



(10) **LT 5133 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patento numeris: **5133** (51) Int. Cl.⁷: **C07K 16/00**

(21) Paraiškos numeris: **2002 114**

(22) Paraiškos padavimo data: **2002 11 13**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2003 12 29**

(45) Patento paskelbimo data: **2004 05 25**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US01/17139**

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **2001 05 23**

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: **2002 11 13**

(30) Prioritetas: **09/579927, 2000 05 26, US**
60/214065, 2000 06 26, US

(72) Išradėjas:

Robert J. PEACH, US
Joseph R. NAEMURA, US
Peter S. LINSLEY, US
Jurgen BAJORATH, US

(73) Patento savininkas:

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, P. O. Box 400, Lawrenceville-Princeton
Road, Princeton, New Jersey 08543, US

(74) Patentinis patikėtinis:

Rita LAURINAVIČIŪTĖ, UAB „Metida”, Gedimino pr. 45-6, LT-2600 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Tirpios CTLA4 mutanto molekulės ir jų panaudojimas

(57) Referatas:

Šiame išradime yra pateikiamos tirpios CTLA4 mutantinės molekulės, kurios su didesne surišimo geba jungiasi su CD80 ir/arba CD86 antigenu nei laukinio tipo CTLA4 arba nemutantis CTLA4lg. Tirpios CTLA4 molekulės turi pirmąją aminorūgščių seką, apimančią CTLA4 ekstraląstelinę dalį, kurioje tam tikros aminorūgščių liekanos S25-R33 srityje ir M97-G107 srityje yra mutuotos. Šio išradimo mutantinėse molekulėse taip pat gali būti antroji aminorūgščių seka, kuri padidina mutantinės molekulės tirpumą.

IŠRADIMO SRITIS

Šis išradimas yra susijęs su tirpių CTLA4 molekuliu, kurios yra mutuotos iš laukinio tipo CTLA4 taip, kad išlaikytų sugebėjimą surišti CD80 ir/arba CD86, sritimi.

IŠRADIMO KILMĖ

Nebūdingos antigenui viduląstelinės sąveikos tarp T-limfocitų ir antigenus pateikiančių ląstelių (APC) generuoja T ląstelės kostimuliacinius signalus, kurie sukelia T ląstelės atsakus į antigeną (Jenkins and Johnson (1993) *Curr. Opin. Immunol.* 5:361-367). Kostimuliaciniai signalai apsprendžia T ląstelės atsaką į antigeną laipsniškai ir tai, ar šis atsakas aktyvuoja, ar neaktyvuoja tolimesnio atsaką į antigeną (Mueller et al. (1989) *Annu. Rev. Immunol.* 7:445-480).

T ląstelės aktyvacija nesant kostimuliacijos duoda nutrauktą arba anerginį T ląstelės atsaką (Schwartz, R.H. (1992) *Cell* 71:1065-1068). Vienas iš esminių kostimuliacinių signalų yra gaunamas sąveikaujant T ląstelės paviršiaus receptoriui CD28 su B7 giminingoms molekulėms ant antigenus pateikiančių ląstelių (pvz. taip pat žinomomis kaip B7-1 ir B7-2 arba atitinkamai CD80 ir CD86) (P. Linsley and J. Ledbetter (1993) *Annu. Rev. Immunol.* 11:191-212).

Molekulė, dabar žinoma kaip CD80 (B7-1), iš pradžių buvo aprašyta kaip su žmogaus B-ląstelėmis susijusios aktyvacijos antigenas (Yokoch, T. et al. (1981) *J. Immunol.* 128:823-827; Freeman, G.J. et al. (1989) *J. Immunol.* 143:2714-2722), ir po to identifikuota kaip priešreceptoris giminingoms T ląstelės molekulėms CD28 ir CTLA4 (Linsley, P., et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:5031-5035; Linsley, P.S. et al. (1991a) *J. Exp. Med.* 173:721-730; Linsley, P.S. et al. (1991b) *J. Exp. Med.* 174:561-570).

Neseniai ant antigeną pateikiančių ląstelių buvo identifikuotas kitas CTLA4 priešreceptoris (Azuma, N. et al. (1993) *Nature* 366:76-79; Freeman (1993a) *Science* 262:909-911; Freeman, G. J. et al. (1993b) *J. Exp. Med.*

178:2185-2192; Hathcock, K.L.S., et al. (1994) *J. Exp. Med.* 180:631-640; Lenscow, D.J. et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11054-11058; Ravi-Wolf, Z., et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11182-11186; Wu, Y. et al. (1993) *J. Exp. Med.* 178:1789-1793). Ši molekulė, dabar žinoma kaip CD86 (Caux, C. et al. (1994) *J. Exp. Med.* 180:1841-1848), bet taip pat dar vadinama B7-0 (Azuma et al., (1993), supra) arba B7-2 (Freeman et al., (1993a) supra), turi apie 25 % sekos identiškumą su CD80 jos ekstraląstelinėje dalyje (Azuma et al., (1993), supra; Freeman et al., (1993a) supra; (1993b), supra). CD-86 transfekuotos ląstelės sukelia CD-28 tarpininkaujamus T ląstelių atsakus (Azuma et al., (1993), supra; Freeman et al., (1993a) supra; (1993b), supra).

Kelių tyrimų tikslas buvo CD80 ir CD86 ekspresijos palyginimas (Azuma et al., (1993), supra; Hathcock et al., (1994) supra; Larsen, C.P., et al. (1994), *J. Immunol.* 152:5208-5219; Stack, R.M., et al., (1994) *J. Immunol.* 152:5723-5733). Dabartiniai duomenys rodo, kad CD80 ir CD86 ekspresija yra reguliuojama skirtingai, ir duoda pagrindo manyti, kad CD86 ekspresija yra linkusi pralengti CD80 ekspresiją imuninio atsako metu.

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 riša ir CD80-teigiamas, ir CD86-teigiamas ląsteles stipriau nei CD28Ig (Linsley, P. et al. (1994) *Immunity* 1:793-80). 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).

Peach et al., (*J. Exp. Med.* (1994) 180:2049-2058) identifiko sritis CTLA4 ekstraląstelinėje srityje, kurios yra svarbios stipriam surišimui su CD80. Konkrečiau, buvo identifikuota, kad heksapeptidinis gabalas (MYPPPY) komplementarumą apsprendžiančioje srityje 3 (panašioje į CDR3 sritį) yra pilnai išsilaikęs visuose CD28 ir CTLA4 šeimos nariuose. Alanino skanavimo mutagenėzė per MYPPPY gabalą CTLA4 molekulėje ir pasirinktose CD28Ig liekanose sumažino arba panaikino susirišimą su CD80.

Taip pat buvo sukonstruotos chimerinės molekulės, tarpusavyje sukeičiant CTLA4 ir CD28 homologines sritis. HS4, HS4-A ir HS4-B molekulės buvo sukonstruotos implantuojant CTLA4 molekulės panašias į CDR-3 sritis, į kurias taip pat įėjo karboksi-galo dalis, išplėsta taip, kad įeitų nekonservatyvios aminorūgščių liekanos CD28Ig. Šie homologiniai mutantai rodė didesnį polinkį susirišti su CD80, nei CD28Ig.

Kitoje chimerinių homologinių mutantų grupėje CTLA4 molekulės panaši į CDR1 sritis, kuri nėra išlaikyta CD28 ir manoma, kad erdviškai ji yra greta panašios į CDR3 sritį, buvo implantuota į HS4 ir HS4-A. Šios chimerinės homologinių mutantų molekulės (pavadintos HS7 ir HS8) parodė dar didesnį polinkį susirišti su CD80, nei CD28Ig.

Taip pat buvo sukurtos homologinės mutantinės molekulės, implantuojant į HS7 ir HS8 CTLA4 molekulės panašią į CDR1 sritį, bet šis derinys toliau nebeįtako polinkio susirišti su CD80. Taigi, buvo nustatyta, kad CTLA4 ir CD28 MYPPPY gabalas yra ypatingai svarbus susirišimui su CD80, bet kai kurios nekonservatyviųjų aminorūgščių liekanos CTLA4 molekulės panašiose į CDR1 ir CDR3 srityse taip pat yra atsakingos už padidintą CTLA4 susirišimą su CD80.

Buvo parodyta, kad CTLA4Ig efektyviai blokuoja su CD80 susijusią T ląstelės kostimuliaciją, bet nėra efektyvi blokuojant su CD86 susijusius atsakus. Buvo sukonstruotos tirpios CTLA4 mutantinės molekulės, ypatingai tokios, kurios turi didesnį polinkį į CD86, nei laukinio tipo CTLA4, galinčios geriau blokuoti antigenui specifinių aktyvuotų ląstelių atsiradimą nei CTLA4Ig.

Vis tik išlieka pagerintų CTLA4 molekulių, nei iki šiol žinomos tirpios CTLA4 formos, poreikis, kad būtų galima pateikti geresnes farmacinės kompozicijas imuniniam slopinimui ir vėžio gydymui.

IŠRADIMO SANTRAUKA

Tokiu būdu šiame išradime yra pateikiamos tirpios CTLA4 mutantinės molekulės, kurios suriša CD80 ir/arba CD86. Mutantinės šio išradimo molekulės apima tokias molekules, kurios gali atpažinti ir surišti arba CD86, arba CD86, arba abi šias molekules. Kai kuriuose įgyvendinimo variantuose mutantinės molekulės suriša CD80 ir/arba CD86 su didesne surišimo geba nei CTLA4Ig.

Vienas CTLA4 mutantinės molekulės pavyzdys yra čia aprašyta L104EA29YIg (fig.7). Kitas CTLA4 mutantinės molekulės pavyzdys yra čia aprašyta L104EIg (fig.8). L104EA29YIg ir L104EIg geriau suriša CD80 ir CD86 nei CTLA4Ig.

TRUMPAS FIGŪRŲ APRAŠYMAS

Fig.1 rodo L104EA29YIg, L104EIg ir laukinio tipo CTLA4Ig pusiausvyrinę surišimo su CD86Ig analizę.

Fig.2A ir 2B iliustruoja FACS testų duomenis, rodančius L104EA29YIg, L104EIg ir CTLA4Ig susirišimą su žmogaus CD80- arba CD86-transfekuotomis CHO ląstelėmis, kaip aprašyta 2 pavyzdyje toliau.

Fig.3A ir 3B vaizduoja CD80-teigiamų ir CD86-teigiamų CHO ląstelių proliferaciją, kaip aprašyta 2 pavyzdyje toliau.

Fig.4A ir 4B rodo, kad L104EA29YIg efektyviau inhibuoja pirminių ir antrinių alostimuliuotų T ląstelių proliferaciją nei CTLA4Ig, kaip aprašyta 2 pavyzdyje toliau.

Fig.5A-C iliustruoja, kad L104EA29YIg efektyviau inhibuoja alostimuliuotų žmogaus T ląstelių IL-2 (Fig.5A), IL-4 (Fig.5B) ir γ -interferono (Fig.5C) citokinų produkciją, nei CTLA4Ig, kaip aprašyta 2 pavyzdyje toliau.

Fig.6 rodo, kad L104EA29YIg efektyviau inhibuoja beždžionių fitohemaglutinino (PHA) stimuliuotų T ląstelių proliferaciją nei CTLA4Ig, kaip aprašyta 2 pavyzdyje toliau.

Fig.7 vaizduoja CTLA4 mutantinės molekulės (L104EA29Ig) nukleotidų ir aminorūgščių seką, apimančią signalinį peptidą; mutuotą CTLA4 ekstraląstelinę sritį, pradedant nuo metionino +1 padėtyje ir baigiant asparto rūgštimi +124 padėtyje arba pradedant nuo alanino -1 padėtyje ir baigiant asparto rūgštimi +124 padėtyje, ir Ig sritį, kaip aprašyta 1 pavyzdyje toliau.

Fig.8 vaizduoja CTLA4 mutantinės molekulės (L104EIg) nukleotidų ir aminorūgščių seką, apimančią signalinį peptidą; mutuotą CTLA4 ekstraląstelinę sritį, pradedant nuo metionino +1 padėtyje ir baigiant asparto rūgštimi +124 padėtyje arba pradedant nuo alanino -1 padėtyje ir baigiant asparto rūgštimi +124 padėtyje, ir Ig sritį, kaip aprašyta 1 pavyzdyje toliau.

Fig.9 vaizduoja CTLA4Ig, nukleotidų ir aminorūgščių seką, turinčią signalinį peptidą, laukinio tipo CTLA4 ekstraląstelinės srities aminorūgščių seką, pradedant nuo metionino +1 padėtyje iki asparto rūgšties +124 padėtyje arba pradedant nuo alanino -1 padėtyje iki asparto rūgšties +124 padėtyje, ir Ig sritį.

Fig.10A-C yra SDS gelio (Fig.10A) CTLA4Ig (1 juostelė), L104EIg (2 juostelė) ir L104EA29YIg (3A juostelė); bei CTLA4Ig (Fig.10B) ir L104EA29YIg (Fig.10C) molekulinų sietų chromatogramos.

Fig.11A ir 11B iliustruoja CTLA4 ekstraląstelinio Ig V-tipo klosčių juostinę diagramą, gautą iš tirpalo struktūros, nustatytos BMR spektroskopijos metodu. Fig.11B rodo S25-R33 srities ir MYPPPY srities padidintą vaizdą, nurodant surišimo gebą padidinančių mutacijų (L104 ir A29) padėtį ir šoninės grandinės orientaciją.

Fig.12 pavaizduota vektoriaus pILN-LEA29Y, turinčio L104EA29YIg intarpą, scheminė diagrama.

SMULKUS IŠRADIMO APRAŠYMAS

APIBRĖŽIMAI

Šioje paraiškoje naudojami žodžiai arba frazės turi toliau nurodytas reikšmes.

