



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 34 872 T2** 2007.01.25

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 733 069 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 34 872.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/00001**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 906 737.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1995/018826**

(86) PCT-Anmeldetag: **03.01.1995**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **13.07.1995**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **25.09.1996**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **15.03.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **25.01.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C07K 14/725** (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

177747 **05.01.1994** **US**

250846 **27.05.1994** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Schering Corp., Kenilworth, N.J., US; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale I.N.S.E.R.M., Paris, FR

(72) Erfinder:

GOLSTEIN, Pierre, F-13009 Marseille, FR; ROUVIER, Valmante Michelet B4, Eric, F-13009 Marseille, FR; FOSSIEZ, Francois, F-69290 Craponne, FR; LEBECQUE, J., Serge, F-69380 Chazay-d'Azerques, FR; DJOSSOU, Odile, F-69340 Francheville, FR; BANCHEREAU, Jacques, F-69130 Ecully, FR

(74) Vertreter:

Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg

(54) Bezeichnung: **GEREINIGTE PRIMATE CLTA-8 ANTIGENE UND VERWANDTE REAGENZIEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

STAND DER TECHNIK

[0001] Das Immunsystem von Vertebraten besteht aus mehreren Organen und mehreren unterschiedlichen Zelltypen. Zwei Hauptzelltypen umfassen die myeloiden und lymphoiden Zell-Abstammungslinie. Unter den Zellen der lymphoiden Zell-Abstammungslinie befinden sich B-Zellen, die ursprünglich dadurch charakterisiert wurden, dass sie sich in der fötalen Leber oder im Knochenmark des Erwachsenen differenzieren, sowie T-Zellen, die ursprünglich dadurch charakterisiert wurden, dass sie sich im Thymus differenzieren. Siehe zum Beispiel Paul (Hrsg.) (1993) Fundamental Immunology (3. Auflage) Raven Press, New York.

[0002] Bei vielen Aspekten der Entwicklung einer Immunantwort oder der Zelldifferenzierung spielen lösliche Proteine, die als Cytokine bekannt sind, eine wichtige Rolle bei der Regulation von zellulären Wechselwirkungen. Diese Cytokine vermitteln offenbar zelluläre Aktivitäten in vielfältiger Weise. Es wurde in vielen Fällen gezeigt, dass sie Proliferation, Wachstum und Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen in die große Zahl von Vorläuferzellen, welche die Zell-Abstammungslinien bilden, die für eine Immunantwort verantwortlich sind, beeinflussen.

[0003] Die zellulären Moleküle, die in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Zellen während dieser Reifungsprozesse exprimiert werden, sind jedoch noch immer nur unvollständig identifiziert. Darüber hinaus sind die Aufgaben und Wirkungsmechanismen der Signalmoleküle, die die unterschiedlichen physiologischen, entwicklungsbiologischen oder proliferativen Stadien dieser Zellen induzieren, erhalten oder modulieren, nur wenig verstanden. Das Immunsystem und seine Reaktionen auf unterschiedliche Arten von Stress ist zweifellos von medizinischer Bedeutung, zum Beispiel bei Entzündungen, bei infektiösen Erkrankungen, bei Reaktionen im Zusammenhang mit Krebserkrankungen und bei der Behandlung derselben, bei allergischen Reaktionen und bei Transplantations-Abstoßungsreaktionen. Siehe zum Beispiel Thorn, et al. Harrison's Principles of Internal Medicine McGraw/Hill, New York.

[0004] Bei der wirksamen Behandlung von unzureichenden oder unangemessenen Reaktionen auf Umweltfaktoren ist die medizinische Wissenschaft in hohem Maße von der angemessenen Einschaltung oder Suppression des Immunsystems abhängig. Das mangelnde Verständnis im Hinblick auf die Art und Weise, wie das Immunsystem reguliert wird oder sich entwickelt, hat jedoch die Möglichkeit verhindert, die normalen Abwehrmechanismen auf biologische Veränderungen vorteilhaft zu modulieren. Medizinische Zustände, die durch abnorme oder unangemessene Regulation der Entwicklung oder Physiologie von relevanten Zellen charakterisiert sind, bleiben somit nicht behandelbar. Die Entdeckung und Charakterisierung von spezifischen Cytokinen wird zur Entwicklung von Therapien für ein breites Spektrum degenerativer Zustände und anderer Zustände, die das Immunsystem, hämatopoetische Zellen sowie andere Zelltypen betreffen, beitragen. Die vorliegende Erfindung stellt Lösungen für einige dieser Probleme sowie für zahlreiche andere Probleme zur Verfügung.

Zusammenfassung der Erfindung

[0005] Die vorliegende Erfindung beruht zum Teil auf der Entdeckung eines cDNA-Klons, der ein Cytokin-ähnliches Protein kodiert.

[0006] Dieses Protein wurde humanes CTLA-8 genannt. Die Erfindung umfasst isolierte Gene, welche die Proteine der Erfindung kodieren, Fusionsproteine, chemische Mimetika und Antikörper. Verschiedene Anwendungsmöglichkeiten für diese unterschiedlichen Nukleinsäure- oder Proteinzusammensetzungen werden ebenfalls bereitgestellt.

[0007] Die vorliegende Erfindung stellt eine Nukleinsäure bereit, die ein Primaten-CTLA-8-Protein kodiert, welches eine Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO: 8 oder 9 umfasst.

[0008] Die vorliegende Erfindung stellt ferner ein im wesentlichen reines Primaten-CTLA-8-Protein bereit. Das Protein oder Peptid umfasst die Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO: 8 oder 9 und kann ein post-translationales Modifikationsmuster aufweisen, das sich von einem natürlichen Primaten-CTLA-8-Protein unterscheidet; oder es kann eine Zelle dazu bringen, einen Entzündungsmediator zu sekretieren, zum Beispiel IL-6, IL-8 und/oder PGE2. Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist eine Zusammensetzung, die ein derartiges Protein und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger umfasst.

[0009] Die Erfindung umfasst einen Antikörper, der spezifisch an eine Aminosäure nach SEQ ID NO: 8 oder

9 bindet. Gemäß bevorzugter Ausführungsformen ist der Antikörper ein monoklonaler Antikörper; blockiert der Antikörper die von CTLA-8 induzierte Sekretion eines Entzündungsmediators, zum Beispiel IL-6, IL-8 und/oder PGE2; oder der Antikörper ist markiert.

[0010] Die Erfindung betrifft ferner einen Kit, der eine Nukleinsäure umfasst, die mindestens zu 95% mit einer Nukleinsäure identisch ist, welche ein Primaten-CTLA-8-Protein kodiert, wobei das Protein die Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO: 8 oder 9 umfasst; ein im Wesentlichen reines Primaten-CTLA-8-Protein, zum Beispiel als Positivkontrolle, wobei das Protein die Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO: 8 oder 9 umfasst; oder einen Antikörper, der spezifisch an eine Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO: 8 oder 9 bindet.

[0011] Die Erfindung umfasst weiterhin ein in vitro Verfahren zur Modulierung der Physiologie oder Entwicklung einer Zelle, bei dem man die Zelle mit einem Antikörper in Kontakt bringt, der spezifisch an eine Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO: 8 oder 9 bindet.

[0012] Die Erfindung umfasst ferner ein in vitro Verfahren zur Modulierung der CTLA-8-induzierten Sekretion eines Entzündungsmediators aus einer Zelle in ein Gewebe, bei dem man Gewebe mit

- a) einem Antikörper, der spezifisch an eine Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO: 8 oder 9 bindet; oder
- b) einer Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO: 8 oder 9

in Kontakt bringt.

[0013] Durch die Verfügbarkeit dieser Reagenzien werden auch Verfahren zur Modulierung der Physiologie oder der Entwicklung einer Zelle bereitgestellt, bei denen die Zelle mit einem Agonisten oder Antagonisten eines CTLA-8-Proteins in Kontakt gebracht wird. Das Verfahren zur Modulierung umfasst die Regulation der CTLA-8-induzierten Sekretion eines Entzündungsmediators, zum Beispiel IL-6, IL-8 und/oder PGE2, durch Inkontaktbringen der Zelle oder des Gewebes mit einem Antikörper, der Säuger-CTLA-8 oder ein im wesentlichen reines Säuger-CTLA-8-Protein spezifisch bindet.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

Allgemeines

[0014] Die vorliegende Erfindung stellt eine DNA-Sequenz bereit, die verschiedene Primaten-Proteine kodiert, welche Eigenschaften aufweisen, die für funktionell signifikante, von T-Zellen exprimierte Moleküle charakteristisch sind. Die cDNA-Sequenz weist verschiedene Merkmale auf, die für mRNAs charakteristisch sind, welche Cytokine, Wachstumsfaktoren und Oncogene kodieren. Das vorliegend beschriebene humane Gen umfasst einen offenen Leserahmen, der ein vorhergesagtes Protein von 155 Aminosäuren kodiert. Dieses Protein ist zu 66,4% homolog zu einem putativen Protein, das vom viralen Genom des Herpesvirus Saimiri in ORF13 kodiert wird.

