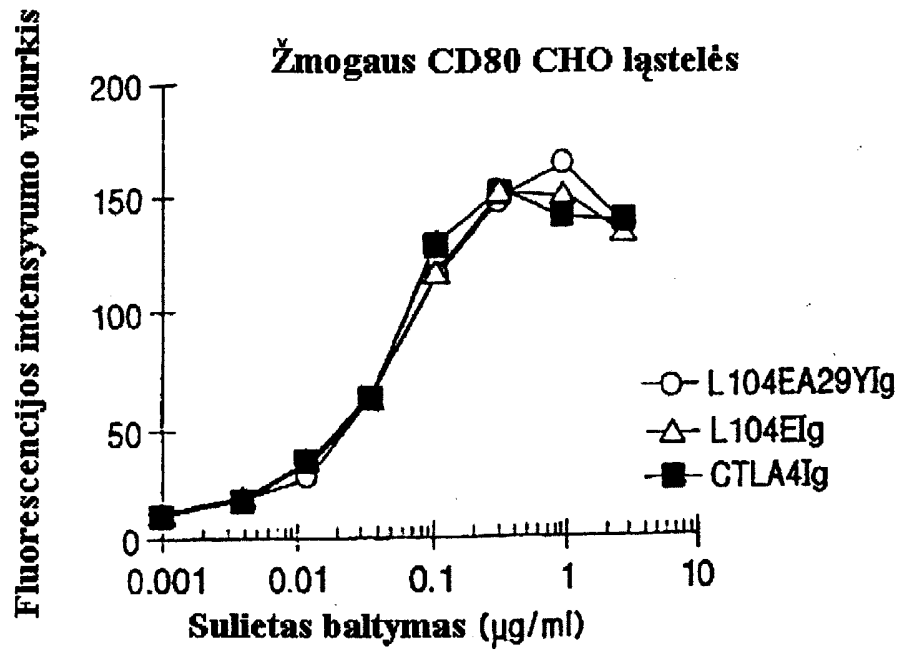


FIG. 27A

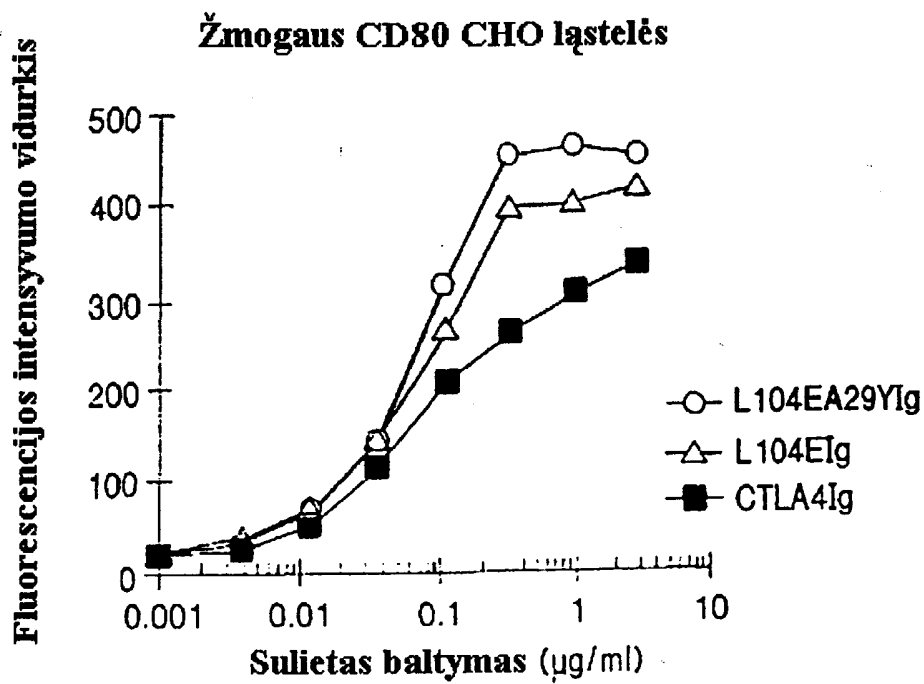


FIG. 27B