Čia naudojamas "laukinio tipo CTLA4" turi gamtinę aminorūgščių seką, pilno ilgio CTLA4 (JAV patentai Nr.Nr. 5434131, 5844095, 5851795) arba

ekstraląstelinę jos dalį, kuri rišasi su CD80 ir/arba CD86, ir/arba trukdo CD80 ir/arba CD86 susirišti su jų ligandais. 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 tiksliniais antigenais, tokiais kaip CD80 ir CD86. 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. Į subrendusią CTLA4 molekulės formą įeina ekstraląstelinė CTLA4 dalis arba bet koks jos gabalas, kuris rišasi su CD80 ir/arba CD86.

“CTLA4lg” yra tirpus sulietas baltymas, turintis laukinio tipo CTLA4 ekstraląstelinę dalį arba jos gabalą, kurie rišasi su CD80 ir/arba CD86, prijungtą prie lg uodegos. Ypatingas įgyvendinimo variantas turi laukinio tipo CTLA4 ekstraląstelinę dalį, prasidedančią nuo metionino +1 padėtyje ir besibaigiančią asparto rūgštimi +124 padėtyje arba prasidedančią nuo alanino -1 padėtyje ir besibaigiančią asparto rūgštimi +124 padėtyje; jungiančią aminorūgšties liekaną glutaminą +125 padėtyje; ir imunoglobulino dalį, apimančią nuo glutamo rūgšties +126 padėtyje iki lizino +357 padėtyje (Fig.9).

Čia naudojamas terminas “sulietas baltymas” yra apibrėžiamas kaip viena arba daugiau aminorūgščių sekų, sujungtų kartu, naudojant specialistams gerai žinomus metodus, kaip aprašyta JAV patentuose Nr.5434131 arba 5637481. Tokiu būdu sujungtos aminorūgščių sekos sudaro sulietą baltymą.

Čia naudojamas terminas “CTLA4 mutantinė molekulė” reiškia molekulę, kuri gali būti pilno ilgio CTLA4 arba jos dalys (dariniai arba

fragmentai), kurie turi mutaciją arba daug mutacijų CTLA4 (geriausia CTLA4 ekstraląstelinėje dalyje), ir ji yra panaši į laukinio tipo CTLA4 molekulę, bet jau nebeidentiška jai. CTLA4 mutantinės molekulės riša arba CD80, arba CD86, arba abi šias molekules. Į mutantines CTLA4 molekules gali įeiti biologiškai arba chemiškai aktyvi ne-CTLA4 molekulė, arba jos gali būti prijungtos prie tokios molekulės. Mutantinės molekulės gali būti tirpios (t.y. cirkuliuojančios) arba prijungtos prie paviršiaus. CTLA4 mutantinės molekulės gali būti pagaminamos sintezės arba rekombinantiniu būdu.

Čia naudojamas terminas "mutacija" reiškia nukleotidų arba aminorūgščių pakeitimą laukinio tipo polipeptido sekoje. Šiuo atveju tai yra pakeitimas laukinio tipo CTLA4 ekstraląstelinėje dalyje. Šis pakeitimas gali būti aminorūgšties pakeitimas, kuris apima pakeitimus, delecijas, pridėjimus arba nukirpimus. Mutantinė molekulė gali turėti vieną arba daugiau mutacijų. Mutacijos nukleotidų sekoje gali duoti arba gali ir neduoti mutacijų 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 arginą (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

Čia naudojamas terminas "ekstraląstelinė CTLA4 dalis" reiškia CTLA4 dalį, kuri atpažįsta ir suriša CD80 ir/arba CD86. Pavyzdžiui, ekstraląstelinė CTLA4 dalis apima nuo metionino +1 padėtyje iki asparto rūgšties +124 padėtyje (fig.9). Kitu atveju, ekstraląstelinė CTLA4 dalis apima nuo alanino -1 padėtyje iki asparto rūgšties +124 padėtyje (fig.9). Ekstraląstelinė dalis apima CTLA4 fragmentus arba darinius, kurie suriša CD80 ir/arba CD86.

Čia naudojami terminai "ne-CTLA4 baltymo seka" arba "ne-CTLA4 molekulė" yra apibūdinamas kaip bet kokia molekulė, kuri nesurįša CD80 ir/arba CD86 ir netrukdo CTLA4 susiristi 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. 5637481 ir 6132992),

Čia naudojamas "CTLA4 mutantinės molekulės fragmentas" yra CTLA4 mutantinės molekulės dalis, geriau ekstraląstelinė CTLA4 dalis arba jos gabalas, kurie atpažįsta ir jungiasi su jos taikiniu, pvz. CD80 ir/arba CD86.

Čia naudojamas "CTLA4 mutantinės molekulės darinys" yra molekulė, kuri turi bent 70 % sekos panašumą su CTLA4 ekstraląsteline dalimi ir veikia panašiai į ją, t.y. ji atpažįsta ir rišasi su CD80 ir/arba CD86.

Čia naudojama "CTLA4 molekulės dalis" apima CTLA4 molekulės fragmentus ir darinius, kurie rišasi su CD80 ir/arba CD86.

Norint, kad čia aprašytas išradimas būtų geriau suprantamas, toliau duodamas toks aprašymas:

IŠRADIMO KOMPOZICIJOS

Šiame išradime yra pateikiamos tirpios CTLA4 mutantinės molekulės, kurios atpažįsta ir rišasi su CD80 ir/arba CD86. Kai kuriuose įgyvendinimo

variantuose tirpūs CTLA4 mutantai turi didesnį polinkį susiristi su CD80 ir/arba CD86, nei CTLA4Ig.

CTLA4 mutantinių molekulių pavyzdžiais yra L104EA29YIg (fig.7). L104EA29YIg aminorūgščių seka gali prasidėti nuo alanino -1 aminorūgščių padėtyje ir baigtis lizinu +357 aminorūgščių padėtyje. Kitu atveju, L104EA29YIg aminorūgščių seka gali prasidėti nuo metionino +1 aminorūgščių padėtyje ir baigtis lizinu +357 aminorūgščių padėtyje. L104EA29YIg'o CTLA4 dalis apima nuo metionino +1 aminorūgščių padėtyje iki asparto rūgšties +124 aminorūgščių padėtyje. L104EA29YIg turi jungiančią aminorūgšties liekaną glutaminą +125 padėtyje ir imunoglobulino dalį, apimančią nuo glutamo rūgšties +126 padėtyje iki lizino +357 padėtyje (fig.7). L104EA29YIg rišasi maždaug du kartus didesne geba nei laukinio tipo CTLA4Ig (toliau vadinamas CTLA4Ig) su CD80 ir maždaug 4 kartus didesne geba su CD86. Šis stipresnis surišimas duoda tai, kad L104EA29YIg daug efektyviau blokuoja imuninius atsakus nei CTLA4Ig.

CTLA4 mutantinės molekulės turi bent jau ekstraląstelinę CTLA4 dalį arba jos gabalus, kurie rišasi su CD80 ir/arba CD86. CTLA4 mutantinės molekulės ekstraląstelinė dalis turi aminorūgščių seka, prasidedančią nuo metionino +1 padėtyje ir besitęsiančią iki asparto rūgšties +124 padėtyje (fig.7 arba 8). Kitu atveju, CTLA4 mutantinės molekulės ekstraląstelinė dalis gali turėti aminorūgščių seka, prasidedančią nuo alanino -1 padėtyje ir besitęsiančią iki asparto rūgšties +124 padėtyje (fig.7 ir 8).

Viename įgyvendinimo variante tirpi CTLA4 mutantinė molekulė yra sulietas baltymas, apimantis CTLA4 ekstraląstelinę dalį, turinčią vieną arba daugiau mutacijų aminorūgščių sekoje, prasidedančioje nuo serino +25 padėtyje ir besibaigiančioje argininu +33 padėtyje (S25-R33). Pavyzdžiui, laukinio tipo CTLA4 +29 padėtyje esantis alaninas gali būti pakeistas leucinu (kodonai: UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG), fenilalaninu (kodonai: UUU, UUC), triptofanu (kodonas: UGG) arba treoninu (kodonai: ACU, ACC, ACA, ACG). Specialistai nesunkiai supras, kad uracilas (U) RNR nukleotidų sekoje atitinka timiną (T) DNR nukleotidų sekoje.

Kitame įgyvendinimo variante tirpi CTLA4 mutantinė molekulė yra sulietas baltymas, apimantis CTLA4 ekstraląstelinę dalį, turinčią vieną arba daugiau mutacijų aminorūgščių sekoje arba netoli jos, prasidedančioje nuo

metionino +97 padėtyje ir besibaigiančioje glicinu +107 padėtyje (M97-G107). Pavyzdžiui, laukinio tipo CTLA4 +104 padėtyje esantis leucinas gali būti pakeistas glutamo rūgštimi (kodonai: GAA, GAG). Šį pakeitimą turinti CTLA4 mutantinė molekulė čia vadinama L104Elg (fig.8).

Dar kitame įgyvendinimo variante tirpi CTLA4 mutantinė molekulė yra sulietas baltymas, apimantis CTLA4 ekstraląstelinę dalį, turinčią vieną arba daugiau mutacijų S25-R33 ir M97-G107 srityse. Pavyzdžiui, viename įgyvendinimo variante CTLA4 mutantinė molekulė turi tiroziną +29 padėtyje vietoj alanino ir glutamo rūgštį +104 padėtyje vietoj leucino. Šiuos pakeitimus turinti CTLA4 mutantinė molekulė čia vadinama L104EA29Ylg (fig.7). Nukleorūgšties molekulė, kuri koduoja L104EA29Ylg, yra laikoma pD16L104EA29Ylg ir buvo deponuota 2000 m. birželio 19 d. Amerikos tipinių kultūrų kolekcijoje (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 (ATCC Nr. PTA-2104). Šis pD16L104EA29Ylg vektorius yra pcDNA3 vektoriaus (INVITROGEN) darinys.

Išradime taip pat yra pateikiama tirpi CTLA4 mutantinė molekulė, turinti CTLA4 mutanto ekstraląstelinę dalį, parodytą fig.7 arba 8, arba jos dalį(-is) ir liekaną, kuri keičia CTLA4 mutantinės molekulės tirpumą, afiniškumą ir/arba valentingumą.

Pagal šio išradimo praktiką, ši liekana gali būti imunoglobulino pastovioji sritis arba jos dalis. Naudojimui *in vivo* pageidautina, kad imunoglobulino pastovioji sritis nesukeltų žalingo imuninio atsako subjekte. Pavyzdžiui, klinikiniam naudojimui būtų pageidautina, kad mutantinės molekulės turėtų žmogaus arba beždžionės imunoglobulino pastoviąsias sritis. Vienas tinkamos imunoglobulino srities pavyzdys yra žmogaus C(gama)1, apimantis šarnyrą, CH2 ir CH3 sritis. Yra galimi ir kiti izotipai. Be to, yra galimos kitos imunoglobulino pastoviosios sritys (geriau kitos silpnai imunogeninės arba neimunogeninės imunoglobulino pastoviosios sritys).

Kitos liekanos yra polipeptidiniai tag. Tinkamų tag pavyzdžiais yra, bet jais neapsiribojama, p97 molekulė, env gp120 molekulė, E7 molekulė ir ova molekulė (Dash, B., et al. (1994) *J. Gen. Virol.* 75:1389-97; Ikeda, T., et al. (1994) *Gene* 138:193-6; Falk, K., et al. (1993) *Cell Immunol.* 150:447-52; Fujisaka, K. et al. (1994) *Virology* 204:789-93). Tag'ais gali būti naudojamos ir kitos molekulės (Gerard, C. et al. (1994) *Neuroscience* 62:721-739; Bym, R.

et al. *J. Virol.* (1989) 63:4370-4375; Smith, D. et al., (1987) *Science* 238:1704-1707; Lasky, L., (1996) *Science* 233:209-212).

Šiame išradime taip pat yra pateikiami tirpūs mutantiniai CTLA4Ig sulieti baltymai, pageidautina stipriau reaguojantys su CD80 ir/arba CD86 antigenais, nei laukinio tipo CTLA4. Vienas pavyzdys yra L104EA29YIg, parodytas fig.7.

Kitame įgyvendinimo variante tirpi CTLA4 mutantinė molekulė turi jungiančią aminorūgšties liekaną, kuri yra tarp CTLA4 dalies ir imunoglobulino dalies. Jungiančia aminorūgštimi gali būti bet kuri aminorūgštis, įskaitant glutaminą. Jungianti aminorūgštis gali būti įvesta specialistams žinomais molekulinės arba cheminės sintezės būdais.

Kitame įgyvendinimo variante tirpi CTLA4 mutantinė molekulė turi imunoglobulino dalį (pvz. šarnyrą, CH2 ir CH3 dalis), kur bet kuri arba visos cisteino liekanos imunoglobulino dalies šarnyre yra pakeistos serinu, pavyzdžiui cisteinai +130, +136 arba +139 padėtyse (fig. 7 arba 8). Šioje mutantinėje molekulėje prolinas +148 padėtyje taip pat gali būti pakeistas serinu, kaip parodyta fig.7 arba 8.

Tirpioje CTLA4 mutantinėje molekulėje gali būti signalinio peptido seka, prijungta 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.

Mutantinė 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 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.

Šio išradimo tirpios CTLA4 mutantinės molekulės gali būti gautos molekuliniiais arba cheminės sintezės metodais. Molekuliniai metodai gali apimti tokias stadijas: nukleorūgšties molekulės, kuri ekspresuoja ir koduoja tirpią CTLA4 mutantinę molekulę, įvedimą į tinkamo šeimininko ląstelę; taip transformuotos šeimininko ląstelės auginimą sąlygose, kurios leidžia šeimininko ląstelei ekspresuoti mutantines molekules; ir ekspresuotų mutantinių molekulių išskyrimą. Mutantinės molekulės signalinio peptido dalis suteikia galimybę šeimininko ląstelei ekspresuoti baltymo molekules ant ląstelės paviršiaus ir jas sekretuoti. Transliuotos mutantinės molekulės gali patirti potransliacinę modifikaciją, kurioje yra atskeliamas signalinis peptidas ir gaunamas subrendęs baltymas, turintis CTLA4 ir imunoglobulino dalis. Gali būti skaldoma po -1 padėtyje esančio alanino, gaunant subrendusią mutantinę molekulę, kaip pirmąją aminorūgštį turinčią metioniną +1 padėtyje (fig.7 arba 8). Kitu atveju, gali būti skaldoma po -2 padėtyje esančio metionino, gaunant subrendusią mutantinę molekulę, kaip pirmąją aminorūgštį turinčią alaniną -1 padėtyje.