[0015] Diese Proteine werden als CTLA-8-Proteine bezeichnet. Eine Maus-cDNA, die ein ähnliches CTLA-8-Protein kodiert, wurde von Rouvier et al. (1993) J. Immunol. 150: 5445–5456, beschrieben. Die natürlichen Proteine sollten in der Lage sein, unterschiedliche physiologische Reaktionen zu vermitteln, die zu biologischen oder physiologischen Reaktionen in Ziel-Zellen führen. Anfängliche Studien hatten die mRNA, die dieses Protein kodiert, in unterschiedlichen Zell-Abstammungslinien der hämatopoetischen Zellen lokalisiert. Für das Antigen kodierende Gene wurden im humanen Chromosom 2q31 und im Maus-Chromosom 1A kartiert. Die nachfolgenden Beschreibungen beziehen sich beispielhaft auf ein humanes CTLA-8-Protein; sie sind jedoch in ähnlicher Weise auf verwandte Ausführungsformen mit anderen Primaten-Spezies anwendbar.

Nukleinsäuren

[0016] Die SEQ ID NO: 5–8 offenbaren die Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen eines humanen CTLA-8-Proteins sowie Fragmente derselben. Die beschriebenen Nukleinsäuresequenzen und die zugehörigen Reagenzien können zur Konstruktion eines DNA-Klons verwendet werden, der zur Expression eines Primaten-CTLA-8-Proteins verwendet werden kann, oder beispielsweise zur Isolierung eines homologen Gens aus einer anderen natürlichen Bezugsquelle. Typischerweise werden die Sequenzen nützlich sein, um andere Gene zu isolieren, zum Beispiel allelische Varianten aus dem Menschen, und es werden ähnliche Verfahren angewandt werden, um Gene aus anderen Spezies, zum Beispiel von anderen Primaten, zu isolieren. Die Kreuz-Hybridisierung wird die Isolierung von Genen aus anderen Primaten-Spezies erlauben. Mehrere unterschiedliche Verfahren sollten verfügbar sein, um einen geeigneten Nukleinsäure-Klon aus anderen Bezugs-

quellen zu isolieren.

[0017] Das gereinigte Protein oder definierte Peptide können wie oben beschrieben mittels Standardverfahren zur Erzeugung von Antikörpern verwendet werden. Synthetische Peptide oder gereinigtes Protein können einem Immunsystem präsentiert werden, um eine spezifische Bindungszusammensetzung zu erzeugen, zum Beispiel monoklonale oder polyklonale Antikörper. Siehe zum Beispiel Coligan (1991) Current Protocols in Immunology Wiley/Greene; sowie Harlow und Lane (1989) Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Press.

[0018] Die spezifische Bindungszusammensetzung könnte beispielsweise verwendet werden, um eine Expressions-Bibliothek mittels Screening zu durchsuchen, die aus einer Primaten-Zelllinie erzeugt wurde, welche ein CTLR-8-Protein exprimiert. Das Screening kann durch Standardfärbung von Oberflächen-exprimiertem Protein oder durch "Panning" erfolgen. Das Screening auf eine intrazelluläre Expression kann ebenfalls mittels mehrerer Färbefahren oder Immunfluoreszenz-Verfahren durchgeführt werden. Die Bindungszusammensetzungen könnten zur Affinitätsreinigung oder zum Aussortieren von Zellen verwendet werden, die das Protein exprimieren.

[0019] Die vorliegende Erfindung schlägt die Verwendung von isolierter DNA oder von Fragmenten vor, wobei diese ein biologisch aktives Protein oder Polypeptid kodieren, welches CTLA-8-Protein entspricht. Alternativ dazu kann eine Nukleinsäure, die nicht vollständig identisch ist, als Sonde verwendet werden, welche mit einer CTLA-8 kodierenden Nukleinsäure hybridisiert. Zusätzlich umfasst diese Erfindung isolierte oder rekombinante DNA, die ein biologisch aktives Protein oder Polypeptid kodiert, und die unter geeigneten Bedingungen mit den hier beschriebenen DNA-Sequenzen hybridisieren kann. Das biologisch aktive Protein oder Polypeptid kann ein intaktes Antigen oder ein Fragment sein, und es kann eine Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO: 6 oder 8 aufweisen. Zusätzlich umfasst diese Erfindung die Verwendung von isolierter oder rekombinanter DNA oder von Fragmenten derselben, die Proteine kodieren, welche homolog zu einem Primaten-CTLA-8-Protein sind, oder die unter geeigneten Bedingungen unter Verwendung einer cDNA als Sonde isoliert wurden, welche ein Primaten-CTLA-8-Protein kodiert. Die isolierte DNA kann die jeweiligen regulatorischen Sequenzen in den 5'- und 3'-flankierenden Bereichen aufweisen, z.B. Promotoren, Enhancer, Poly-A-Additions-Signale, und andere. Das humane CTLA-8-Gen hat eine signifikante Identität von 66,4% mit dem putativen Protein, das vom offenen Leserahmen ORF13 des Herpesvirus Saimiri (SEQ ID NO: 4) kodiert wird, sowie eine Identität von ca. 60% mit dem Maus-CTLA-8-Gegenstück (SEQ ID NO: 2).

[0020] Eine "isolierte" Nukleinsäure ist eine Nukleinsäure, zum Beispiel eine RNA, DNA, oder ein gemischtes Polymer, das im Wesentlichen von anderen Bestandteilen getrennt ist, die natürlicherweise gemeinsam mit einer nativen Sequenz vorliegen, zum Beispiel Ribosomen, Polymerasen und flankierende genomische Sequenzen aus der ursprünglichen Spezies. Der Ausdruck umfasst eine Nukleinsäuresequenz, die aus ihrer natürlich vorkommenden Umgebung entfernt wurde, und sie umfasst rekombinante oder klonierte DNA-Isolate sowie chemisch synthetisierte Analoga oder Analoga, die von heterologen Systemen biologisch synthetisiert wurden. Ein im wesentlichen reines Molekül umfasst isolierte Formen des Moleküls. Alternativ dazu kann eine gereinigte Spezies von Wirtskomponenten eines rekombinanten Expressionssystems getrennt werden. Der Umfang der Homologie einer derartigen Nukleinsäure wird typischerweise kleiner sein als bei großen Vektoren, zum Beispiel weniger als Zehntausende von Basenpaare, typischerweise weniger als mehrere kB, und vorzugsweise im Bereich von 2–6 kB.

[0021] Eine isolierte Nukleinsäure wird im Allgemeinen eine homogene Zusammensetzung von Molekülen sein. Sie wird allerdings in einigen Ausführungsformen eine geringfügige Heterogenität aufweisen. Diese Heterogenität wird typischerweise an den Enden des Polymers gefunden, oder in Abschnitten, die für eine erwünschte biologische Funktion oder Aktivität nicht wichtig sind.

[0022] Eine "rekombinante" Nukleinsäure ist entweder durch ihr Herstellungsverfahren oder durch ihre Struktur definiert. Bezüglich ihres Herstellungsverfahrens (z.B. bei einem Produkt, das durch ein Verfahren hergestellt wird) entspricht das Verfahren der Verwendung von rekombinanten Nukleinsäure-Techniken, was beispielsweise den Eingriff des Menschen in die Nukleinsäuresequenz (typischerweise Selektion oder Herstellung) einschließt. Alternativ kann es sich um eine Nukleinsäure handeln, die durch Erzeugen einer Sequenz hergestellt wurde, was die Fusion von zwei Fragmenten umfasst, die natürlicherweise nicht miteinander verbunden sind, wobei jedoch Produkte der Natur, zum Beispiel natürlich auftretende Mutanten ausgeschlossen sein sollen. Somit sind beispielsweise Produkte umfasst, die durch Transformation von Zellen mit einem beliebigen, nicht natürlich auftretenden Vektor hergestellt wurden, wie auch Nukleinsäuren, die Sequenzen enthalten, welche durch ein beliebiges synthetisches Oligonukleotid-Verfahren erhalten wurden. Dies wird oft durch-

geführt, um ein Codon durch ein redundantes Codon zu ersetzen, welches die gleiche oder eine konservative Aminosäure kodiert, wobei typischerweise eine Sequenz-Erkennungsstelle eingeführt oder entfernt wird. Alternativ wird dies durchgeführt, um Nukleinsäure-Segmente mit erwünschten Funktionen miteinander zu verbinden, um eine einzige genetische Einheit herzustellen, die eine erwünschte Kombination von Funktionen umfasst, die in den üblicherweise verfügbaren natürlichen Formen nicht vorgefunden wird. Restriktionsenzym-Erkennungsstellen sind oft das Ziel derartiger künstlicher Manipulationen, wobei jedoch auch andere ortspezifische Ziele, zum Beispiel Promotoren, DNA-Replikationsstellen, regulatorische Sequenzen, Kontrollsequenzen oder andere nützliche Merkmale eingefügt werden können. Ein ähnliches Konzept ist bei einem rekombinanten Polypeptid beabsichtigt, zum Beispiel einem Fusions-Polypeptid. Spezifisch eingeschlossen sind synthetische Nukleinsäuren, die aufgrund der Redundanz des genetischen Codes Polypeptide kodieren, die Fragmenten dieser Antigene ähneln, sowie Fusionen aus Sequenzen verschiedener Varianten von Primaten-Spezies.