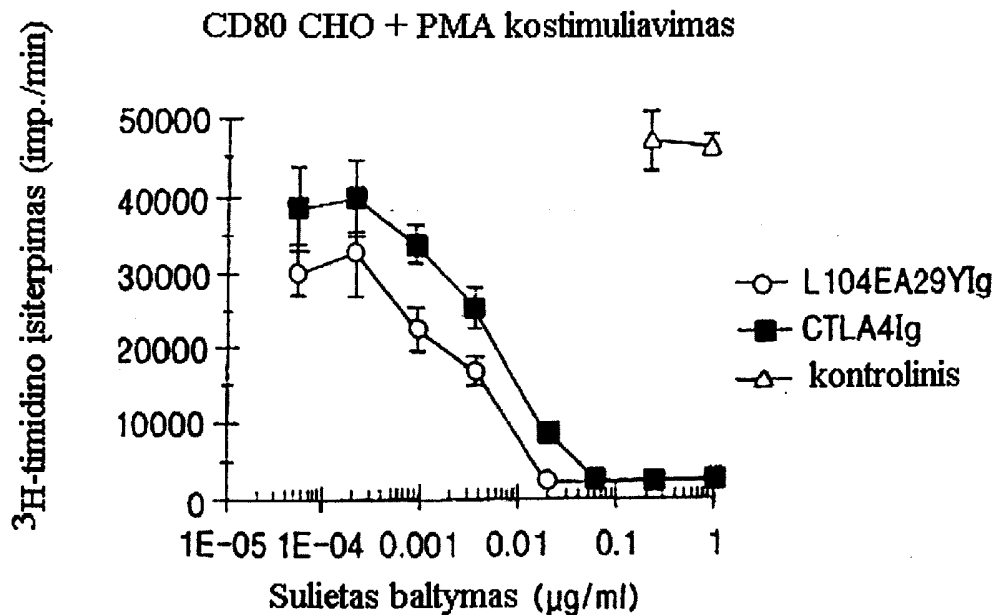


FIG. 28A

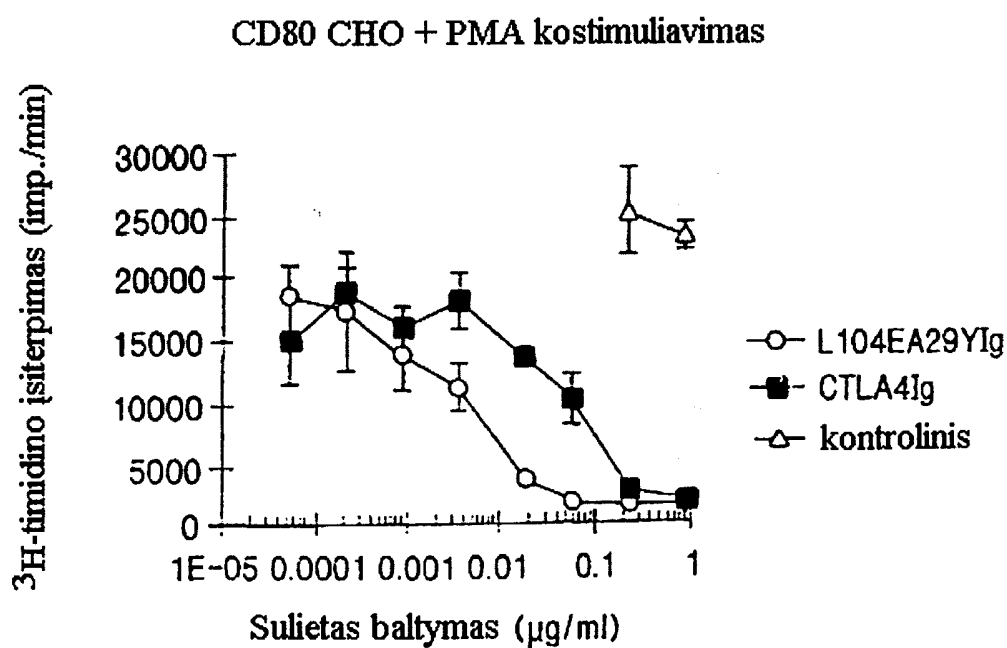


FIG. 28B

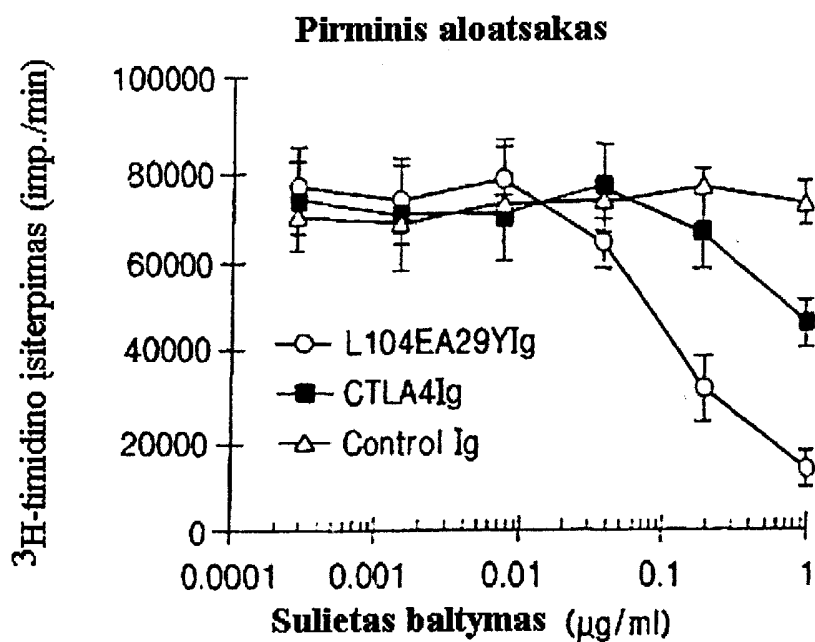