Tinkamiausias įgyvendinimo variantas yra tirpi CTLA4 mutantinė molekulė, turinti žmogaus CTLA4 ekstraląstelinę dalį, sujungtą su visa arba dalimi žmogaus imunoglobulino molekulės (pvz. šarnyru, CH2 ir CH3). Ši tinkamiausia molekulė apima tirpios molekulės CTLA4 dalį, apimančią aminorūgščių seką nuo metionino +1 padėtyje iki asparto rūgšties +124 padėtyje, jungiančią aminorūgšties liekaną glutaminą +125 padėtyje ir imunoglobulino dalį, apimančią nuo glutamo rūgšties +126 padėtyje iki lizino +357 padėtyje. Dalis, turinti CTLA4 ekstraląstelinę dalį, yra mutuota taip, kad +29 padėtyje esantis alaninas yra pakeistas tirozinu, o +104 padėtyje esantis leucinas yra pakeistas glutamo rūgštimi. Gali būti mutuota mutantinės molekulės imunoglobulino dalis taip, kad +130, +136 ir +139 padėtyse esantys cisteinai yra pakeisti serinu, o +148 padėtyje esantis prolinas yra pakeistas serinu. Ši mutantinė molekulė čia yra pavadinta L104EA29Ylg (fig.7).

Kitas L104EA29Ylg įgyvendinimo variantas yra mutantinė molekulė, turinti aminorūgščių seką nuo alanino -1 padėtyje iki asparto rūgšties +124 padėtyje, jungiančią aminorūgšties liekaną glutaminą +125 padėtyje ir imunoglobulino dalį, apimančią nuo glutamo rūgšties +126 padėtyje (pvz., nuo

+126 iki lizino +357 padėtyje). Dalis, turinti CTLA4 ekstraląstelinę dalį, yra mutuota taip, kad +29 padėtyje esantis alaninas yra pakeistas tirozinu, o +104 padėtyje esantis leucinas yra pakeistas glutamo rūgštimi. Mutantinės molekulės imunoglobulino dalis yra mutuota taip, kad +130, +136 ir +139 padėtyse esantys cisteinai yra pakeisti serinu, o +148 padėtyje esantis prolinas yra pakeistas serinu. Ši mutantinė molekulė čia yra pavadinta L104EA29Ylg (fig.7). Atskėlus signalinę seką, L104EA29Ylg gali prasidėti arba metioninu +1 padėtyje, arba alaninu -1 padėtyje.

Kita šio išradimo mutantinė molekulė yra tirpi CTLA4 mutantinė molekulė, turinti žmogaus CTLA4 ekstraląstelinę dalį, sujungtą su žmogaus imunoglobulino molekule (pvz. šarnyru, CH2 ir CH3). Ši molekulė apima dalį CTLA4 aminorūgščių sekos, pradedant nuo metionino +1 padėtyje iki asparto rūgšties +124 padėtyje, jungiančiosios aminorūgšties liekaną glutaminą +125 padėtyje ir imunoglobulino dalį, apimančią aminorūgščių seką nuo glutamo rūgšties +126 padėtyje iki lizino +357 padėtyje. Dalis, turinti CTLA4 ekstraląstelinę dalį, yra mutuota taip, kad +104 padėtyje esantis leucinas yra pakeistas glutamo rūgštimi. Mutantinės molekulės šarnyro dalis yra mutuota taip, kad +130, +136 ir +139 padėtyse esantys cisteinai yra pakeisti serinu, o +148 padėtyje esantis prolinas yra pakeistas serinu. Ši mutantinė molekulė čia yra pavadinta L104Elg (fig.8).

Kitu atveju, L104Elg įgyvendinimo variantas yra tirpi CTLA4 mutantinė molekulė, turinti žmogaus CTLA4 ekstraląstelinę dalį, sujungtą su žmogaus imunoglobulino molekule (pvz. šarnyru, CH2 ir CH3). Tinkamiausia molekulė apima CTLA4 dalį apimančią aminorūgščių seką, prasidedančią nuo alanino -1 padėtyje iki asparto rūgšties +124 padėtyje, jungiančiąją aminorūgšties liekaną glutaminą +125 padėtyje ir imunoglobulino dalį, apimančią nuo glutamo rūgšties +126 padėtyje iki lizino +357 padėtyje. Dalis, turinti CTLA4 ekstraląstelinę dalį, yra mutuota taip, kad +104 padėtyje esantis leucinas yra pakeistas glutamo rūgštimi. Mutantinės molekulės šarnyro dalis yra mutuota taip, kad +130, +136 ir +139 padėtyse esantys cisteinai yra pakeisti serinu, o +148 padėtyje esantis prolinas yra pakeistas serinu. Ši mutantinė molekulė čia yra pavadinta L104Elg (fig.8).

Be to, šiame išradime yra pateikiama tirpi CTLA4 mutantinė molekulė, turinti: (a) membraninio gliukoproteino, pvz., CD28, CD86, CD80, CG40 ir

gp39, kuris blokuoja T ląstelių proliferaciją, aminorūgščių seką, sulietą su antrąja aminorūgščių seka; (b) antrąją aminorūgščių seką, kuri yra mutantinės CTLA4 ekstraląstelinės dalies fragmentas, blokuojantis T ląstelių proliferaciją, tokią kaip, pavyzdžiui, aminorūgšties molekulė nuo metionino +1 padėtyje iki asparto rūgšties +124 padėtyje (fig.7 arba 8); ir (c) trečiąją aminorūgščių seką, kuri veikia kaip identifikacinis tag arba didina molekulės tirpumą. Pavyzdžiui, trečioji aminorūgščių seka gali susidėti iš neimunogeninio imunoglobulino molekulės šarnyro, CH2 ir CH3 sričių aminorūgščių sekos. Tinkamų imunoglobulino molekulių pavyzdžiais yra, bet jais neapsiribojama, žmogaus arba beždžionės imunoglobulinas, pvz. C(gama)1. Taip pat yra galimi ir kiti izotipai.

Šiame išradime taip pat yra pateikiamos nukleorūgščių molekulės, turinčios nukleotidų sekas, koduojančias aminorūgščių sekas, atitinkančias tirpias šios išradimo mutantines molekules. Vienaime įgyvendinimo variante nukleorūgšties molekulė yra DNR (pvz. kDNR) arba jos hibridas. Kitu atveju, nukleorūgšties molekulė yra RNR arba jos hibridai.

Be to, šiame išradime yra pateikiamas vektorius, kuriame yra šio išradimo nukleotidų sekos. Taip pat yra pateikiama šeimininko vektoriaus sistema. Ši šeimininko vektoriaus sistema apima šio išradimo vektorių tinkamoje šeimininko ląstelėje. Tinkamų šeimininko ląstelių pavyzdžiais yra, bet jais neapsiribojama, prokariotinės ir eukariotinės ląstelės.

Šis išradimas apima farmacinės kompozicijas imuninės sistemos ligų gydymui, turinčias farmaciškai efektyvius kiekius tirpių CTLA4 mutantinių molekulių. Kai kuriuose įgyvendinimo variantuose imuninės sistemos ligos yra tarpininkaujamos CD28- ir/arba CTLA4-teigiamų ląstelių sąveikų su CD80- ir/arba CD86-teigiamomis ląstelėmis. Geriau, kad tirpios CTLA4 mutantinės molekulės būtų CTLA4 molekulės, turinčios vieną arba daugiau mutacijų ekstraląstelinėje CTLA4 dalyje. Farmacinėse kompozicijose gali būti tirpios CTLA4 mutantinio baltymo molekulės ir/arba nukleorūgščių molekulės, ir/arba šias molekulės koduojantys vektoriai. Tinkamiausiuose įgyvendinimo variantuose tirpios CTLA4 mutantinės molekulės turi CTLA4 ekstraląstelinės dalies aminorūgščių seką, parodytą fig.7 arba 8 (atitinkamai L104EA29Y arba L104E). Dar tinkamesnė tirpi CTLA4 mutantinė molekulė yra čia aprašyta L104EA29Ylg. Kompozicijose taip pat gali būti ir kitų terapinių agentų,

įskaitant, bet neapsiribojant, vaistinius toksinus, fermentus, antikūnus arba konjugatus.

Pageidautina, kad į farmacinės kompozicijas taip pat įeitų tinkami nešikliai ir adjuvantai, kurie yra bet kokia medžiaga, kuri sumaišyta su šio išradimo molekule (pvz. tirpia CTLA4 mutantine molekule, tokia kaip L104EA29Y arba L140E) išlaiko šios molekulės aktyvumą ir neveikia subjekto imuninės sistemos. Tinkamų nešiklių ir adjuvantų pavyzdžiais yra, bet jais neapsiribojama, žmogaus serumo albuminas, jonitai, aliuminio oksidas, lecitinas, buferinės medžiagos, tokios kaip fosfatai, glicinas, sorbo rūgštis, kalio sorbatas ir druskos arba elektrolitai, tokie kaip protamino sulfatas. Kitais pavyzdžiais yra bet kuris iš standartinių farmacinių nešiklių, kaip antai fosfatinio buferio ir druskos tirpalas, vanduo, emulsijos, tokios kaip alyvos vandenyje emulsija, ir įvairaus tipo drėkinimo agentai. 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, tam tikros rūšies molio, želatinos, stearino rūgšties arba jos druskų, magnio arba kalcio stearato, talko, augalinių riebalų arba aliejų, saku, 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.

Šio išradimo farmacinės kompozicijos gali būti įvedamos naudojant įprastus vartojimo būdus, įskaitant, bet neapsiribojant, intraveninį (i.v.) vartojimą, intraperitoninį (i.p.) vartojimą, intraraumeninį (i.m.) vartojimą, poodinį vartojimą, peroralinį vartojimą, vartojimą žvakučių pavidalu arba vietinio kontakto būdu, arba subjektui implantuojant lėto išskyrimo įtaisą, tokį kaip miniosmozinis siurblys.

Šio išradimo farmacinės kompozicijos gali būti įvairiausių dozuotų formų, kurios apima, bet neapsiribojama, skystus tirpalus arba suspensijas, tabletes, piliules, miltelius, žvakutes, polimerines mikrokapsules arba mikropūsleles, liposomas ir tirpalus injekcijoms arba infuzijai, pavidalu. Tinkamiausios formos priklauso nuo vartojimo būdo ir terapinio pritaikymo.

Efektyviausias vartojimo būdas ir dozių režimas priklauso nuo ligos sunkumo ir eigos, paciento sveikatos ir atsako į gydymą ir nuo gydančiojo gydytojo sprendimo. Taigi, kompozicijų dozės turi būti nutitruotos konkrečiam pacientui.

Subjektui gali būti skiriama toks tirpios CTLA4 mutantinės molekulės kiekis ir tokį laiką (pvz. tam tikrą laiko tarpą arba keletą kartų), kad jo pakaktų blokuoti subjekto endogeninių B7 (pvz. CD80 ir/arba CD86) molekulių susirišimą su jų atitinkamais ligandais. Endogeninio B7/ligando blokavimas tuo pačiu inhibuoja B7-teigiamų ląstelių (pvz., CD80- ir/arba CD86-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. Šio išradimo farmacinės kompozicijos gali būti vartojamos įvairų laiką. Vienaime įgyvendinimo variante šio išradimo farmacinės kompozicijos gali būti vartojamos vieną arba daugiau valandų. Be to, vartojimas gali būti pakartotas priklausomai nuo ligos sunkumo bei kitų faktorių, kas yra suprantama specialistams.

Šiame išradime taip pat yra pateikiami būdai gauti baltymui, apimantys šio išradimo vektoriaus sistemos auginimą, kad šeimininke būtų gaminamas baltymas, ir taip pagaminto baltymo išgavimą.

Be to, šiame išradime yra pateikiami funkciniai CTLA4- ir CD28-teigiamų T ląstelių sąveikų su CD80- ir/arba CD86-teigiamomis ląstelėmis reguliavimo būdai. Šie būdai apima CD80- ir/arba CD86-teigiamų ląstelių sąlytį su šio išradimo tirpia CTLA4 mutantine molekule, kad susidarytų mutantinės CTLA4/CD80 ir/arba mutantinės CTLA4/CD86 kompleksai, kurie trukdo endogeninio CTLA4 antigeno reakciją su CD80 ir/arba CD86, ir/arba kompleksai, trukdantys endogeninio CD28 antigeno reakciją su CD80 ir/arba CD86. Vienaime šio išradimo įgyvendinimo variante tirpi CTLA4 mutantinė molekulė yra sulietas baltymas, kuriame yra bent jau mutantinės CTLA4 ekstraląstelinė dalis. Kitame įgyvendinimo variante tirpi CTLA4 mutantinė

molekulė turi: pirmąją aminorūgščių seką, į kurią įeina CTLA4 ekstraląstelinė dalis, susidedanti iš aminorūgščių sekos nuo metionino +1 padėtyje iki asparto rūgšties +124 padėtyje su viena mutacija; ir antrąją aminorūgščių seką, į kurią įeina žmogaus imunoglobulino gama 1 molekulės šarnyras, CH2 ir CH3 sritys (fig.7 arba 8).

Pagal šio išradimo praktiką CD80- arba CD86-teigiamos ląstelės yra leidžiamos į kontaktą su šio išradimo tirpių CTLA4 mutantinių molekulių fragmentais arba dariniais. Kitu atveju, tirpi CTLA4 mutantinė molekulė yra CD28Ig/CTLA4Ig sulietas baltymas, turintis pirmąją aminorūgščių seką, atitinkančią dalį CD28 receptoriaus ekstraląstelinės dalies, sulietą su antrąja aminorūgščių seka, atitinkančia dalį CTLA4 mutantinio receptoriaus ekstraląstelinės dalies, ir trečiąją aminorūgščių seką, atitinkančią žmogaus imunoglobulino C-gama-1 šarnyrą, CH2 ir CH3 sritis.