[0023] Ein signifikantes "Fragment" im Zusammenhang mit Nukleinsäuren ist ein kontinuierliches Segment von mindestens etwa 17 Nukleotiden, im Allgemeinen von mindestens etwa 20 Nukleotiden, noch Allgemeiner von mindestens etwa 23 Nukleotiden, üblicherweise von mindestens etwa 26 Nukleotiden, noch üblicher von mindestens etwa 29 Nukleotiden, oft von mindestens etwa 32 Nukleotiden, noch öfter von mindestens etwa 35 Nukleotiden, typischerweise von mindestens etwa 38 Nukleotiden, noch typischer von mindestens etwa 41 Nukleotiden, häufig von mindestens etwa 44 Nukleotiden, noch häufiger von mindestens etwa 47 Nukleotiden, bevorzugt von mindestens etwa 50 Nukleotiden, noch bevorzugter von mindestens etwa 53 Nukleotiden, und in besonders bevorzugten Ausführungsformen wird es mindestens etwa 56 oder mehr Nukleotide umfassen. Diese Fragmente können an nahezu jeder Position innerhalb des Gens beginnen oder enden, vorzugsweise innerhalb von kodierenden Sequenzen, zum Beispiel innerhalb einer mRNA.

[0024] Eine DNA, die ein CTLA-8-Protein kodiert, wird besonders nützlich sein, um Gene, mRNA- und cDNA-Spezies zu identifizieren, die verwandte oder homologe Proteine kodieren, sowie DNAs, die homologe Proteine aus anderen Primaten-Spezies kodieren. Mehrere Primaten-CTLA-8-Proteine sollten homolog sein und sind vorliegend umfasst. Es können jedoch sogar Proteine, die eine entferntere evolutionäre Verwandtschaft zu dem Antigen aufweisen, unter geeigneten Bedingungen und unter Verwendung dieser Sequenzen problemlos isoliert werden, falls sie ausreichend homolog sind.

[0025] Diese Erfindung umfasst ferner rekombinante DNA-Moleküle und Fragmente, die eine DNA-Sequenz aufweisen, welche mit den hier isolierten DNAs identisch oder hochgradig homolog zu diesen sind. Die Sequenzen werden insbesondere oftmals operativ mit DNA-Segmenten verbunden sein, die die Transkription, Translation und DNA-Replikation kontrollieren. Alternativ dazu werden rekombinante Klone, die sich von genomischen Sequenzen ableiten, zum Beispiel solche, die Introns enthalten, für transgene Studien nützlich sein, einschließlich z.B. transgene Zellen und Organismen, sowie für die Gentherapie. Siehe zum Beispiel Goodnow (1992) "Transgenic Animals" in Roitt (Hrsg.) *Encyclopedia of Immunology* Academic Press, San Diego, Seiten 1502–1504; Travis (1992) *Science* 256: 1392–1394; Kuhn et al. (1991) *Science* 254: 707–710; Capecchi (1989) *Science* 244: 1288; Robertson (1987) (Hrsg.) *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach* IRL Press, Oxford; Rosenberg (1992) *J. Clinical Oncology* 10: 180–199; und Cournoyer und Caskey (1993) *Ann. Rev. Immunol.* 11: 297–329.

[0026] Homologe Nukleinsäuresequenzen weisen beim Vergleich signifikante Ähnlichkeit oder Identität auf. Die Standards für Homologie bei Nukleinsäuren sind entweder Homologiemessungen durch Sequenzvergleiche, wie sie im Stand der Technik allgemein verwendet werden, oder sie basieren auf Hybridisierungsbedingungen. Die Hybridisierungsbedingungen sind nachfolgend detaillierter beschrieben.

[0027] Wesentliche Homologie im Zusammenhang mit Nukleinsäure-Sequenzvergleichen bedeutet entweder, dass beim Vergleich der Segmente oder ihrer komplementären Stränge diese bei optimaler Gegenüberstellung (wobei geeignete Nukleotid-Insertionen oder Nukleotid-Deletionen möglich sind) in mindestens etwa 70% der Nukleotide identisch sind; im Allgemeinen in mindestens etwa 75%, gewöhnlich in mindestens etwa 79%, oftmals in mindestens etwa 83%, typischerweise in mindestens etwa 87%, üblicherweise in mindestens etwa 90%, bevorzugt in mindestens etwa 92%, noch bevorzugter in mindestens etwa 95 bis 98% oder mehr, und in besonderen Ausführungsformen in bis zu 99% oder mehr der Nukleotide. Alternativ dazu existiert wesentliche Homologie, wenn die Segmente unter selektiven Hybridisierungsbedingungen mit einem Strang oder seinem Komplement hybridisieren, wobei typischerweise eine von SEQ ID NO: 3, 5 oder 7 abgeleitete Sequenz verwendet wird. Typischerweise wird eine selektive Hybridisierung auftreten, wenn es eine Homologie von mindestens etwa 55% über einen Bereich von mindestens etwa 14 Nukleotiden gibt, bevorzugt von mindestens etwa 65%, noch bevorzugter von mindestens etwa 75% und am meisten bevorzugt von mindestens etwa 90%. Siehe Kanehisa (1984) *Nuc. Acids Res.* 12: 203–213. Die Länge des Homologie-Vergleichs kann

wie beschrieben über längere Ausdehnungen erfolgen, und wird sich in gewissen Ausführungsformen über eine Ausdehnung von mindestens etwa 17 Nukleotiden erstrecken, üblicherweise von mindestens etwa 20 Nukleotiden, noch üblicher von mindestens etwa 24 Nukleotiden, typischerweise von mindestens etwa 28 Nukleotiden, noch typischer von mindestens etwa 40 Nukleotiden, bevorzugt von mindestens etwa 50 Nukleotiden, und noch bevorzugter von mindestens etwa 75 bis 100 Nukleotiden oder mehr. Die Erfindung stellt alle Kombinationen von Längen, Identitätsmessungen und Endpunkten für Fragmente bereit, siehe oben.

[0028] Stringente Bedingungen in Bezug auf eine Homologie im Zusammenhang mit Hybridisierungen sind stringente kombinierte Bedingungen von Salz, Temperatur, organischen Lösungsmitteln, und anderen Parametern, typischerweise solche, die bei Hybridisierungsreaktionen kontrolliert werden. Stringente Temperaturbedingungen werden üblicherweise Temperaturen oberhalb von etwa 30°C einschließen, noch üblicher oberhalb von etwa 37°C, typischerweise oberhalb von etwa 45°C, noch typischer oberhalb von etwa 55°C, bevorzugt oberhalb von etwa 65°C, und noch bevorzugter oberhalb von etwa 70°C. Stringente Salzbedingungen werden in der Regel weniger als etwa 1000 mM sein, üblicherweise weniger als etwa 500 mM, noch üblicher weniger als etwa 400 mM, typischerweise weniger als etwa 300 mM, bevorzugt weniger als etwa 200 mM, und noch bevorzugter weniger als etwa 150 mM. Die Kombination von Parametern ist jedoch wesentlich wichtiger als die Messung jedes einzelnen Parameters. Siehe zum Beispiel Wetmur und Davidson (1968) J. Mol. Biol. 31: 349–370.

[0029] Ein CTLA-8-Protein von anderen Primaten-Spezies kann durch Spezies-übergreifende Hybridisierung von nahe verwandten Spezies kloniert und isoliert werden. Die Homologie zwischen entfernt verwandten Spezies kann relativ niedrig sein, und somit ist die Hybridisierung von relativ nahe verwandten Spezies zu empfehlen. Alternativ dazu kann die Herstellung einer Antikörper-Zubereitung, die geringere Spezies-Spezifität aufweist, in Expressionsklonierungs-Ansätzen nützlich sein.