FIG. 29A

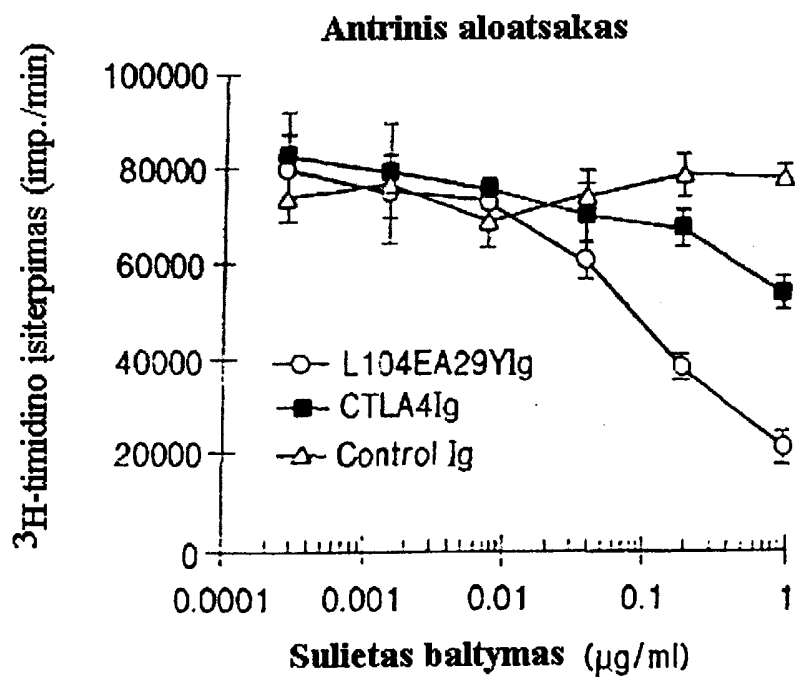


FIG. 29B

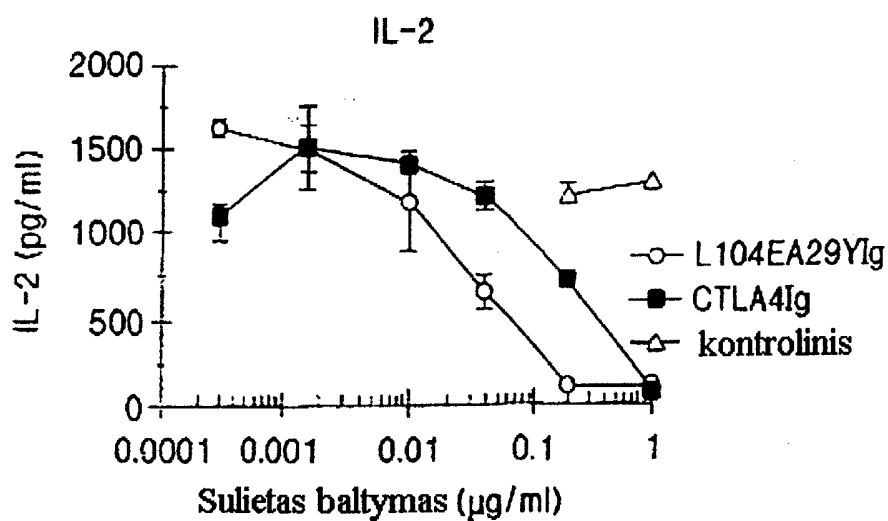


FIG. 30A