Tikimasi, kad tirpios CTLA4 mutantinės molekulės turės inhibicines savybes *in vivo*. Sąlygomis, kuriose T ląstelės/APC ląstelės sąveikos, pavyzdžiui T ląstelės/B ląstelės sąveikos, atsiranda dėl T ląstelių ir APC ląstelių kontakto, įvestų CTLA4 mutantinių molekulių susirišimas, reaguojant su CD80- ir/arba CD-86 teigiamomis ląstelėmis, gali trukdyti, t.y. inhibuoti T ląstelės/APC ląstelės sąveiką ir duoti imuninių atsakų reguliavimą.

Šiame išradime pateikiami imuninių atsakų negatyviosios moduliacijos būdai. Imuninio atsako negatyvioji moduliacija tirpiomis CTLA4 mutantinėmis 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.

Toliau šiame išradime yra pateikiami imuninės sistemos ligų gydymo būdai ir tolerancijos sukėlimas. Konkrečiuose įgyvendinimo variantuose imuninės sistemos ligose tarpininkauja CD28- ir/arba CTLA4-teigiamų ląstelių sąveikos su CD80-/CD86-teigiamomis ląstelėmis. Kitame įgyvendinimo variante yra inhibuojamos T ląstelių sąveikos. Imuninės sistemos ligos apima, bet jomis neapsiribojama, autoimunines ligas, imunoproliferacines ligas ir su implantu susijusias ligas. Šie būdai apima šio išradimo tirpios CTLA4

mutantinės molekulės skyrimą subjektui, kad būtų reguliuojama T ląstelių sąveika su CD80- ir/arba CD86-teigiamomis ląstelėmis. Kitu atveju, gali būti skiriamas CTLA4 mutatinis hibridas, turintis membraninį glikoproteiną, prijungtą prie CTLA4 mutantinės molekulės. Su implantu susijusių ligų pavyzdžiais yra implantas-prieš-šeimininką liga (GVHD) (pvz. liga, kuri gali atsirasti dėl kaulų čiulpų transplantacijos arba sukelia toleranciją), imuniniai sutrikimai, susiję su implantu 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 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.

Šiame išradime taip pat yra pateikiamas subjekto kieto organo ir/arba audinio transplantu atmetimo inhibavimo būdas, kur subjektas yra transplantuoto audinio recipientas. Paprastai audinių transplantavimo atveju persodinto gyvo audinio atmetimas prasideda atpažįstant svetimą T ląsteles, po to eina imuninis atsakas, kuris suardo persodintą audinį. Šio išradimo tirpios CTLA4 mutantinės molekulės, inhibuodamos T limfocitų proliferaciją ir/arba citokinų sekreciją, gali sumažinti audinio destruktiją, ir atsiradęs antigenui specifinių T ląstelių nejautrumas gali duoti ilgalaikę implantu toleranciją ir nebereikėti bendrojo imunoslopinimo. Be to, tirpios šio išradimo CTLA4 mutantinės molekulės gali būti vartojamos su kitais vaistais, įskaitant, bet neapsiribojant, kortikosteroidus, ciklosporiną, rapamiciną, mikofenoliatą mofetilą, azatiopriną, takrolizmą, baziliksimabą ir/arba kitus biopreparatus.

Šiame išradime taip pat yra pateikiami subjekto šeimininkas-prieš-implantą ligos inhibavimo būdai. Šie būdai apima šio išradimo tirpios CTLA4 mutantinės molekulės, vienos arba kartu su kitais papildomais ligandais, reaguojančiais su IL-2, IL-4 arba γ -interferonu, skyrimą subjektui. Pavyzdžiui, šio išradimo tirpi CTLA4 mutantinė molekulė gali būti skiriama kaulų čiulpu recipientui donorinių T ląstelių aloreaktingumui inhibuoti. Kitu atveju, donorinės T ląstelės persodinamuose kaulų čiulpuose gali būti tolerizuojamos recipiento aloantigenų atžvilgiu *ex vivo* prieš transplantaciją.

T ląstelių atsakų inhibavimas CTLA4 mutantinėmis molekulėmis taip pat gali būti naudingas gydant autoimuninius sutrikimus. Daugelis autoimuninių sutrikimų atsiranda dėl netinkamo aktyvavimo T ląstelių, kurios yra reaktingos antigenų atžvilgiu ir kurios skatina citokinų ir autoantikūnų gaminimąsi, kurie dalyvauja ligos patologijoje. Tirpios CTLA4 mutantinės molekulės įvedimas subjektui, turinčiam imuninį sutrikimą arba imliam imuniniam sutrikimui, gali apsaugoti nuo autoreaktingų T ląstelių aktyvacijos ir gali sumažinti arba pašalinti ligos simptomus. Šis būdas taip pat gali apimti skyrimą šio išradimo tirpios CTLA4 mutantinės molekulės, vienos arba kartu su kitais papildomais ligandais, reaguojančiais su IL-2, IL-4 arba γ -interferonu.

Šis išradimas taip pat apima tirpių CTLA4 mutantinių molekulių panaudojimą kartu su kitais imunodepresantais, pvz. ciklosporinu (žr. Mathiesen, in "Prolonged Survival and Vascularization of Xenografted Human Glioblastoma Cells in the Central Nervous System of Cyclosporin A-Treated Rats" (1989) *Cancer Lett.*, 44:151-156), prednizonu, azatioprinu ir metotreksatu (R. Handschumacher "Chapter 53: *Drugs Used for Immunosuppression*", p. 1264-1276). Galimi ir kiti imunodepresantai. Pavyzdžiui, gydant reumatinį artritą, tirpios CTLA4 mutantinės molekulės gali būti vartojamos kartu su vaistais, įskaitant, bet neapsiribojant, kortikosteroidus, nesteroidinius priešuždegiminius vaistus/Cox-2 inhibitorius, metotreksatą, hidroksichlorokviną, sulfazalopriną, aukso druskas, etanerceptą, infliksimabą, anakinrą, azatiopriną ir/arba kitus biopreparatus, panašius į anti-TNF. Gydant sisteminę raudonąją vilkligę, tirpios CTLA4 mutantinės molekulės gali būti vartojamos kartu su vaistais, įskaitant, bet neapsiribojant, kortikosteroidus, citoksaną, azatiopriną, hidroksichlorokviną,

mikofenoliatinį mofetilą ir/arba kitus biopreparatus. Be to, gydant išsėtinę sklerozę tirpios CTLA4 mutantinės molekulės gali būti vartojamos kartu su vaistais, įskaitant, bet neapsiribojant, kortikosteroidus, interferoną beta-1a, interferoną beta-1b, glatiramero acetatą, mitoksantrono hidrochloridą ir/arba kitus biopreparatus.

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, tirpiu CD86, tirpiu CD28, 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, antikūnais reaguojančiais su CD40, antikūnais reaguojančiais su B7, antikūnais reaguojančiais su CD28, antikūnais reaguojančiais su LFA-1, 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-2), antikūnais reaguojančiais su CTLA4, 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: L104EA29YIg ir CD80 mAb; L104EA29YIg ir CD86 mAb; L104EA29YIg, CD80 mAb ir CD86 mAb; L104EA29YIg ir gp39 mAb; L104EA29YIg ir CD40 mAb; L104EA29YIg ir

CD28 mAb; L104EA29YIg, CD80 ir CD86 mAb ir gp39 mAb; L104EA29YIg CD80 ir CD86 mAb ir CD40 mAb; ir L104EA29YIg, 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 L104EA29YIg, 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 mAbrolidu, 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; mikofenoliato 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 konkuruoja su CD40 ir jo ligandu, pvz. antikūnai prieš CD40 arba antikūnai prieš CD40-L, pvz. aukščiau minėtose indikacijose, pvz. tolerancijai sukelti.

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

Pagal aukščiau duotą aprašymą, šiame išradime yra pateikiami dar ir kitu aspektu aukščiau aprašyti būdai, apimantys terapiškai efektyvaus kiekio šio išradimo tirpių CTLA4 mutantinių molekulių, L104EA29Ylg (laisvos formos arba farmaciškai priimtinos druskos formos) ir antrosios vaistinės medžiagos, kur ši antroji vaistinė medžiaga yra imunodepresantas, imunomodulatorius arba priešuždegiminis vaistas, bendrą vartojimą, pvz. kartu arba pakaitomis, kaip nurodyta aukščiau. Taip pat yra pateikiami terapiniai deriniai, pvz. rinkinys, pvz. naudojimui bet kuriame iš aukščiau aprašytų būdų, į kurį įeina L104EA29Ylg (laisvos formos arba farmaciškai priimtinos druskos formos), skirtas naudoti kartu arba pakaitomis, su bent viena farmacine kompozicija, turinčia imunodepresanto, imunomodulatoriaus arba priešuždegiminio vaisto. Rinkinyje gali būti nurodymai apie jo vartojimą.

ŠIO IŠRADIMO MOLEKULIŲ PAGAMINIMO BŪDAI

CTLA4 mutantinės molekulės gali būti ekspresuojamos prokariotinėse ląstelėse. Dažniausiai prokariotus atstovauja įvairūs bakterijų kamieniai. 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 kamieniai.

CTLA4 mutantinės molekulės koduojančios sekos gali būti įterptos į vektorių, 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 ribosominės rišančios vietos sekomis, ir apimti tokius paprastai naudojamus promotorius, kaip beta-laktamazės (penicilinazės) 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).

Į 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, CaCl_2 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 (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.

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 vektoriumi) ir paukščių sarcoma virusas (AVS) (π LN vektoriumi). 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 nešantys 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 (Toyama 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 jie gali būti reguliuojami aplinkos stimulų 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 Ti* plazmidės, žiedinių kopūstų mozaikos virusas (CaMV) ir pomidorų auksinės mozaikos virusas (TGMV).

Bendruosius žinduolių ląstelių šeimininko sistemos transformavimo aspektus aprašė Axel (JAV patentas Nr. 4399216, 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.

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. Baltymo išgavimas gali būti vykdomas naudojant standartines baltymų gryninimo priemones, 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)).

Išradime toliau yra pateikiamos tirpios CTLA4 mutantinės molekulės, produkuotos kaip aprašyta aukščiau.

MUTAGENEZĖ CTLA4Ig KODONŲ PAGRINDU

Viename įgyvendinimo variante keletui mutacijų, kurios pagerina polinkį susiršti su CD86, CTLA4 ekstraląstelinėje dalyje identifikuoti buvo panaudota vietai specifinė mutagenezė ir nauja skryningo metodika. Šiame variante mutacijos buvo vykdomos CTLA4 ekstraląstelinės dalies sritys liekanose nuo serino 25 iki arginino 33, C' grandinėje (alaninas 49 ir treoninas 51), F grandinėje (lizinas 93, glutamo rūgštis 95 ir leucinas 96) ir srityje nuo metionino 97 iki tirozino 102, tirozino 103 iki glicino 107 ir G grandinėje glutamino 111, tirozino 113 ir izoleucino 115 padėtyse. Šios vietos buvo pasirinktos remiantis 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 CD80 arba CD86 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.

IŠRADIMO PRIVALUMAI

Kadangi CTLA4 susirišimui su CD80 ir CD86 yra būdingi dideli "į" greičiai ir dideli disociacijos ("iš") greičiai ir kadangi CTLA4Ig-CD86 kompleksai disociuoja maždaug 5-8 greičiau nei CTLA4Ig-CD80 kompleksai, tikėtina, kad sulėtinus CTLA4Ig atskilimą nuo CD80 ir/arba CD86, bus gaunamos molekulės, turinčios stipresnes imunodepresantines savybes. Taigi manoma, kad tirpios CTLA4 mutantinės molekulės, turinčios didesnę surišimo su CD80- arba CD86-teigiamomis ląstelėmis gebą, lyginant su laukinio tipo CTLA4 arba nemutuotomis VTLA4Ig formomis, efektyviau blokuos antigenui specifinių aktyvuotų ląstelių atsiradimą, nei laukinio tipo CTLA4 arba nemutuotos VTLA4Ig formas.

Be to, CTLA4Ig produkcijos kainos yra labai didelės. Didelės gebos mutantinės CTLA4Ig molekulės, turinčios labai stiprias imunodepresantines savybes, gali būti naudojamos klinikoje daug mažesnėmis dozėmis nei nemutuotas CTLA4Ig, pasiekiant panašų imunodepresijos lygį. Taigi, tirpios CTLA4 mutantinės molekulės, pvz. L104EA29YIg, gali būti labai efektyvios kainos požiūriu.

Toliau duoti pavyzdžiai yra pateikiami šiam išradimui pailiuoti ir padėti specialistams pagaminti ir panaudoti šias molekules. Nelaikoma, kad šie pavyzdžiai koku nors būdu riboja išradimo sferą.

PAVYZDŽIAI

1 PAVYZDYS

Šiame pavyzdyje yra pateikiamas būdų, naudotų šio išradimo tirpias CTLA4 mutantines molekules koduojančių nukleotidų sekoms generuoti, aprašymas. Buvo generuotas vienos vietos mutantas L104Elg ir ištirta susirišimo su CD80 ir/arba CD86 kinetika. L104Elg nukleotidų seka buvo panaudota kaip matrica generuoti dvigubos vietos mutanto CTLA4 seką, L104EA29YIg, ir buvo ištirta susirišimo su CD80 ir/arba CD86 kinetika.