Gereinigtes Primaten-CTLA-8-Protein

[0030] Die vorhergesagte Proteinsequenz von Maus-CTLA-8 ist in SEQ ID NO: 2 dargestellt. Die vorhergesagte homologe Proteinsequenz des Leserahmens ORF13 des Herpesvirus ist in SEQ ID NO: 4 dargestellt. Die vorhergesagte Sequenz eines humanen Gegenstücks ist in SEQ ID NO: 8 dargestellt. Die Peptidsequenzen erlauben die Herstellung von Peptiden, um Antikörper herzustellen, die derartige Segmente erkennen.

[0031] Wie vorliegend verwendet soll der Ausdruck "humanes CTLA-8-Protein", sofern er im Zusammenhang mit Proteinen verwendet wird, ein Protein umfassen, das die in SEQ ID NO: 8 dargestellte Aminosäuresequenz aufweist, oder ein signifikantes Fragment eines solchen Proteins, zum Beispiel SEQ ID NO: 6. Er bezieht sich darüber hinaus auf ein vom Menschen abgeleitetes Polypeptid, das eine ähnliche biologische Funktion aufweist, oder mit für das CTLA-8-Protein spezifischen Bindungskomponenten interagiert. Diese Bindungskomponenten, zum Beispiel Antikörper, binden ein CTLA-8-Protein typischerweise mit hoher Affinität, zum Beispiel bei mindestens etwa 100 nM, üblicherweise besser als etwa 30 nM, bevorzugt besser als etwa 10 nM, und noch bevorzugter besser als etwa 3 nM. Homologe Proteine würden in nicht-humanen Säuger-Spezies gefunden werden, zum Beispiel in Ratten, Mäusen, Primaten sowie im Herpesvirus-Genom, zum Beispiel ORF13. Nicht-Säuger-Spezies sollten ebenfalls strukturell oder funktionell verwandte Gene und Proteine aufweisen.

[0032] Wie vorliegend verwendet schließt der Ausdruck "Polypeptid" ein signifikantes Fragment oder Segment ein und umfasst eine Ausdehnung von Aminosäuren von mindestens etwa 8 Aminosäuren, im Allgemeinen von mindestens etwa 10 Aminosäuren, noch allgemeiner von mindestens etwa 12 Aminosäuren, oftmals von mindestens etwa 14 Aminosäuren, noch öfter von mindestens etwa 16 Aminosäuren, typischerweise von mindestens etwa 18 Aminosäuren, noch typischer von mindestens etwa 20 Aminosäuren, üblicherweise von mindestens etwa 22 Aminosäuren, noch üblicher von mindestens etwa 24 Aminosäuren, bevorzugt von mindestens etwa 26 Aminosäuren, noch bevorzugter von mindestens etwa 28 Aminosäuren, und in besonders bevorzugten Ausführungsformen von mindestens etwa 30 Aminosäuren oder mehr.

[0033] Der Ausdruck "Bindungszusammensetzung" bezieht sich auf Moleküle, die spezifisch an Primaten-CTLA-8-Protein binden, zum Beispiel in der Art von Ligand und Rezeptor, mittels Antikörper-Antigen-Wechselwirkung, oder mittels Reagenzien, zum Beispiel Proteine, welche spezifisch mit CTLA-8-Protein assoziieren, zum Beispiel in einer natürlichen, physiologisch relevanten Protein-Protein-Wechselwirkung, entweder kovalent oder nicht-kovalent. Das Molekül kann ein Polymer oder ein chemisches Reagenz sein. Es wird keine Schlußfolgerung bezüglich der Frage getroffen, ob das CTLA-8-Protein der Ligand oder der Rezeptor in einer Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung ist. Die Wechselwirkung weist lediglich eine ähnliche Spezifität auf, zum Beispiel spezifische Affinität. Ein funktionelles Analog kann ein Protein mit strukturellen Modifikationen

sein, oder es kann ein völlig unverwandtes Molekül sein, zum Beispiel ein Molekül mit einer molekularen Form, die mit den erforderlichen Bindungs-Determinanten in Wechselwirkung treten kann. Die Proteine können als Agonisten oder Antagonisten eines Rezeptors wirken, siehe zum Beispiel Goodman, et al. (Hrsg.) (1990) Goodman & Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics (8. Auflage), Pergamon Press.

[0034] Die Löslichkeit eines Polypeptids oder eines Fragments ist abhängig von der Umgebung und von dem Polypeptid. Viele Parameter beeinflussen die Löslichkeit von Polypeptiden, einschließlich Temperatur, Elektrolyt-Umgebung, Größe und molekulare Eigenschaften des Polypeptids sowie die Art des Lösungsmittels. Typischerweise liegt die Temperatur, bei der ein Polypeptid eingesetzt wird, im Bereich von etwa 4°C bis etwa 65°C. Üblicherweise ist die verwendete Temperatur höher als etwa 18°C, und noch üblicher höher als etwa 22°C. Für diagnostische Zwecke wird die Temperatur etwa Raumtemperatur oder höher sein, aber niedriger als die Denaturierungstemperatur der Komponenten im Assay. Für therapeutische Zwecke wird die Temperatur üblicherweise Körpertemperatur sein, typischerweise etwa 37°C beim Menschen, obwohl in gewissen Situationen die Temperatur in situ oder in vitro erhöht oder erniedrigt werden kann.

[0035] Die Elektrolyte werden sich üblicherweise den physiologischen Bedingungen in situ annähern, können aber (sofern vorteilhaft) auf höhere oder niedrigere Ionenstärke verändert werden. Die eigentlichen Ionen können verändert werden, zum Beispiel, um Standardpuffern zu entsprechen, die in physiologischen oder analytischen Verfahren verwendet werden.

[0036] Die Größe und Struktur des Polypeptids sollten sich im Allgemeinen in einem im Wesentlichen stabilen Zustand befinden, und üblicherweise nicht in einem denaturierten Zustand. Das Polypeptid kann mit anderen Polypeptiden in einer Quartärstruktur assoziiert sein, um beispielsweise die Löslichkeit zu vermitteln, oder es kann mit Lipiden oder Detergentien in einer Weise assoziiert sein, die den Wechselwirkungen in natürlichen Lipid-Doppelschichten gleicht.

[0037] Das Lösungsmittel wird üblicherweise ein biologisch kompatibler Puffer einer Art sein, wie er zur Aufrechterhaltung von biologischen Aktivitäten verwendet wird, und er wird üblicherweise einem physiologischen Lösungsmittel gleichen. Üblicherweise wird das Lösungsmittel einen neutralen pH-Wert haben, typischerweise zwischen etwa 5 und 10, und vorzugsweise von etwa 7,5. Bei einigen Gelegenheiten wird ein Detergens zugegeben werden, typischerweise ein mildes, nicht-denaturierendes Detergens, zum Beispiel CHS oder CHAPS, oder in einer ausreichend niedrigen Konzentration, um eine signifikante Zerstörung von strukturellen oder physiologischen Eigenschaften des Antigens zu vermeiden.

[0038] Die Löslichkeit wird durch die Sedimentation bestimmt, die in Svedberg-Einheiten gemessen wird, wobei diese ein Maß für die Geschwindigkeit der Sedimentation eines Moleküls unter bestimmten Bedingungen sind. Die Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit wurde klassischerweise in einer analytischen Ultrazentrifuge durchgeführt. Sie wird nunmehr aber typischerweise in einer Standard-Ultrazentrifuge durchgeführt. Siehe Freifelder (1982) Physical Biochemistry (2. Auflage), W. H. Freeman & Co., San Francisco; und Cantor und Schimmel (1980) Biophysical Chemistry, Teile 1–3, W. H. Freeman & Co., San Francisco. Als grobe Bestimmung wird eine Probe, die ein putativ lösliches Polypeptid enthält, in einer normal großen Standard-Ultrazentrifuge bei etwa 50K UpM für etwa 10 Minuten zentrifugiert, wobei lösliche Moleküle im Überstand verbleiben. Ein lösliches Partikel oder Polypeptid wird typischerweise weniger als etwa 30S haben, noch typischer weniger als etwa 15S, gewöhnlich weniger als etwa 10S und noch üblicher weniger als etwa 6S, und in besonderen Ausführungsformen bevorzugt weniger als etwa 4S, und besonders bevorzugt weniger als etwa 3S.

[0039] Herstellung von Primaten-CTLA-8-Protein; Mimetika DNA, die das Primaten-CTLA-8-Protein oder Fragmente desselben kodiert, kann durch chemische Synthese oder durch Screening von cDNA-Bibliotheken, die aus einer Vielzahl von Zelllinien oder Gewebeproben hergestellt wurden, erhalten werden.