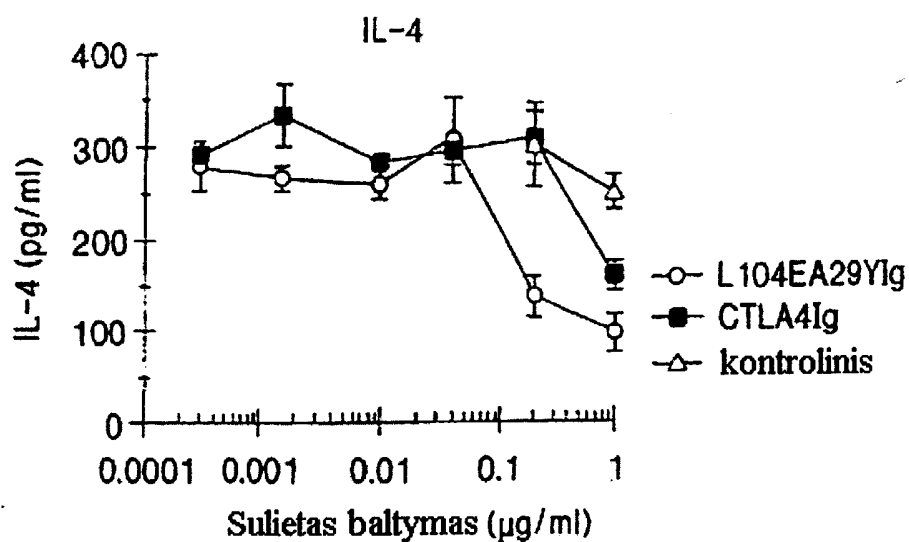


FIG. 30B

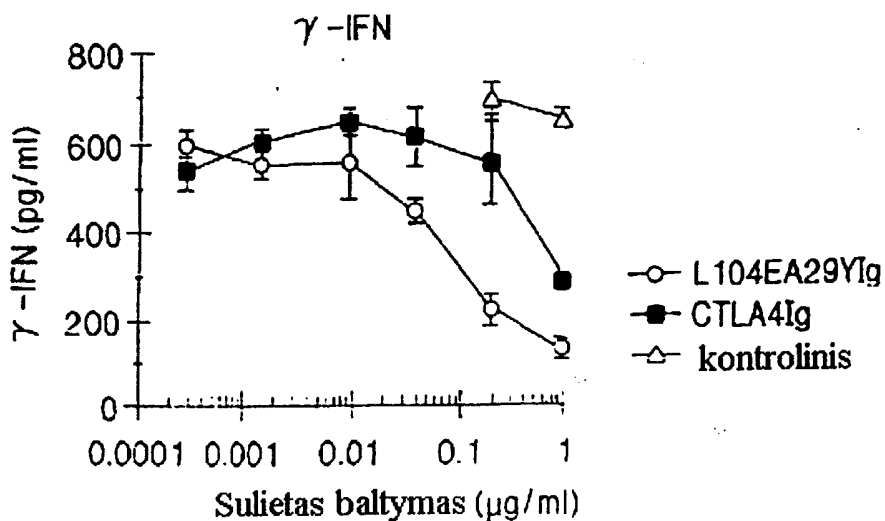


FIG. 30C