Mutagenėzė CTLA4Ig kodono pagrindu

Buvo ištobulinta mutagenėzės ir skryningo strategija mutantinėms CTLA4Ig molekulėms, kurios turi lėtesnius disociacijos iš CD80 ir/arba CD86 molekulių komplekso greičius ("iš" greičius), identifikuoti. Vienos vietos mutantinės nukleotidų sekos buvo generuotos matrica naudojant CTLA4Ig (JAV patentai Nr.Nr. 5844095, 5851795 ir 5885796; ATCC depozito Nr. 68629). Mutageniniai nukleotidiniai PGS pradmenys buvo suplanuoti specifinio kDNR kodono atsitiktinei mutagenėzei, leidžiant būti bet kokiai bazei kodono 1 ir 2 padėtyse, bet tik guaninui arba timinui 3 padėtyje (XXG/T, taip pat žinomas kaip NNG/T). Šiuo būdu specifinę aminorūgštį koduojantis kodonas gali būti atsitiktinai mutuotas, kad galėtų koduoti bet kurią iš 20 aminorūgščių. PGS produktai, koduojantys mutacijas prie CTLA4Ig'o -M97-G107 (žr. fig.7 arba 8) buvo skaldomi SacI/XbaI ir įklonuoti į panašiai sukarpytą CTLA4Ig π LN ekspresijos vektorių. Šis būdas buvo panaudotas vienos vietos CTLA4 mutantinei molekulei L104EIg gaminti (fig. 8).

Mutagenėzei prie CTLA4Ig S25-R33, panaudojant į PGS pradmenį nukreiptą mutagenėzė, 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 (fig.7) gaminti. Konkrečiau, nukleorūgšties molekulė, koduojanti vienos vietos CTLA4 mutantinę molekulę, L104EIg, buvo panaudota kaip matrica dvigubos vietos CTLA4 mutantinei molekulei, L104EA29YIg, gauti. p π LN vektorius, turintis L104EA29YIg, parodytas fig.12.

2 PAVYZDYS

Toliau duodamas skryningo metodų, naudojamų identifikavimui vienos vietos ir dvigubos vietos mutantinių CTLA4 polipeptidų, ekspresuotų iš 1 pavyzdyje aprašytų konstrukty, kurie turi didesnę surišimo su CD80 ir CD86 antigenais gebą nei nemutuotos CTLA4Ig molekulės, aprašymas.

Dabartiniai *in vitro* ir *in vivo* tyrimai rodo, kad pats CTLA4Ig negali pilnai blokuoti antigenui specifinių aktyvuotų 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 identifikuoti 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 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 DNR, koduojančia mutantinį 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 identifikuotos mutantinės molekulės, kurių "iš" greičiai buvo mažesni nei laukinio tipo CTLA4Ig. Buvo sekvenuotos kDNR, atitinkančios atrinktus terpės mėginius, ir buvo pagaminta 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 duotą aprašymą ir taip, kaip čia aprašyta.

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 atsako vienetų (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 receptoriu 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 $R=R_{\max 1} \cdot C/(K_{d1}+C) + R_{\max 2} \cdot C/(K_{d2}+C)$).

Šių dviejų modelių aproksimacijos tinkamumas buvo analizuojamas vizualiai, lyginant su eksperimentiniais duomenimis ir statistiškai 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 $k_s = dR/dT = k_i \cdot Ck_{iS}$ 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 ($AiBj=Ai+Bj$) 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 žinomas kaip CD86]) iš Pharmingen (San Diego, Kalifornija). Imuniniam nudažymui CD80-teigiamos ir/arba CD86-teigiamos CHO ląstelės buvo išimtos iš jų auginimo indų inkubuojant

fosfatiname 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 konjugotu 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 per 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 μ g) ir L104EA29YIg (25 μ g) buvo analizuojami molekulinų sietų chromatografijos metodu, naudojant TSK-GEL G300 SW_{XL} kolonėlę (7,8 x 300 mm, Tosohaas, Montgomeryville, PA), pusiausvyrintą 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 II lentelėje. Atrodo, kad atsitiktinė kai kurių aminorūgščių mutagenezė 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 "I" ir/arba mažais "iš" greičiais. Šie rezultatai patvirtina ankstesnius duomenis, kad liekanos 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 "I" greičio, ir gauti mutantiniai baltymai, kurių bendra susirišimo su CD86lg geba buvo maždaug panaši į laukinio tipo CTLA4lg gebą. Be to, K93 mutagenezė davė agregaciją, kuri gali būti atsakinga už pastebėtus kinetikos pokyčius.

Atsitiktinė L104 mutagenezė, po kurios buvo vykdoma COS ląstelių transfekcija ir auginimo terpės mėginių skyringas SPR metodu pagal imobilizuotą CD86lg, davė šešis terpės mėginius, kuriuose buvo mutantiniai baltymai su maždaug 2 kartus mažesniais "iš" greičiais nei laukinio tipo

CTLA4Ig. 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 CD86Ig.

Tada buvo pakartota mutagenezė kiekvienoje II lentelėje išvardintoje vietoje, šį kartą PGS matrica naudojant L104E vietoj laukinio tipo CTLA4Ig, kaip aprašyta aukščiau. SPR analizė, vėl gi naudojant imobilizuotą CD86Ig, leido identifikuoti šešis auginimo terpės mėginius iš alanino 29 mutagenezės, 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 molekulinų 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; plus 2-merkaptoetanolis) ir neredukuojančiomis (~100 kDa; -βME) sąlygomis (Fig.10A). Molekulinų sietų chromatografija parodė, kad L104EA29YIg (Fig.10C) aiškiai turi tą patį judrumą, kaip ir dimerinis CTLA4Ig (Fig.10B). Didžiausios smailės reiškia baltymo dimerą, o greičiau eliuuojama mažesnė smailė fig.10B 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 mutagenezės 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. 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 L104Elg arba CTLA4Ig. Mažesnė L104EA29YIg K_d (3,21 nM) nei L104Elg (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). 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, nustatančius 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 molekulės 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 tiksliai padėtį trimatėje struktūroje (Fig.11A-B). Leucinas 104 yra netoli labai konservatyvios MYPPPY aminorūgščių sekos. Alaninas 29 yra ties 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 S25-R33 srities ir MYPPPY srities. 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 erdvės be žymių S25-R33 srities perturbacijų. Antra, glutamo rūgšties šoninės grandinės neigiamo krūvio paslėpimas hidrofobinėje srityje energetiškai turėtų būti labai nepalankus. Vietoj to, 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.2) 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 fluoresceinu ožkos anti-žmogaus imunoglobuliną.

Kaip parodyta fig.2, CD80-teigiamos arba CD-86-teigiamos CHO ląstelės ($1,5 \times 10^5$) buvo inkubuojamos su nurodytų koncentracijų CTLA4Ig (juodi kvadratai), L104EA29YIg (apskritimai) arba L104Elg (trikampiai) tirpalais, perplaunama ir inkubuojama su konjuguotu su fluoresceinu 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 ($80 \mu\text{g/ml}$) dave MFI < 30. Šie rezultatai būdingi 4 nepriklausomiems matavimams.

L104EA29YIg, L104Elg ir CTLA4Ig susirišimo su žmogaus CD80-transfekuotomis CHO ląstelėmis yra maždaug vienodi (fig.2A). L104EA29YIg ir L104Elg rišasi stipriau su CHO ląstelėmis, stabiliai infekuotomis žmogaus CD86, nei CTLA4Ig (fig.2B).

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 neprisidėjus apspinduliuotų CHO ląstelių stimuliatorių. Proliferacijos atsakai buvo matuojami pridedant $1 \mu\text{Ci/duobutei}$ [^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.3. L104YIg inhibuoja CD80-teigiamų PMA paveiktų CHO ląstelių proliferaciją labiau nei CTLA4Ig (fig.3A). L104EA29YIg taip pat efektyviau nei CTLA4Ig inhibuoja CD86-teigiamų PMA

paveiktų CHO ląstelių proliferaciją (fig.3B). Todėl L104EA29YIg yra veiksmingesnis ir CD80- ir CD86-tarpininkaujamos T ląstelių kostimuliacijos inhibitorius.

Fig.4 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 dienas ir nustatytas radioaktyvios žymės įsiterpimas.

Antrinė alostimuliacija buvo vykdoma tokiu būdu. Septintą pirminės alostimuliacijos dieną 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.4A. L104EA29YIg poveikis į antrinės alostimuliacijos T ląsteles yra parodytas fig.4B. L104EA29YIg inhibuoja ir pirminį, ir antrinį T ląstelių proliferacinius atsakus geriau nei CTLA4Ig.

Norint išmatuoti citokinų produkciją (fig.5), 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. 5A-C).

L104EA29YIg ir CTLA4Ig poveikiai į beždžionių mišrų limfocitinį atsaką (MLR) parodyti fig.6. 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:

CD86lg surišimo efektas panaudojant CTLA4lg 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	+		

Specialistai, kurie turės ką nors bendro su šiuo išradimu, supras, kad šis išradimas gali būti įgyvendintas kitoje, negu čia konkrečiai aprašyta, formoje, nenukrypstant nuo išradimo prasmės ir esminių charakteristikų. Todėl konkretūs aukščiau aprašyti jo įgyvendinimo variantai turi būti laikomi iliustraciniais, o ne apribojančiais. Šio išradimo apimtis yra nusakyta toliau duodama apibrėžtimi, ir nėra apribota šiame aprašyme duotais pavyzdžiais.

Išradimo apibrėžtis

1. CTLA4 mutantinė molekulė, kuri riša CD80 ir/arba CD86, turinti CTLA4 ekstraląstelinę dalį, kurios ekstraląstelinėje dalyje (a) +29 padėties alaninas yra pakeistas aminorūgštimi, pasirinkta iš grupės, susidedančios iš tirozino, leucino, triptofano ir treonino, ir (b) +104 padėties leucinas yra pakeistas glutamo rūgštimi.
2. CTLA4 mutantinė molekulė pagal 1 punktą, besiskirianti tuo, kad turi dar ir aminorūgščių seką, kuri pakeičia tirpios CTLA4 mutantinės molekulės tirpumą, afiniškumą arba valentingumą.
3. CTLA4 mutantinė molekulė pagal 2 punktą, besiskirianti tuo, kad aminorūgščių sekoje yra žmogaus imunoglobulino pastovioji sritis.
4. CTLA4 mutantinė molekulė pagal 2 punktą, besiskirianti tuo, kad turi dar ir aminorūgščių seką, leidžiančią sekretuoti tirpią CTLA4 mutantinę molekulę.
5. CTLA4 mutantinė molekulė pagal 4 punktą, besiskirianti tuo, kad aminorūgščių sekoje yra onkostatino M signalinis peptidas.
6. CTLA4 mutantinė molekulė pagal 1 punktą, besiskirianti tuo, kad turi metioniną +1 padėtyje ir asparto rūgštį +124 padėtyje, kaip parodyta fig.7.
7. CTLA4 mutantinė molekulė pagal 1 punktą, besiskirianti tuo, kad turi alaniną -1 padėtyje ir asparto rūgštį +124 padėtyje, kaip parodyta fig.7.
8. CTLA4 mutantinė molekulė pagal 3 punktą, besiskirianti tuo, kad žmogaus imunoglobulino pastovioji sritis yra mutuota taip, kad +130 padėties cisteinas yra pakeistas serinu, +136 padėties cisteinas yra pakeistas serinu, +139 padėties cisteinas yra pakeistas serinu ir +148 padėties prolinas yra pakeistas serinu, kaip parodyta fig.7.
9. Tirpi CTLA mutantinė molekulė, kuri su didesne surišimo geba nei CTLA4 rišasi su CD80 ir/arba CD86, turinti ekstraląstelinę CTLA4 dalį, kurios ekstraląstelinėje dalyje +29 padėties alaninas yra pakeistas tirozinu, o +124 padėties leucinas yra pakeistas glutamo rūgštimi, kaip parodyta fig.7.

10. CTLA4 mutantinė molekulė pagal 9 punktą, besiskirianti tuo, kad turi dar ir aminorūgščių seką, kuri pakeičia tirpios CTLA4 mutantinės molekulės tirpumą, afiniškumą arba valentingumą.

11. CTLA4 mutantinė molekulė pagal 10 punktą, besiskirianti tuo, kad aminorūgščių sekoje yra žmogaus imunoglobulino pastovioji sritis.

12. CTLA4 mutantinė molekulė pagal 10 punktą, besiskirianti tuo, kad turi dar ir aminorūgščių seką, leidžiančią sekretuoti tirpią CTLA4 mutantinę molekulę.

13. CTLA4 mutantinė molekulė pagal 12 punktą, besiskirianti tuo, kad aminorūgščių sekoje yra onkostatino M signalinis peptidas.

14. CTLA4 mutantinė molekulė pagal 9 punktą, besiskirianti tuo, kad turi metioniną +1 padėtyje ir asparto rūgštį +124 padėtyje, kaip parodyta fig.7.

15. CTLA4 mutantinė molekulė pagal 9 punktą, besiskirianti tuo, kad turi alaniną -1 padėtyje ir asparto rūgštį +124 padėtyje, kaip parodyta fig.7.

16. CTLA4 mutantinė molekulė pagal 11 punktą, besiskirianti tuo, kad žmogaus imunoglobulino pastovioji sritis yra mutuota taip, kad +130 padėties cisteinas yra pakeistas serinu, +136 padėties cisteinas yra pakeistas serinu, +139 padėties cisteinas yra pakeistas serinu ir +148 padėties prolinas yra pakeistas serinu, kaip parodyta fig.7.

17. Tirpi CTLA mutantinė molekulė, kuri su didesne surišimo geba nei CTLA4 rišasi su CD80 ir/arba CD86, turinti ekstraląstelinę CTLA4 dalį, kurios ekstraląstelinėje dalyje +104 padėties leucinas yra pakeistas glutamo rūgštimi, kaip parodyta fig.8.

18. Nukleorūgšties molekulė, turinti nukleotidų seką, kuri koduoja tirpiajai CTLA4 mutantinei molekulei pagal 1 punktą būdingą aminorūgščių seką.

19. Nukleorūgšties molekulė, turinti nukleotidų seką, kuri koduoja tirpiajai CTLA4 mutantinei molekulei pagal 9 punktą būdingą aminorūgščių seką.

20. Nukleorūgšties molekulė pagal 18 punktą, besiskirianti tuo, kad turi nukleotidų seką, kuri prasideda nuo adenino +1 nukleotidų padėtyje ir baigiasi adeninu +1071 padėtyje, kaip parodyta fig. 7 arba 8.