[0040] Diese DNA kann in einer Vielzahl von Wirtszellen exprimiert werden, um ein Protein vollständiger Länge oder Fragmente zu synthetisieren, die beispielsweise wiederum verwendet werden können, um polyklonale oder monoklonale Antikörper herzustellen; für Bindungsstudien; zur Konstruktion und Expression von modifizierten Molekülen; und für Struktur/Funktions-Studien. Jedes Antigen oder dessen Fragment kann in Wirtszellen exprimiert werden, die mit geeigneten Expressionsvektoren transformiert oder transfiziert sind. Diese Moleküle können im Wesentlichen gereinigt werden, sodass sie frei von Protein oder zellulären Verunreinigungen sind, die nicht vom rekombinanten Wirt stammen, und sind somit besonders in pharmazeutischen Zusammensetzungen nützlich, wenn sie mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger und/oder einem Verdünnungsmittel kombiniert sind. Das Antigen oder Teile desselben können als Fusion mit anderen Proteinen exprimiert werden.

[0041] Expressionsvektoren sind typischerweise selbstreplizierende DNA- oder RNA-Konstrukte, die das gewünschte Antigen oder dessen Fragmente enthalten, üblicherweise operativ verbunden mit geeigneten genetischen Kontrollelementen, die in einer geeigneten Wirtszelle erkannt werden. Diese Kontrollelemente können in einem geeigneten Wirt die Expression bewirken. Die spezifische Art der Kontrollelemente, die notwendig sind, um die Expression zu bewirken, wird von der jeweils verwendeten Wirtszelle abhängen. Im Allgemeinen können die genetischen Kontrollelemente ein prokaryontisches Promotorsystem oder ein eukaryontisches Promotor-Expressions-Kontrollsystem umfassen, und typischerweise umfassen sie einen transkriptionellen Promotor, einen optionalen Operator, um den Beginn der Transkription zu kontrollieren, einen Transkriptions-Enhancer, um das Ausmaß der mRNA-Expression zu erhöhen, eine Sequenz, die eine geeignete Ribosomen-Bindungsstelle kodiert, und Sequenzen, die Transkription und Translation beenden. Expressionsvektoren enthalten üblicherweise einen Replikations-Ursprung, der es dem Vektor erlaubt, sich unabhängig von der Wirtszelle zu vermehren. Verfahren zur Amplifikation der Vektor-Kopienzahl sind ebenfalls bekannt, siehe zum Beispiel Kaufman, et al. (1985) *Molec. and Cell. Biol.* 5: 1750–1759.

[0042] Die Vektoren der vorliegenden Erfindung umfassen DNA, die ein Primaten-CTLA-8-Protein oder ein Fragment desselben kodiert, wobei typischerweise ein biologisch aktives Polypeptid kodiert wird. Die DNA kann unter der Kontrolle eines viralen Promotors sein, und sie kann einen Selektionsmarker kodieren. Die Erfindung schlägt darüber hinaus die Verwendung solcher Expressionsvektoren vor, die eine eukaryontische cDNA, welche ein CTLA-8-Protein kodiert, in einem prokaryontischen oder eukaryontischen Wirt exprimieren können, wobei der Vektor mit dem Wirt kompatibel ist und wobei die eukaryontische cDNA, die das Antigen kodiert, so in den Vektor inseriert ist, dass das Wachstum des den Vektor enthaltenden Wirts die betreffende cDNA exprimiert. Üblicherweise sind Expressionsvektoren für eine stabile Replikation in ihren Wirtszellen konstruiert, oder für die Amplifikation, um die Gesamtzahl der Kopien des gewünschten Gens pro Zelle stark zu erhöhen. Es ist nicht immer notwendig, zu fordern, dass sich ein Expressionsvektor in einer Wirtszelle repliziert; es ist zum Beispiel möglich, eine transiente Expression des Antigens oder seiner Fragmente in unterschiedlichen Wirten zu bewirken, wobei Vektoren verwendet werden, die keinen Replikations-Ursprung enthalten, der durch die Wirtszelle erkannt wird. Es ist auch möglich, Vektoren zu verwenden, die mittels Rekombination eine Integration eines Gens für ein CTLA-8-Protein oder seiner Fragmente in die Wirts-DNA bewirken, oder einen Promotor zu integrieren, der die Expression eines endogenen Gens kontrolliert.

[0043] Wie vorliegend verwendet umfassen Vektoren Plasmide, Viren, Bakteriophagen, integrierbare DNA-Fragmente und andere Vehikel, die eine Integration von DNA-Fragmenten ins Genom des Wirts ermöglichen. Expressionsvektoren sind spezialisierte Vektoren, die genetische Kontrollelemente enthalten, welche die Expression von operativ verbundenen Genen bewirken. Plasmide sind die am häufigsten verwendete Form eines Vektors; alle anderen Formen von Vektoren, die eine äquivalente Funktion erfüllen, und die im Stand der Technik bekannt sind oder bekannt werden, sind jedoch vorliegend zur Verwendung geeignet. Siehe zum Beispiel Pouwels, et al. (1985 und Ergänzungsbände) *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, N.Y., und Rodriguez, et al. (1988) (Hrsg.) *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworth, Boston, MA.

[0044] Transformierte Zellen umfassen Zellen, vorzugsweise von Säugern, die mit Vektoren transformiert oder transfiziert wurden, welche ein CTLA-8-Gen enthalten und typischerweise unter Verwendung von rekombinanten DNA-Techniken konstruiert wurden. Transformierte Zellen exprimieren üblicherweise das Antigen oder dessen Fragmente; zum Zweck der Klonierung, Amplifikation und Manipulation ihrer DNA müssen sie das Protein jedoch nicht exprimieren. Die Erfindung schlägt ferner vor, transformierte Zellen in einem Nährmedium zu kultivieren, wodurch sich das Protein in der Kultur anreichern kann. Das Protein kann entweder aus der Kultur oder aus dem Kulturmedium gewonnen werden.

[0045] Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung sind DNA-Sequenzen operativ verbunden, wenn sie funktionell miteinander verwandt sind. Beispielsweise ist die DNA für eine Vorläufer-Sequenz oder für eine sekretorische Leader-Sequenz operativ mit einem Polypeptid verbunden, wenn sie als Prä-Protein exprimiert wird oder daran beteiligt ist, das Polypeptid zur Zellmembran zu dirigieren oder es zu sekretieren. Ein Promotor ist operativ mit der kodierenden Sequenz verbunden, wenn er die Transkription des Polypeptids kontrolliert; eine Ribosomen-Bindungsstelle ist operativ mit der kodierenden Sequenz verbunden, wenn sie derart positioniert ist, dass sie die Translation erlaubt. Üblicherweise bedeutet operativ verbunden zusammenhängend und im gleichen Leserahmen; bestimmte genetische Elemente wie Repressor-Gene sind jedoch nicht zusammenhängend verbunden und binden dennoch an Operator-Sequenzen, die wiederum die Expression kontrollieren.

[0046] Geeignete Wirtszellen umfassen Prokaryonten, niedrige Eukaryonten und höhere Eukaryonten. Prokaryonten umfassen sowohl gramnegative als auch grampositive Organismen, zum Beispiel *E. coli* und *B. sub-*

tilis. Niedrige Eukaryonten umfassen Hefen, zum Beispiel *S. cerevisiae* und *Pichia*, sowie Spezies der Art *Dictyostelium*. Höhere Eukaryonten umfassen etablierte Zellkulturlinien von tierischen Zellen, sowohl von Nicht-Säugetieren, wie zum Beispiel von Insekten und Vögeln, als auch von Säugetieren, wie zum Beispiel von Menschen, Primaten und Nagern.

[0047] Prokaryontische Wirt-Vektor-Systeme umfassen eine große Vielzahl von Vektoren für viele verschiedene Spezies. Wie vorliegend verwendet wird *E. coli* und seine Vektoren generisch verwendet, sodass äquivalente Vektoren, die in anderen Prokaryonten verwendet werden, eingeschlossen sind. Ein repräsentativer Vektor zur Amplifikation von DNA ist pBR322 oder viele seiner Derivate. Vektoren, die verwendet werden können, um die CTLA-8-Proteine oder deren Fragmente zu exprimieren, umfassen (sind jedoch nicht beschränkt auf) solche Vektoren wie jene, die den lac-Promotor (pUC-Serie); den trp-Promotor (pBR322-trp); den lpp-Promotor (die pIN-Reihe); die lambda-pP- oder pR-Promotoren (pOTS); oder Hybrid-Promotoren wie ptac (pDR540) umfassen. Siehe Brosius, et al. (1988) "Expression Vectors Employing Lambda-, trp-, lac-, and lpp-derived Promoters", in Rodriguez und Denhardt (Hrsg.) Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworth, Boston, Kapitel 10, Seiten 205–236.