PHA indukuotų beždžionės T ląstelių proliferacijos inhibavimas

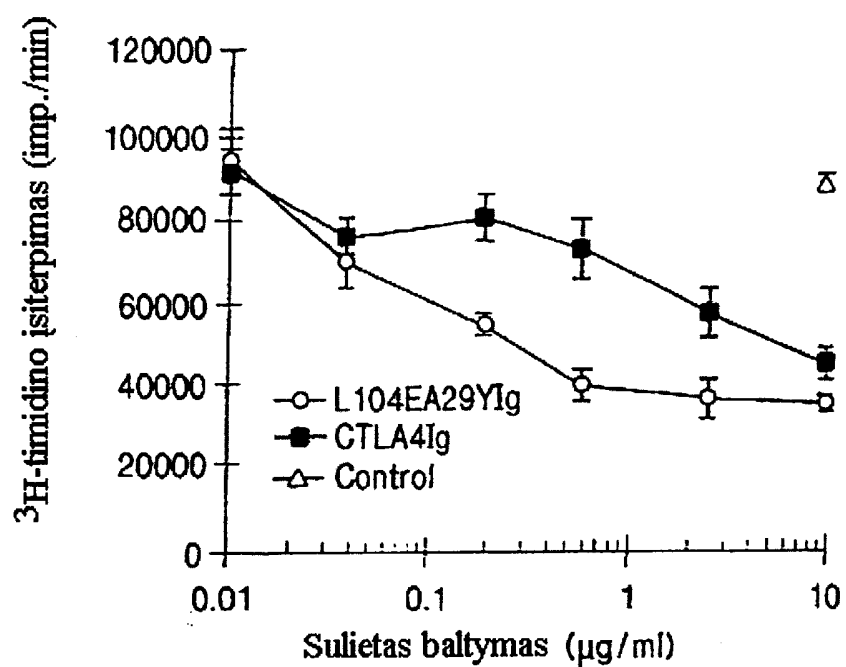


FIG. 31