21. Nukleorūgšties molekulė pagal 19 punktą, besiskirianti tuo, kad turi nukleotidų seką, kuri prasideda nuo adenino +1 nukleotidų padėtyje ir baigiasi adeninu +1071 padėtyje, kaip parodyta fig. 7 arba 8.

22. Nukleorūgšties molekulė pagal 18 punktą, besiskirianti tuo, kad turi nukleotidų seką, kuri prasideda nuo guanino -3 padėtyje ir baigiasi adeninu +1071 padėtyje, kaip parodyta fig. 7 arba 8.

23. Nukleorūgšties molekulė pagal 19 punktą, besiskirianti tuo, kad turi nukleotidų seką, kuri prasideda nuo guanino -3 padėtyje ir baigiasi adeninu +1071 padėtyje, kaip parodyta fig. 7 arba 8.

24. Vektorius, turintis nukleotidų seką pagal bet kurį iš 18-23 punktų.

25. Vektorius, koduojantis L104EA29Ylg, pažymėtas pD16L104EA29Ylg ir deponuotas ATCC kaip ATCC Nr.PTA-2104.

26. Šeimininko vektoriaus sistema, turinti vektorių pagal 24 arba 25 punktą tinkamoje šeimininko ląstelėje.

27. Šeimininko vektoriaus sistema pagal 26 punktą, besiskirianti tuo, kad tinkama šeimininko ląstelė yra bakterinė ląstelė arba eukariotinė ląstelė.

28. Šeimininko ląstelė, turinti vektorių pagal 24 arba 25 punktą.

29. Šeimininko ląstelė pagal 28 punktą, besiskirianti tuo, kad yra eukariotinė ląstelė.

30. Šeimininko ląstelė pagal 29 punktą, besiskirianti tuo, kad eukariotinė ląstelė yra COS ląstelė.

31. Šeimininko ląstelė pagal 29 punktą, besiskirianti tuo, kad eukariotinė ląstelė yra kuniškojo žiurkėno kiaušidės (CHO) ląstelė.

32. Šeimininko ląstelė pagal 31 punktą, besiskirianti tuo, kad CHO ląstelė yra pasirinkta iš grupės, susidedančios iš DG44, CHO-K1, CHO-K1 Tet-On ląstelių linijos, CHO pažymėtos ECACC 85050302, CHO 13 klono, CHO B klono, CHO-K1/SF ir RR-CHOK1.

33. Tirpaus CTLA4 mutantinio baltymo gavimo būdas, apimantis šeimininko vektoriaus sistemos pagal 26 punktą auginimą, kad šeimininko ląstelėje būtų gaminamas CTLA4 mutantinis baltymas, ir tokiu būdu pagaminto baltymo išgavimą.

34. L104EA29Ylg gavimo būdas, apimantis šeimininko ląstelės pagal 28 punktą auginimą, kad šeimininko ląstelėje būtų gaminamas L104EA29Ylg, ir tokiu būdu pagaminto baltymo išgavimą.

35. Tirpus CTLA4 mutantinis baltymas, gautas būdu pagal 33 punktą.

36. L104EA29Ylg, gautas būdu pagal 34 punktą.

37. T ląstelės sąveikos su CD80- ir/arba CD86-teigiama ląstele reguliavimo būdas, apimantis CD80- ir/arba CD86-teigiamos ląstelės sąlytį su tirpia CTLA4 mutantine molekule pagal 1 punktą, kad susidarytų CTLA4 mutantinės molekulės/CD-80 arba CTLA4 mutantinės molekulės/CD86 kompleksas, trukdantis sąveikauti T ląstelei su CD80- ir/arba CD-86 teigiama ląstele.

38. T ląstelės sąveikos su CD80- ir/arba CD86-teigiama ląstele reguliavimo būdas, apimantis CD80- ir/arba CD86-teigiamos ląstelės sąlytį su tirpia CTLA4 mutantine molekule pagal 9 punktą, kad susidarytų CTLA4 mutantinės molekulės/CD-80 arba CTLA4 mutantinės molekulės/CD86 kompleksas, trukdantis sąveikauti T ląstelei su CD80- ir/arba CD-86 teigiama ląstele.

39. Būdas pagal 37 punktą, besiskiriantis tuo, kad tirpi CTLA4 mutantinė molekulė apima CTLA4 ekstraląstelinę dalį, kur ekstraląstelinėje dalyje +104 padėties leucinas yra pakeistas glutamo rūgštimi, kaip parodyta fig.8.

40. Būdas pagal 37 punktą, besiskiriantis tuo, kad CD80- ir/arba CD86-teigiama ląstelė yra suleidžiama į sąlytį su tirpios CTLA4 mutantinės molekulės fragmentu arba dariniu.

41. Būdas pagal 38 punktą, besiskiriantis tuo, kad CD80- ir/arba CD86-teigiama ląstelė yra suleidžiama į sąlytį su tirpios CTLA4 mutantinės molekulės fragmentu arba dariniu.

42. Būdas pagal 37 punktą, besiskiriantis tuo, kad CD80- ir/arba CD86-teigiama ląstelė yra antigeną pateikianti ląstelė.

43. Būdas pagal 38 punktą, besiskiriantis tuo, kad CD80- ir/arba CD86-teigiama ląstelė yra antigeną pateikianti ląstelė.

44. Būdas pagal 37 punktą, besiskiriantis tuo, kad inhibuoja CTLA4-teigiamų ląstelių sąveiką su CD80- ir CD86-teigiamomis ląstelėmis.

45. Būdas pagal 38 punktą, besiskiriantis tuo, kad inhibuoja CTLA4-teigiamų ląstelių sąveiką su CD80- ir CD86-teigiamomis ląstelėmis.

46. Tirpi CTLA4 mutantinė molekulė pagal 1 punktą, skirta panaudoti imuninės sistemos ligų, kuriose tarpininkauja T ląstelių sąveikos su CD80 ir/arba CD86 teigiamomis ląstelėmis, gydymui, skiriant subjektui tirpią CTLA4 mutantinę molekulę reguliuoti T ląstelių sąveikas su CD80 ir/arba CD/86 teigiamomis ląstelėmis.

47. Tirpi CTLA4 mutantinė molekulė pagal 9 punktą, skirta panaudoti imuninės sistemos ligų, kuriose tarpininkauja T ląstelių sąveikos su CD80 ir/arba CD86 teigiamomis ląstelėmis, gydymui, skiriant subjektui tirpią CTLA4 mutantinę molekulę reguliuoti T ląstelių sąveikas su CD80 ir/arba CD86 teigiamomis ląstelėmis.

48. Tirpi CTLA4 mutantinė molekulė pagal 46 punktą, besiskirianti tuo, kad apima CTLA4 ekstraląstelinę dalį, kur ekstraląstelinėje dalyje +104 padėties leucinas yra pakeistas glutamo rūgštimi, kaip parodyta fig. 8.

49. Tirpi CTLA4 mutantinė molekulė pagal 46 punktą, besiskirianti tuo, kad joje yra inhibuojamos minėtos T ląstelių sąveikos.

50. Tirpi CTLA4 mutantinė molekulė pagal 47 punktą, besiskirianti tuo, kad joje yra inhibuojamos minėtos T ląstelių sąveikos.

51. Tirpi CTLA4 mutantinė molekulė pagal 1 punktą, skirta panaudoti subjekto implantas-prieš-šeimininką ligos inhibavimui, skiriant minėtą molekulę ir reaguojantį su IL-4 ligandą šiam objektui.

52. Tirpi CTLA4 mutantinė molekulė pagal 9 punktą, skirta panaudoti subjekto implantas-prieš-šeimininką ligos inhibavimui, skiriant minėtą molekulę ir reaguojantį su IL-4 ligandą šiam objektui.

53. Tirpi CTLA4 mutantinė molekulė pagal 51 punktą, besiskirianti tuo, kad apima CTLA4 ekstraląstelinę dalį, kur ekstraląstelinėje dalyje +104 padėties leucinas yra pakeistas glutamo rūgštimi, kaip parodyta fig. 8.

54. Tirpi CTLA4 mutantinė molekulė, kurią koduoja nukleorūgšties molekulė, pažymėta ATCC No. PTA-2104.

55. DNR seka, koduojanti L104EA29Ylg ir turinti ATCC No. PTA-2104.

56. Tirpi CTLA4 mutantinė molekulė, turinti fig.7 parodytą aminorūgščių seką.

57. Nukleorūgšties molekulė, koduojanti tirpią CTLA4 mutantinę molekulę pagal 56 punktą.

58. Tirpi CTLA4 mutantinė molekulė, kuri turi didesnę susirišimo su CD86 gebą nei laukinio tipo CTLA4.

59. Tirpi CTLA4 mutantinė molekulė, kuri turi mažesnę jos sudaryto komplekso su CD80 ir/arba CD86 disociacijos greitį nei laukinio tipo CTLA4.

60. Tirpi CTLA4 mutantinė molekulė, kuri turi mažesnius jos asociacijos su CD80 ir/arba CD86 ir šio komplekso disociacijos greičius nei laukinio tipo CTLA4.

61. Tirpios CTLA4 mutantinės molekulės, kurią koduoja ATCC No. PTA-2104 pažymėta nukleorūgšties molekulė, dalis, apimanti CTLA4 mutanto ekstraląstelinę dalį.

62. Tirpios CTLA4 mutantinės molekulės dalis pagal 61 punktą, turinti dar ir Ig uodegą.

63. Nukleorūgšties molekulės, koduojančios tirpią CTLA4 mutantinę molekulę ir turinčios ATCC No. PTA-2104, dalis, koduojanti mutantinės CTLA4 molekulės ekstraląstelinę dalį.

64. Nukleorūgšties molekulės dalis pagal 63 punktą, turinti dar ir nukleorūgšties molekulę, kuri koduoja Ig uodegą.

65. Farmacinė kompozicija imuninės sistemos ligos gydymui, besiskirianti tuo, kad turi farmaciškai priimtino nešiklio ir tirpios CTLA4 mutantinės molekulės pagal 1 punktą.

66. Farmacinė kompozicija imuninės sistemos ligos gydymui, besiskirianti tuo, kad turi farmaciškai priimtino nešiklio ir tirpios CTLA4 mutantinės molekulės pagal 9 punktą.