[0048] Niedrige Eukaryonten, zum Beispiel Hefen und *Dictyostelium*, können mit Vektoren transformiert werden, die CTLA-8-Proteine kodieren. Für die Zwecke dieser Erfindung ist der gebräuchlichste niedrige eukaryontische Wirt die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Sie wird generisch verwendet werden, um niedrige Eukaryonten zu repräsentieren, obwohl mehrere andere Stämme und Spezies ebenfalls verfügbar sind. Hefe-Vektoren bestehen typischerweise aus einem Replikations-Ursprung (sofern nicht vom Integrationstyp), einem Selektions-Gen, einem Promotor, einer für das gewünschte Protein oder dessen Fragmente kodierenden DNA und Sequenzen zur Termination der Translation, zur Poly-Adenylierung und zur Termination der Transkription. Geeignete Expressions-Vektoren für Hefe umfassen konstitutive Promotoren, wie den Promotor der 3-Phosphoglycerat-Kinase und Gen-Promotoren zahlreicher anderer glykolytischer Enzyme, oder solche induzierbare Promotoren, wie zum Beispiel den Alkohol-Dehydrogenase-2-Promotor oder den Metallothionin-Promotor. Geeignete Vektoren umfassen Derivate der folgenden Typen: selbstreplizierende Vektoren mit niedriger Kopienzahl (wie die YRp-Serie), selbstreplizierende Vektoren mit hoher Kopienzahl (wie die YEp-Serie); integrative Typen (wie die Ylp-Serie), oder Mini-Chromosomen (wie die YCp-Serie).

[0049] Gewebekultur-Zellen höherer Eukaryonten sind die bevorzugten Wirtszellen zur Expression des funktionell aktiven CTLA-8-Proteins. Im Prinzip können viele höhere, eukaryontische Gewebekultur-Zelllinien verwendet werden, entweder von Invertebraten oder von Vertebraten, zum Beispiel Insekten-Baculovirus-Expressions-Systeme. Säugerzellen sind jedoch aufgrund der Prozessierung sowohl in co-translationalen als auch in posttranslationalen Stadien bevorzugt. Die Transformation oder Transfektion und die Vermehrung solcher Zellen ist ein Routinevorgang geworden. Beispiele für nützliche Zelllinien umfassen HeLa-Zellen, Zelllinien von Ovarien des chinesische Hamster (CHO), Zelllinien von Babyratten-Nieren (BRK-), Insekten-Zelllinien, Vogel-Zelllinien und Affen- (COS-) Zelllinien. Expressions-Vektoren für solche Zelllinien umfassen üblicherweise einen Replikations-Ursprung, einen Promotor, eine Translations-Initiations-Stelle, Stellen zum RNA-Splicing (wenn genomische DNA verwendet wird), eine Poly-Adenylierungsstelle, und eine Transkriptions-Terminations-Stelle. Diese Vektoren umfassen üblicherweise auch ein Selektions-Gen oder ein Amplifikations-Gen. Geeignete Expressions-Vektoren können Plasmide, Viren, oder Retroviren sein, die Promotoren aufweisen, die von Quellen wie dem Adenovirus, dem SV40, dem Parvovirus, dem Vacciniavirus, oder dem Cytomegalievirus abgeleitet sind. Repräsentative Beispiele für geeignete Expressions-Vektoren umfassen pCDNA1; pCD, siehe Okayama, et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5: 1136–1142; pMC1neo Poly-A, siehe Thomas, et al. (1987) Cell 51: 503–512; und einen Baculovirus-Vektor wie zum Beispiel pAC 373 oder pAC 610, siehe O'Reilly, et al. (1992) Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual Freeman and Co., CRC Press, Boca Raton, Fla.

[0050] Es wird oftmals erwünscht sein, ein Primaten-CTLA-8-Protein oder -Polypeptid in einem System zu exprimieren, das zu einem spezifischen oder definierten Glykosylierungs-Muster führt. In diesem Fall wird das übliche Muster jenes sein, das natürlicherweise vom Expressions-System bereitgestellt wird. Das Muster wird jedoch dadurch modifizierbar sein, dass das Polypeptid (zum Beispiel in unglykosylierter Form) geeigneten Glykosylierungs-Proteinen ausgesetzt wird, die in ein heterologes Expressions-System eingebracht wurden. Zum Beispiel kann das Gen für das CTLA-8-Protein mit einem oder mit mehreren Genen, die Säuger-Glykosylierungs-Enzyme oder andere Glykosylierungs-Enzyme kodieren, co-transformiert werden. Durch Verwendung dieses Verfahrens können bestimmte Säuger-spezifische Glykosylierungsmuster in prokaryontischen oder in anderen Zellen erreicht oder annähernd erreicht werden.

[0051] Das Primaten-CTLA-8-Protein oder dessen Fragmente können so konstruiert werden, dass sie über Phosphatidyl-Inositol (PI) mit einer Zellmembran verbunden sind; sie können aber durch Behandlung mit ei-

nem Phosphatidyl-Inositol-spaltenden Enzym von den Membranen entfernt werden, zum Beispiel durch Phosphatidyl-Inositol-Phospholipase-C. Dies setzt das Antigen in biologisch aktiver Form frei und erlaubt die Reinigung mittels Standardverfahren der Proteinchemie. Siehe zum Beispiel Low (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 988: 427–454; Tse, et al. (1985) *Science* 230: 1003–1008; und Brunner, et al. (1991) *J. Cell. Biol.* 114: 1275–1283.

[0052] Nachdem das CTLA-8-Protein nunmehr charakterisiert wurde, können Fragmente oder Derivate desselben durch herkömmliche Verfahren der Peptidsynthese hergestellt werden. Diese umfassen Prozesse, wie sie in Stewart und Young (1984) *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Co., Rockford, IL; Bodanszky und Bodanszky (1984) *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, New York; und Bodanszky (1984) *The Principles of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, New York, beschrieben sind. Zum Beispiel kann ein Azid-Prozess, ein Säure-Chlorid-Prozess, ein Säureanhydrid-Prozess, ein gemischter Anhydrid-Prozess, ein Prozess mit einem aktivierten Ester (zum Beispiel p-Nitrophenyl-Ester, N-Hydroxy-Succinimid-Ester, oder Cyan-Methyl-Ester), ein Carbodiimidazol-Prozess, ein Oxidations-Reduktions-Prozess oder ein Dicyclohexylcarbodiimid(DCCD-)/additiver Prozess verwendet werden. Sowohl Festphasen-Synthesen als auch Synthesen in flüssiger Phase sind in den obigen Prozessen anwendbar.

[0053] Das Primaten-CTLA-8-Protein, Fragmente oder Derivate werden in Übereinstimmung mit den oben dargestellten Prozessen hergestellt, wie sie typischerweise bei Peptidsynthesen eingesetzt werden, im Allgemeinen entweder durch einen sogenannten schrittweise erfolgenden Prozess, bei dem man eine Aminosäure an die terminale Aminosäure kondensiert, eine nach der anderen entsprechend der Sequenz; oder durch Kopplung von Peptidfragmenten an die terminale Aminosäure. Aminogruppen, die bei der Kopplungsreaktion nicht verwendet werden, sind typischerweise geschützt, um eine Kopplung an einer falschen Stelle zu verhindern.

[0054] Wenn eine Festphasen-Synthese eingesetzt wird, ist die C-terminale Aminosäure über ihre Carboxygruppe an einen unlöslichen Träger oder eine Auflage gebunden. Die Wahl des unlöslichen Trägers ist nicht besonders eingeschränkt, solange dieser eine Bindungskapazität für eine reaktive Carboxygruppe hat. Beispiele für derartige unlösliche Träger umfassen Halogenmethyl-Harze, wie zum Beispiel Chlormethyl-Harz oder Brommethyl-Harz, Hydroxymethyl-Harze, Phenol-Harze, tert-Alkyloxycarbonyl-Hydrazin-Harze und dergleichen.

[0055] Eine Aminosäure mit geschützten Aminogruppen wird entsprechend der Sequenz durch Kondensation ihrer aktivierten Carboxygruppe mit der reaktiven Aminogruppe des vorher gebildeten Peptids oder der vorher gebildeten Kette verbunden, um das Peptid Schritt für Schritt zu synthetisieren. Nach der Synthese der vollständigen Sequenz wird das Peptid vom unlöslichen Träger abgespalten, um das Peptid zu erhalten. Diese Festphasen-Methode wurde von Merrifield, et al. (1963) in *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149–2156 allgemein beschrieben.