Pusiausvyrinis susirišimas su CD86Ig

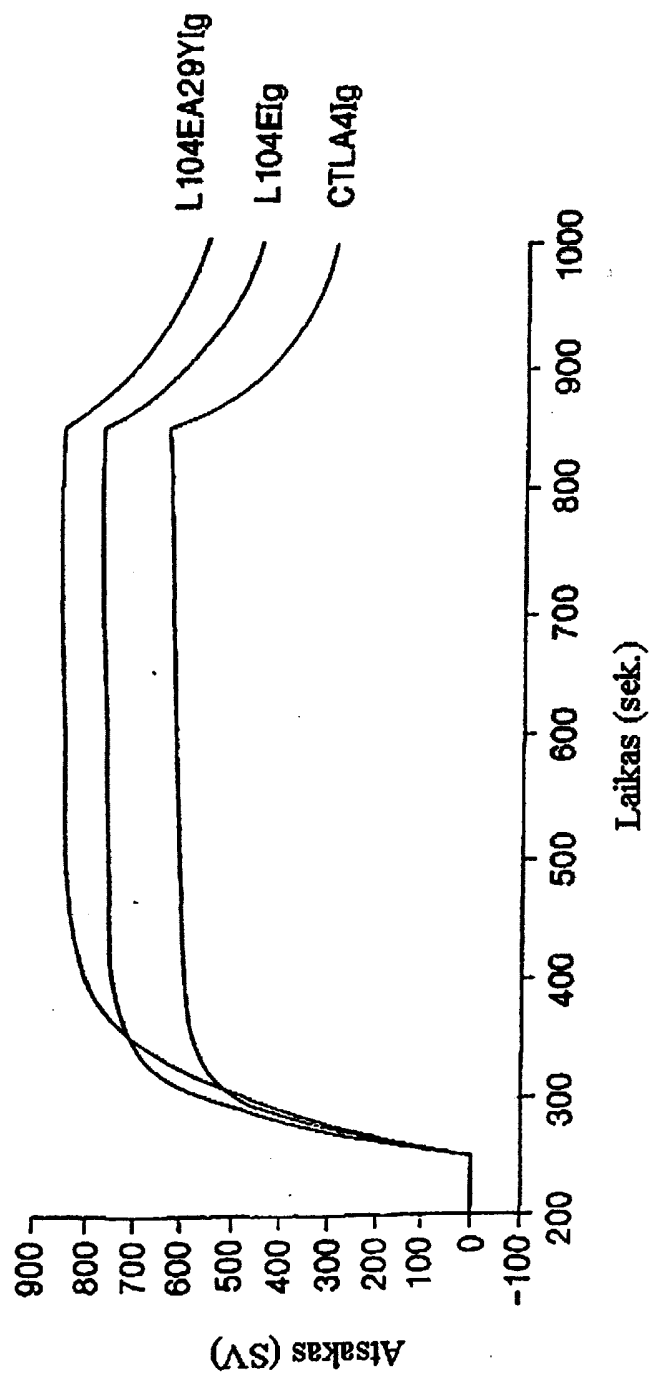


FIG. 32

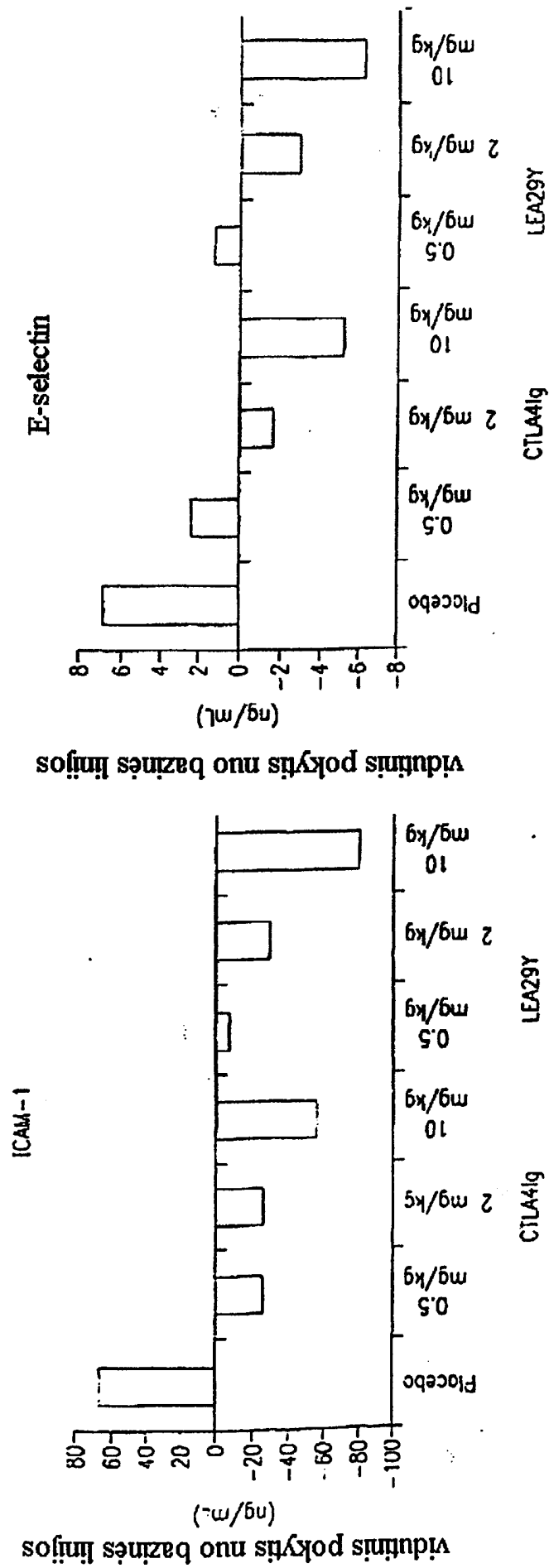


FIG. 33