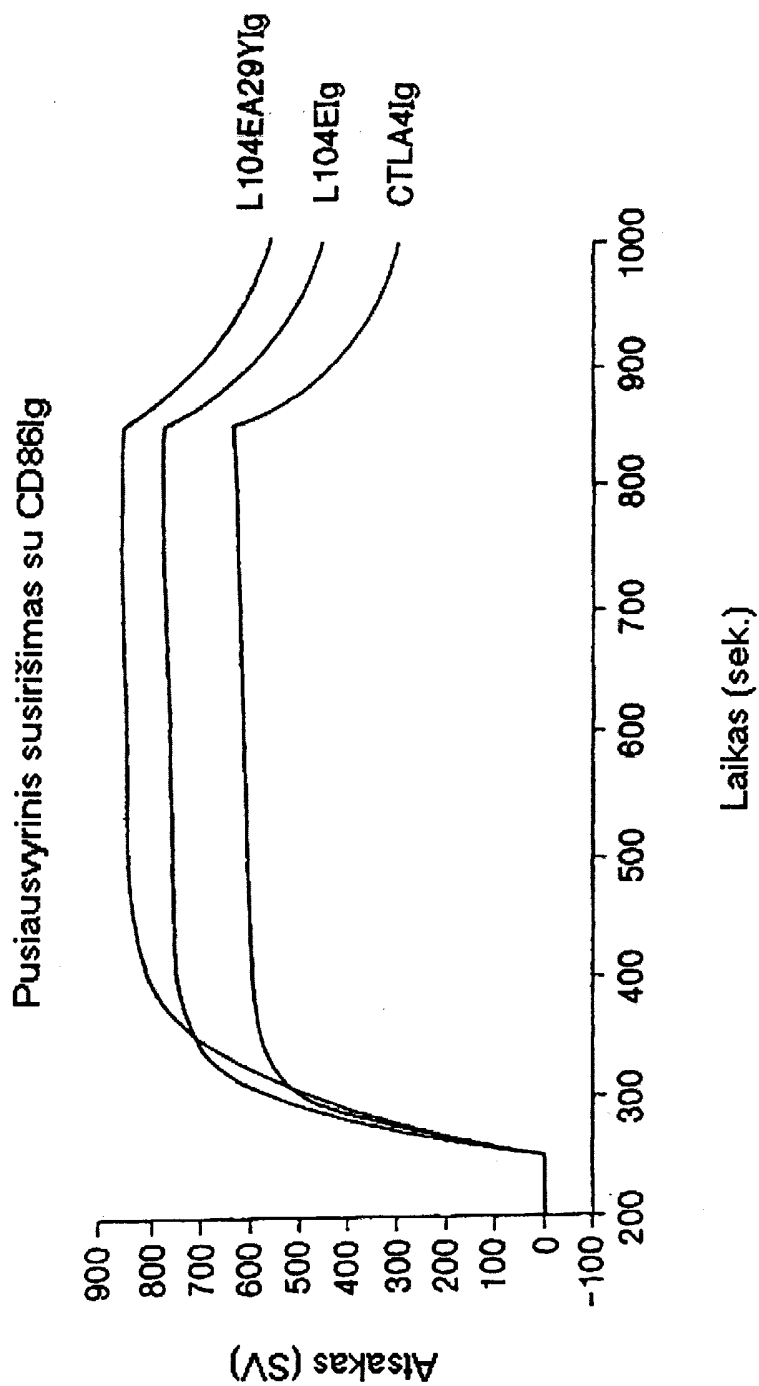


Fig.1

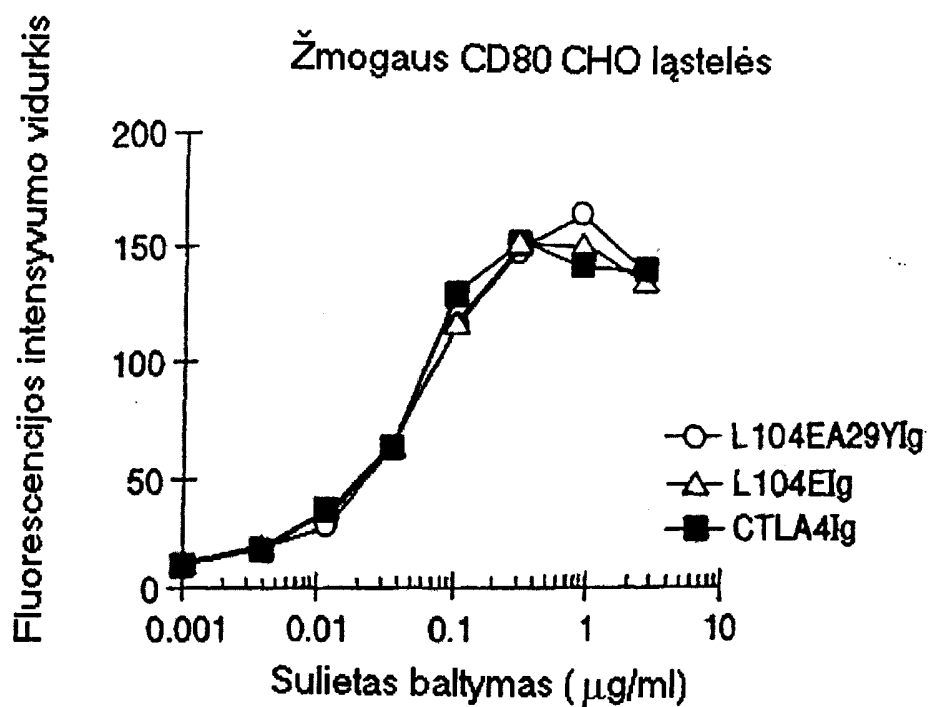


FIG. 2A

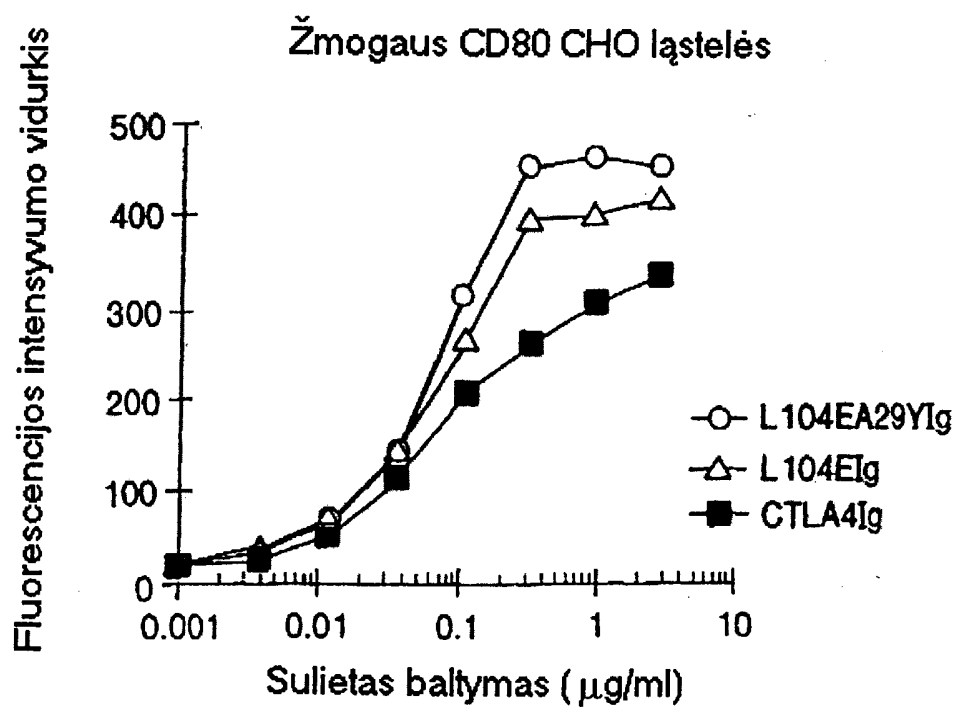


FIG. 2B

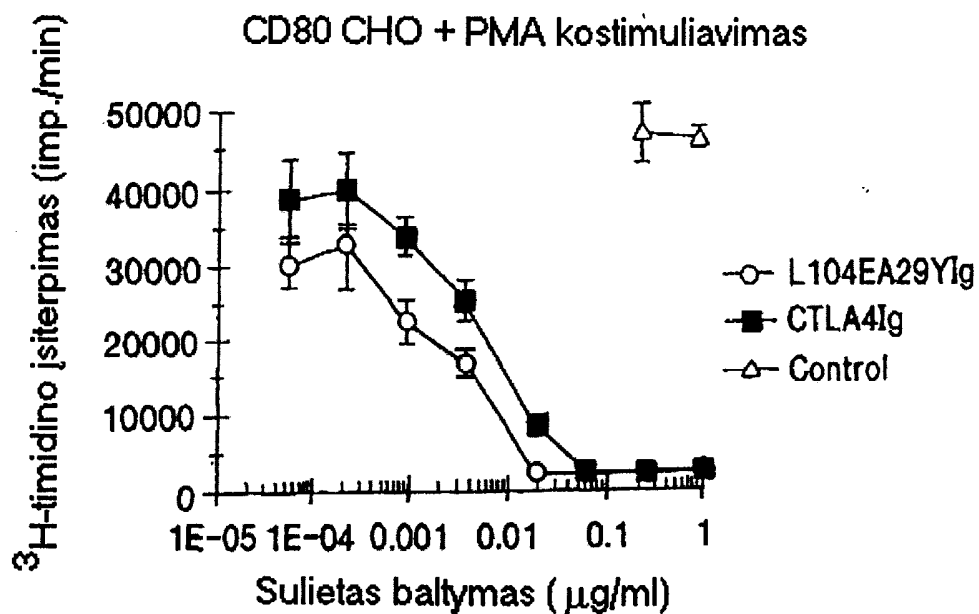


FIG. 3A

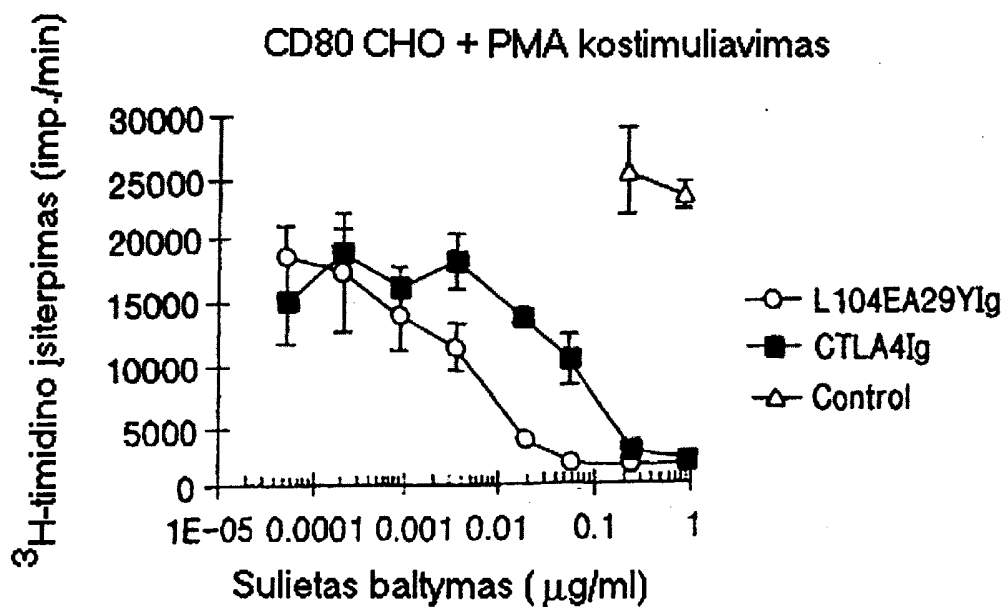
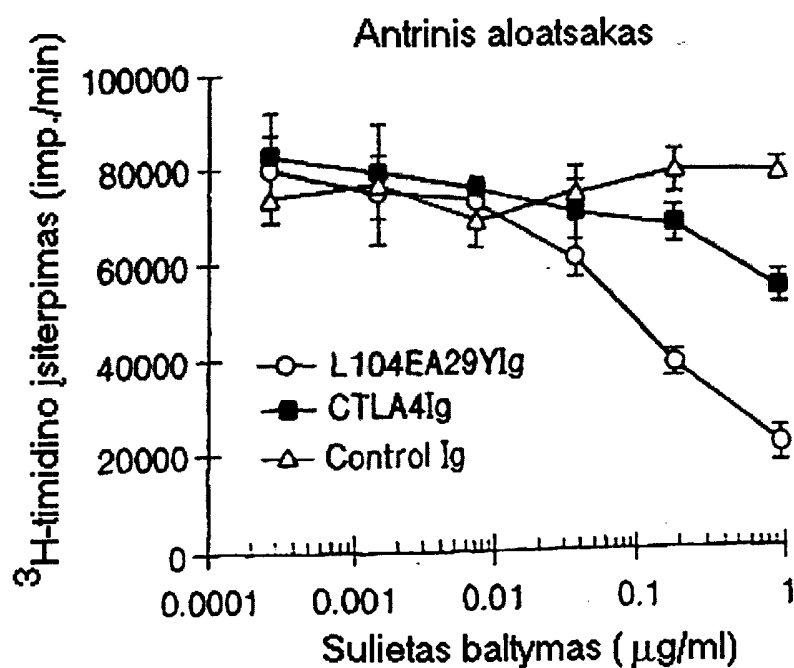
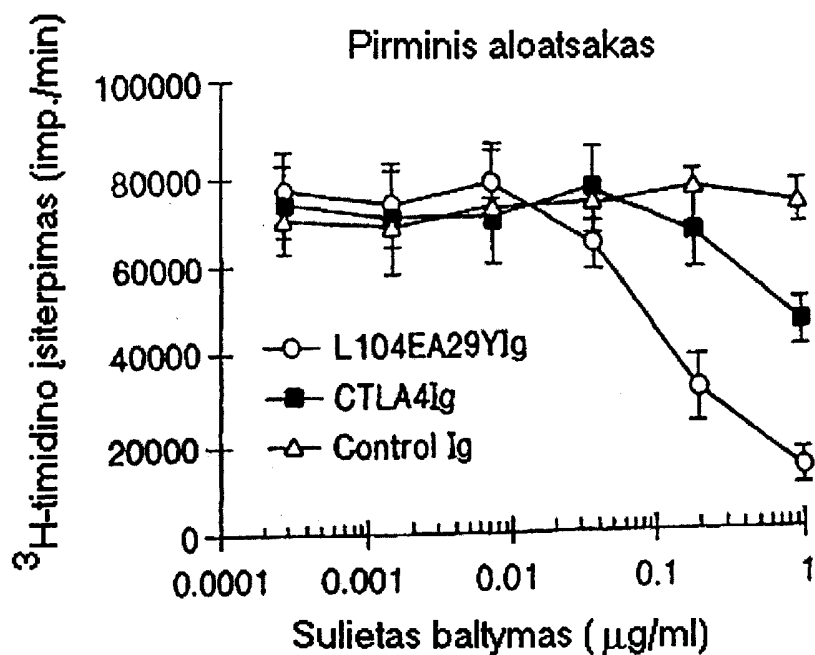