[0056] Das produzierte Protein und Fragmente desselben können aus der Reaktionsmischung mittels Peptidabtrennung isoliert und gereinigt werden, zum Beispiel durch Extraktion, Fällung, Elektrophorese sowie durch unterschiedliche Formen der Chromatographie und ähnlichem. Die Primaten-CTLA-8-Proteine der vorliegenden Erfindung können, abhängig von der gewünschten Verwendung, in unterschiedlichen Reinheitsgraden erhalten werden. Die Aufreinigung kann durch die vorliegend offenbarten Protein-Aufreinigungstechniken erreicht werden, oder durch Verwendung der vorliegend beschriebenen Antikörper in einer Immunoabsorbant-Affinitätschromatographie. Diese Immunoabsorbant-Affinitätschromatographie wird durchgeführt, indem zunächst die Antikörper an einen festen Träger gebunden werden und anschließend die gebundenen Antikörper mit solubilisierten Lysaten von geeigneten Ausgangszellen in Kontakt gebracht werden, oder mit Lysaten von anderen Zellen, die das Protein exprimieren, oder mit Lysaten oder Überständen von Zellen, welche das CTLA-8-Protein als Ergebnis von DNA-Techniken produzieren, wie es nachstehend beschrieben ist.

V. Physikalische Varianten

[0057] Diese Erfindung umfasst auch Proteine oder Peptide, die eine wesentliche Aminosäuresequenz-Homologie in Bezug auf die Aminosäuresequenz des CTLA-8-Proteins aufweisen. Die Varianten umfassen Spezies-spezifische oder allelische Varianten.

[0058] Aminosäuresequenz-Homologie oder Sequenz-Identität wird durch Optimieren von Übereinstimmungen hinsichtlich der Reste bestimmt, falls notwendig, durch Einführung von entsprechend erforderlichen Lücken. Dies ändert sich, wenn konservative Austausche als Übereinstimmungen gewertet werden. Konservative

Austausche umfassen typischerweise Austausche innerhalb der folgenden Gruppe: Glycin, Alanin; Valin, Iso-leucin, Leucin; Asparaginsäure, Glutaminsäure; Asparagin, Glutamin; Serin, Threonin; Lysin, Arginin; und Phenylalanin, Tyrosin. Homologe Aminosäuresequenzen sollen typischerweise natürliche allelische Variationen und zwischen Spezies auftretende Variationen in jeder der betreffenden Proteinsequenz umfassen. Typische homologe Proteine oder Peptide werden von 50–100 Homologie (falls Lücken eingeführt werden dürfen) bis 80–100 Homologie (falls konservative Austausche einbezogen werden) mit der Aminosäuresequenz eines Primaten-CTLA-8-Proteins aufweisen. Identitätsgrade werden mindestens etwa 60%, im Allgemeinen mindestens etwa 65%, oftmals mindestens etwa 70%, typischerweise mindestens etwa 75%, üblicherweise mindestens etwa 80%, noch üblicher mindestens etwa 84%, bevorzugt mindestens etwa 87%, und noch bevorzugter mindestens etwa 90% und in besonders bevorzugten Ausführungsformen mindestens etwa 95% oder mehr betragen. Siehe auch Needleham, et al. (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443–453; Sankoff, et al. (1983) Chapter One in *Time Warps, String Edits, and Macromolecules: The Theory and Practice of Sequence Comparison* Addison-Wesley, Reading, MA; and software packages from IntelliGenetics, Mountain View, CA; und die University of Wisconsin Genetics Computer Group, Madison, WI. Die Fragmente umfassen alle Kombinationen von Längen, Identitätsgraden, und Termini, wie in den beschriebenen Sequenzen dargestellt ist.

[0059] Die isolierte DNA, die ein CTLA-8-Protein kodiert, kann problemlos durch Nukleotid-Austausche, Nukleotid-Deletionen, Nukleotid-Insertionen und Inversion von Nukleinsäureabschnitten verändert werden. Diese Veränderungen ergeben neue DNA-Sequenzen, die diese Antigene, ihre Derivate oder Proteine mit ähnlicher physiologischer, immunogener oder antigener Aktivität kodieren. Diese veränderten Sequenzen können verwendet werden, um mutierte Antigene herzustellen, oder um die Expression zu verstärken. Die verstärkte Expression kann eine Gen-Amplifikation, eine erhöhte Transkription, eine erhöhte Translation und andere Mechanismen umfassen. Solche mutierten Derivate des CTLA-8-Proteins umfassen vorbestimmte oder ortsspezifische Mutationen des betreffenden Proteins oder seiner Fragmente. "Mutiertes CTLA-8-Protein" umfasst ein Polypeptid, das in die Definition der Homologie für das oben beschriebene humane CTLA-8-Protein fallen würde, jedoch eine Aminosäuresequenz aufweist, die sich von dem in der Natur vorgefundenen CTLA-8-Protein unterscheidet, entweder durch Deletion, Austausch oder Insertion. Ein "ortsspezifisch mutiertes Primaten-CTLA-8-Protein" umfasst im Allgemeinen insbesondere Proteine, die signifikante Homologie mit einem Protein aufweisen, das Sequenzen von SEQ ID NO: 4, 6 oder 8 hat, und die verschiedene biologische Aktivitäten mit diesen Sequenzen gemeinsam haben, zum Beispiel antigene oder immunogene Aktivität, und die in bevorzugten Ausführungsformen den Großteil der offenbarten Sequenzen enthalten. Ähnliche Konzepte sind bei verschiedenen CTLA-8-Proteinen anwendbar, insbesondere bei denjenigen, die in verschiedenen Primaten gefunden werden, zum Beispiel in Affen und Gibbons. Wie schon zuvor erwähnt, wird nochmals betont, dass die Beschreibungen allgemein zu verstehen sind und alle CTLA-8-Proteine einschließen, und nicht auf die spezifisch diskutierte humane Ausführungsform beschränkt sind.

[0060] Obwohl ortsspezifische Mutationsstellen vorbestimmt sind, müssen Mutanten nicht ortsspezifisch sein. Die Mutagenese von CTLA-8-Protein kann durch Erzeugen von Aminosäure-Insertionen oder -Deletionen durchgeführt werden. Austausche, Insertionen, Deletionen oder beliebige Kombinationen können durchgeführt werden, um ein endgültiges Konstrukt zu erhalten. Insertionen umfassen amino- oder carboxy-terminale Fusionen. Eine randomisierte Mutagenese kann an einem Ziel-Codon durchgeführt werden, und die exprimierten Mutanten können auf die erwünschte Aktivität hin durch Screening untersucht werden. Verfahren zur Erzeugung von Austausch-Mutationen an vorbestimmten Positionen in einer DNA mit bekannter Sequenz sind im Stand der Technik hinreichend bekannt, zum Beispiel durch M13-Primer-Mutagenese oder Polymerasekettenreaktion (PCR). Siehe auch Sambrook, et al. (1989) und Ausubel, et al. (1987 und Ergänzungsbände).

[0061] Die Mutationen in der DNA sollten normalerweise die kodierenden Sequenzen nicht aus dem Leserahmen bringen und vorzugsweise keine komplementären Regionen erzeugen, die hybridisieren können, wobei mRNA-Sekundärstrukturen, wie Schleifen oder Haarnadelschleifen („hairpins“) entstehen.

[0062] Die vorliegende Erfindung stellt ferner rekombinante Proteine bereit, zum Beispiel heterologe Fusionsproteine, wobei Segmente dieser Proteine verwendet werden. Ein heterologes Fusionsprotein ist eine Fusion von Proteinen oder Segmenten, die natürlicherweise nicht in der gleichen Art zusammengefügt sind. Somit ist das Fusionsprodukt eines Immunglobulins mit einem CTLA-8-Protein ein kontinuierliches Proteinmolekül, das Sequenzen enthält, die durch eine typische Peptidbindung zusammengefügt sind, und das typischerweise als ein einziges Translationsprodukt hergestellt wird, und Eigenschaften aufweist, die sich von jedem der Ursprungspeptide herleiten. Ein ähnliches Konzept gilt für heterologe Nukleinsäuresequenzen.

[0063] Zusätzlich können neue Konstrukte durch Kombination ähnlicher funktioneller Domänen aus anderen Proteinen hergestellt werden. Zum Beispiel können Antigen-Bindungs-Segmente oder andere Segmente zwi-

schen verschiedenen neuen Fusions-Polypeptiden oder Fragmenten ausgetauscht werden. Siehe zum Beispiel Cunningham, et al. (1989) Science 243: 1330–1336; und O'Dowd, et al. (1988) J. Biol. Chem. 263: 15985–15992. Somit werden durch die funktionelle Verknüpfung von biologisch relevanten Domänen und anderen Domänen neue chimäre Polypeptide entstehen, die neue Kombinationen von Spezifitäten aufweisen.