FIG. 3B



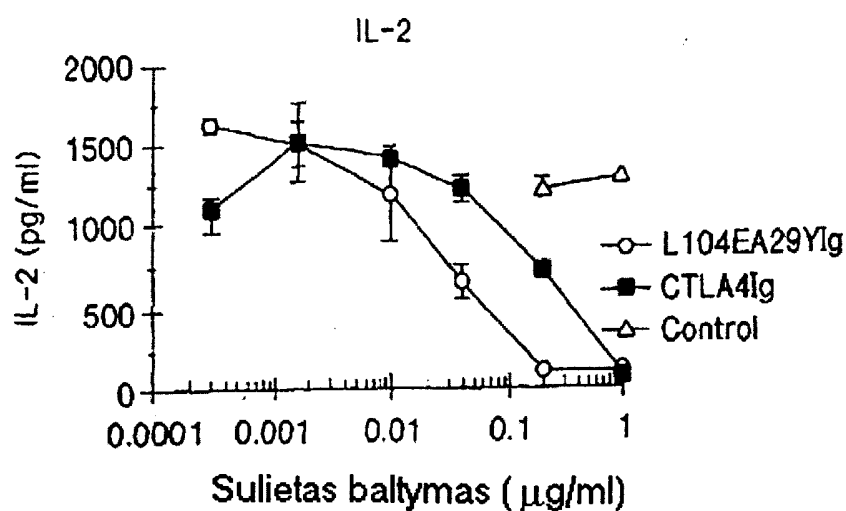


FIG. 5A

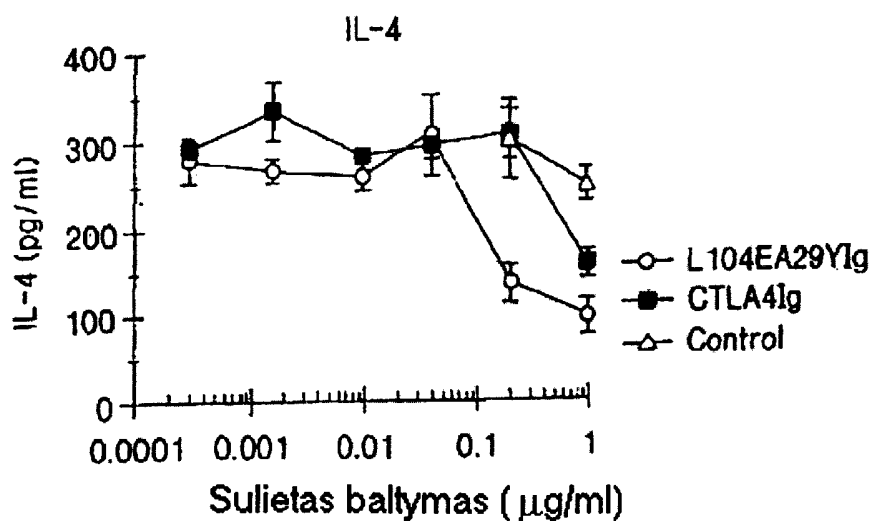


FIG. 5B

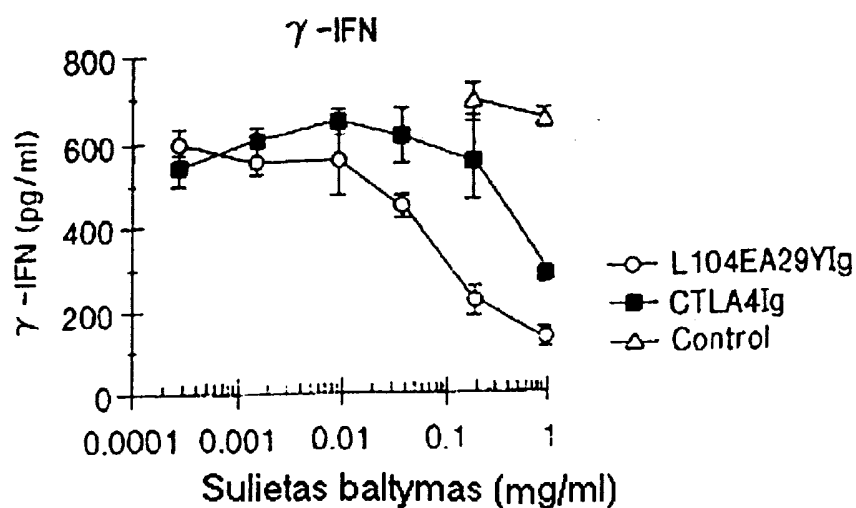


FIG. 5C

PHA indukuotų beždžionės T ląstelių proliferacijos inhibavimas

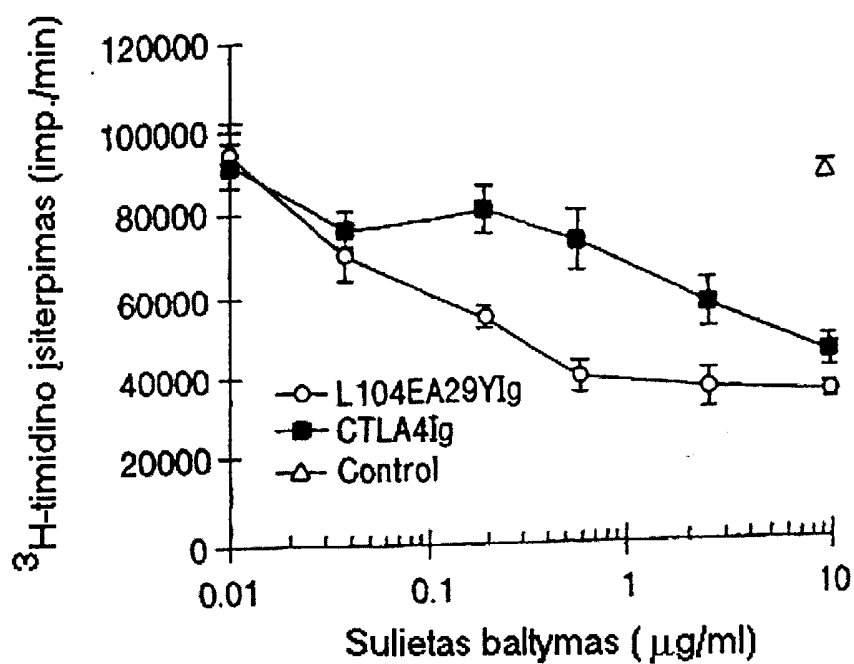


FIG. 6

ATGGGTGCTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCA	-19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P--	-7
AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA	+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
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
ATTGATCCAGAACCGTGCCCGAGATTCTGATCAGGAGCCCAATCTTCTGACAAAACCTCAC	+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
CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAATGCGTGGTGGTG	+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
GTCCTCACCGTCTGTCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC	+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
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. 7

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	
GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAAGCCACTGAGGTCCGGGTG	+102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--A--T--E--V--R--V--	+34
ACAGTGCCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG	+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
GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACGAGGGCATAGGCAACCGAACCAGATTTATGTA	+342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--	+114
ATTGATCCAGAACCGTGCCAGATTCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAACTCAC	+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
CCAAACCCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTG	+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
CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCCTGTGGTCAGC	+642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--	+214
GTCCTCACCGTCTTGCAACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC	+702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--	+234
AACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA	+762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--	+254
GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGC	+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
GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC	+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. 8

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
ACAGTGTCTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG	+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
GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCRTGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG	+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
ATTGATCCAGAACCGTGCCAGATTCTGATCAGGAGCCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCAC	+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
CCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG	+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
CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGC	+642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--	+214
GTCCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCC	+702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--	+234
AACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA	+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
CTGACCTGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT	+882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--	+294
GGGCAGCCGAGAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTC	+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. 9

FIG. 10A

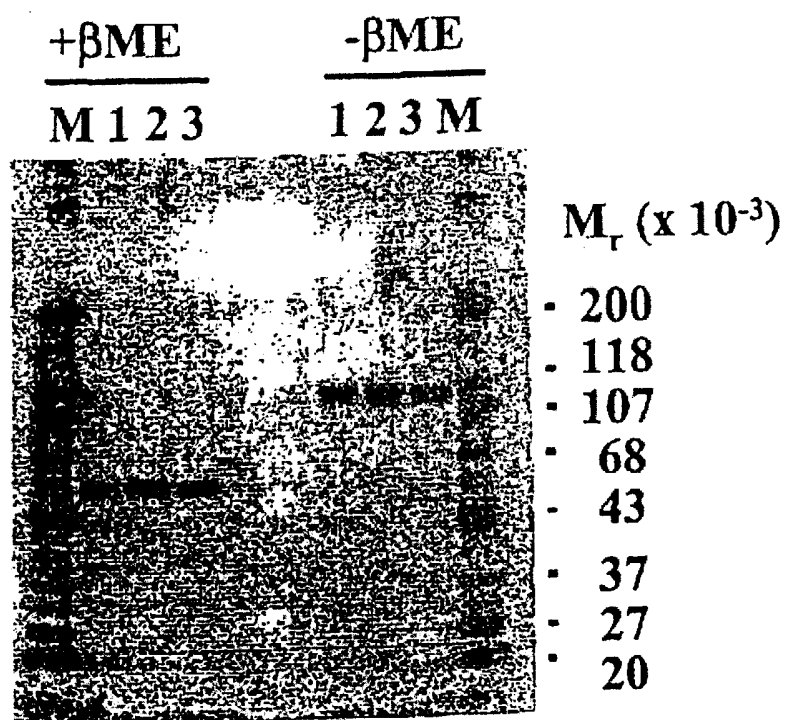


FIG. 10B

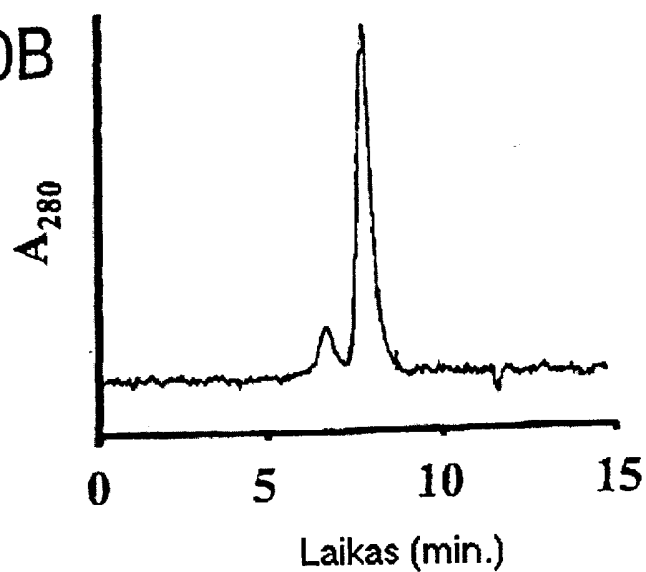
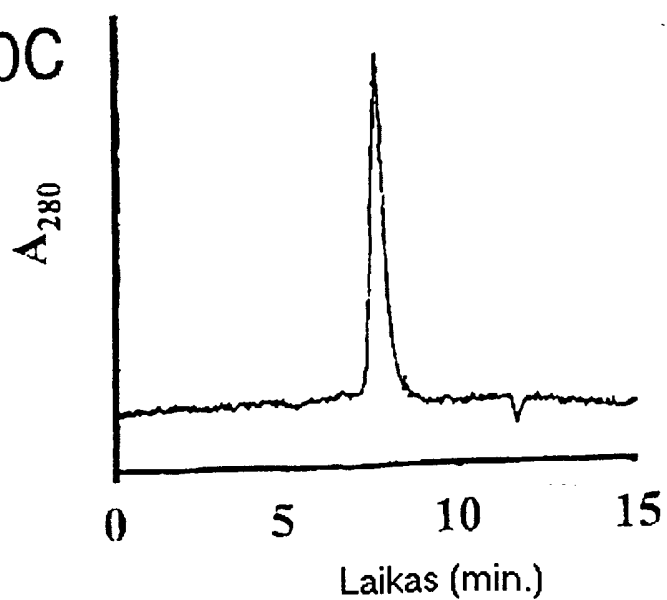


FIG. 10C



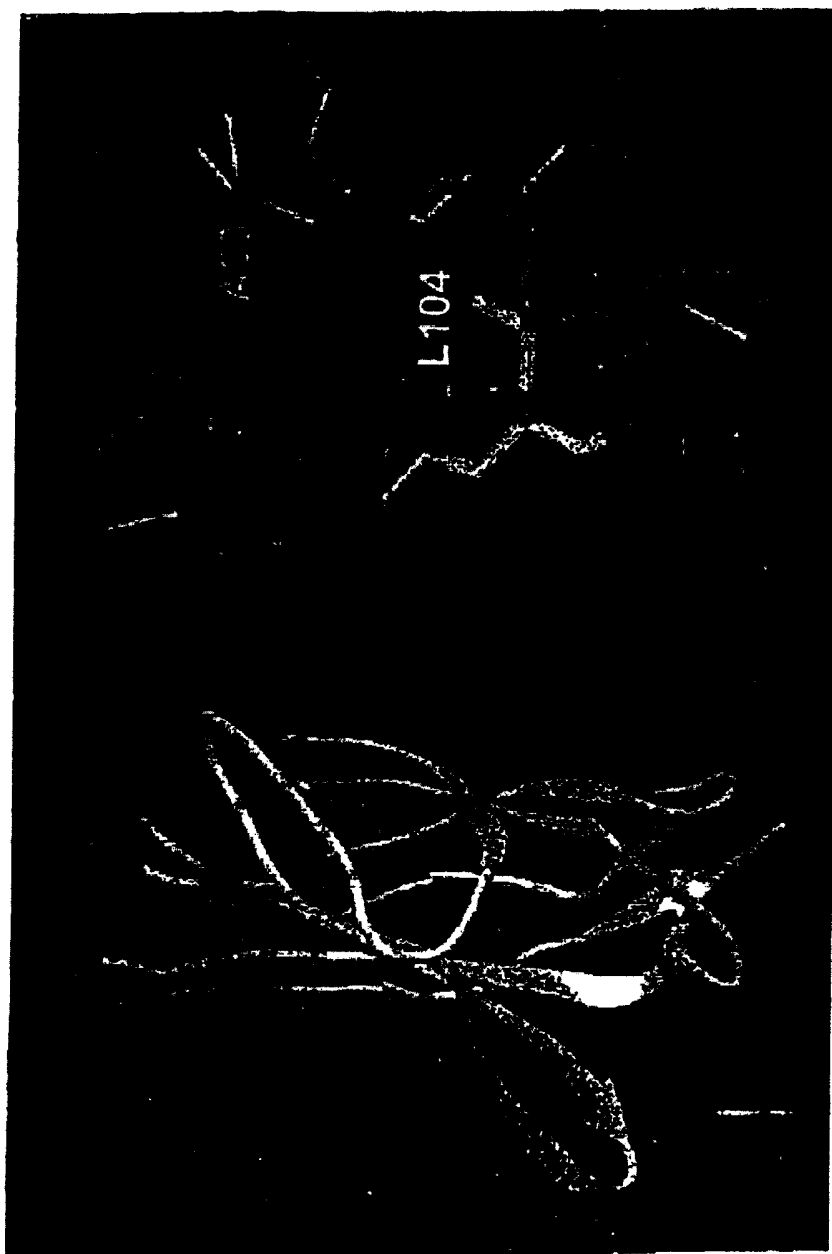


FIG. 11

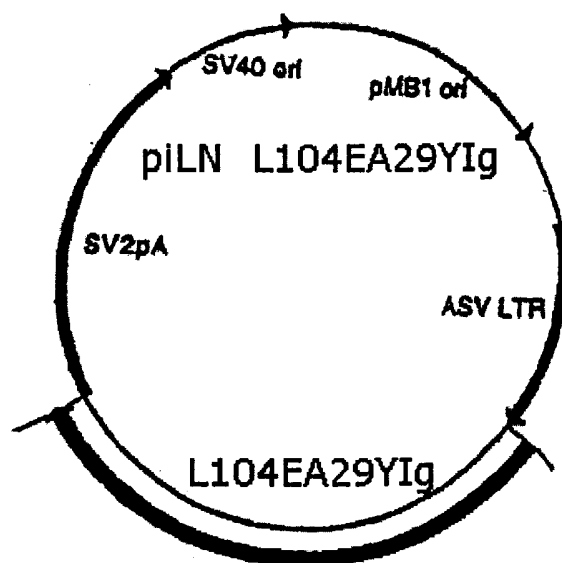


FIG.12