[0064] Das von Beaucage und Carruthers (1981) in Tetra. Letts. 22: 1859–1862 beschriebene Phosphoramidit-Verfahren wird geeignete synthetische DNA-Fragmente erzeugen. Ein doppelsträngiges Fragment wird oftmals entweder durch Synthese des komplementären Strangs und Zusammenfügen beider Stränge unter geeigneten Bedingungen oder durch die Addition des komplementären Strangs unter Nutzung einer DNA-Polymerase mit einer geeigneten Primersequenz, z.B. mittels PCR-Techniken, erhalten werden.

Funktionelle Varianten

[0065] Die Blockierung der physiologischen Reaktion auf CTLA-8-Proteine kann aus der Inhibierung der Bindung des Antigens an seinen natürlichen Bindungspartner resultieren, zum Beispiel durch kompetitive Inhibierung. Somit werden die erfindungsgemäßen in vitro Assays oftmals isoliertes Protein, Membranen von Zellen, die ein rekombinantes membranassoziiertes CTLA-8-Protein exprimieren, lösliche Fragmente, die Bindungssegmente enthalten, oder Fragmente, die an Festphasen-Substrate angeheftet sind, verwenden. Diese Assays werden ferner die diagnostische Bestimmung von Wirkungen erlauben, die entweder auf Mutationen und Modifikationen der Bindungssegmente oder auf Mutationen und Modifikationen der Proteine beruhen, z.B. Analoga.

[0066] Die vorliegende Erfindung schlägt darüber hinaus die Verwendung von kompetitiven Wirkstoff-Screening-Assays vor, bei denen beispielsweise neutralisierende Antikörper gegen ein Antigen oder Fragmente von Bindungspartnern mit einer Testsubstanz um die Bindung an das Protein konkurrieren. Auf diese Weise können die Antikörper verwendet werden, um die Anwesenheit eines beliebigen Polypeptids nachzuweisen, das eine oder mehrere Antigen-Bindungsstellen mit dem Protein gemeinsam hat, und die Antikörper können ferner verwendet werden, um Bindungsstellen auf dem Protein zu besetzen, die ansonsten mit einem Bindungspartner in Wechselwirkung treten könnten.

[0067] Darüber hinaus können neutralisierende Antikörper gegen das CTLA-8-Protein und lösliche Fragmente des Antigens, die eine Rezeptor-Bindungsstelle mit hoher Affinität aufweisen, verwendet werden, um die Antigen-Funktion in Geweben zu inhibieren, zum Beispiel in Geweben, die eine abnorme Physiologie aufweisen.

[0068] „Derivate“ eines Primaten-CTLA-8-Protein-Antigens umfassen Aminosäuresequenz-Mutanten, Glykosylierungs-Varianten und kovalente oder aggregierte Konjugate mit anderen chemischen Einheiten. Kovalente Derivate können durch im Stand der Technik hinreichend bekannte Verfahren mittels Verknüpfung von funktionellen Einheiten mit Gruppen hergestellt werden, die in den Aminosäure-Seitenketten der CTLA-8-Proteine oder am N- bzw. C-Terminus gefunden werden. Diese Derivate können (ohne Einschränkung) aliphatische Ester oder Amide des Carboxy-Terminus oder von Aminosäuren mit Carboxy-Seitenketten, O-Acyl-Derivate von Hydroxylgruppen enthaltenden Aminosäuren, und N-Acyl-Derivate der aminoterminalen Aminosäure oder von Aminosäuren mit Amino-Seitenketten, zum Beispiel Lysin oder Arginin, enthalten. Acyl-Gruppen sind aus der Gruppe von Alkylresten ausgewählt, die C3- bis C18-Normalalkyl umfassen, wodurch Alkanoyl Aroyl-Spezies gebildet werden. Eine kovalente Bindung an Träger-Proteine könnte von Bedeutung sein, wenn die immunogenen Einheiten Haptene sind.

[0069] Insbesondere sind Veränderungen der Glykosylierung eingeschlossen, die beispielsweise durch Modifikation der Glykosylierungsmuster eines Polypeptids während seiner Synthese und Verarbeitung oder in weiteren Verarbeitungsschritten erzeugt werden. Ein besonders bevorzugtes Mittel zum Erreichen dieses Ziels ist die Inkubation des Polypeptids mit glykosylierenden Enzymen, die aus Zellen erhalten wurden, welche normalerweise eine derartige Verarbeitung durchführen, zum Beispiel Glykosylierungsenzyme aus Säugern. Deglykosylierungsenzyme werden ebenfalls vorgeschlagen. Ebenfalls einbezogen sind Versionen der gleichen primären Aminosäuresequenz, die andere geringfügige Modifikationen aufweisen, einschließlich phosphorylierter Aminosäurereste, zum Beispiel Phosphotyrosin, Phosphoserin oder Phosphothreonin.

[0070] Eine Hauptgruppe von Derivaten sind kovalente Konjugate aus CTLA-8-Protein oder Fragmenten desselben und anderen Proteinen oder Polypeptiden. Diese Derivate können in rekombinanter Kultur synthetisiert werden, wie zum Beispiel als N- oder C-terminale Fusionen, oder durch Einsatz von Mitteln, die im Stand der Technik für ihre Nützlichkeit zur Quervernetzung von Proteinen über reaktive Seitengruppen bekannt sind. Bevorzugte Positionen im Antigen, um mit Quervernetzungsreagenzien Derivate zu bilden, sind freie Aminogruppen

pen, Kohlenhydrat-Einheiten und Cystein-Reste.

[0071] Fusions-Polypeptide zwischen Primaten-CTLA-8-Proteinen und anderen homologen oder heterologen Proteinen werden ebenfalls bereitgestellt. Homologe Polypeptide können Fusionen zwischen unterschiedlichen Oberflächenmarkern sein, die zum Beispiel zu einem Hybridprotein führen, das eine Rezeptorbindungsspezifität zeigt. In ähnlicher Weise können heterologe Fusionen konstruiert werden, die eine Kombination der Eigenschaften oder Aktivitäten der Derivatproteine ausweisen. Typische Beispiele sind Fusionen aus einem Reporter-Polypeptid, zum Beispiel Luziferase, und einem Segment oder einer Domäne eines Antigens, zum Beispiel einem Rezeptor-bindenden Segment, so dass die Anwesenheit oder die Lokalisierung des fusionierten Antigens problemlos bestimmt werden kann. Siehe zum Beispiel Dull, et al., U.S. Patent No. 4,859,609. Andere Gen-Fusionspartner umfassen die bakterielle β -Galaktosidase, trpE, Protein A, β -Laktamase, α -Amylase, Alkoholdehydrogenase und den α -Mating-Faktor der Hefe. Siehe zum Beispiel Godowski, et al. (1988) Science 241: 812–816.

[0072] Das von Beaucage und Carruthers (1981) in Tetra. Letts. 22: 1859–1862 beschriebene Phosphoramidit-Verfahren wird geeignete synthetische DNA-Fragmente erzeugen. Ein doppelsträngiges Fragment wird oftmals entweder durch Synthese des komplementären Strangs und Zusammenfügen beider Stränge unter geeigneten Bedingungen oder durch die Addition des komplementären Strangs unter Verwendung einer DNA-Polymerase mit einer geeigneten Primersequenz, z.B. mittels PCR-Techniken, erhalten werden.

[0073] Solche Polypeptide können auch Aminosäure-Reste aufweisen, die durch Phosphorylierung, Sulfonierung, Biotinylierung, oder durch Addition oder Entfernung von anderen Resten chemisch modifiziert wurden, insbesondere solche, die eine ähnliche molekulare Gestalt wie Phosphatgruppen aufweisen. In einigen Ausführungsformen werden die Modifikationen nützliche Markierungsreagenzien sein oder als Zielmoleküle bei der Aufreinigung geeignet sein, zum Beispiel in Form von Affinitätsliganden.

[0074] Fusionsproteine werden typischerweise entweder durch rekombinante Nukleinsäure-Verfahren oder durch synthetische Polypeptid-Verfahren hergestellt werden. Techniken zur Manipulation von Nukleinsäuren sind z.B. in Sambrook, et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2. Ausgabe), Bände 1–3, Cold Spring Harbor Laboratory, allgemein beschrieben. Techniken zur Synthese von Polypeptiden sind zum Beispiel in Merrifield, et al. (1963) in J. Am. Chem. Soc. 85: 2149–2156; Merrifield (1986) Science 232: 341–347; und Atherton, et al. (1989) Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford, beschrieben.

[0075] Die vorliegende Erfindung schlägt ferner die Verwendung anderer Derivate von CTLA-8-Proteinen vor, die weder Variationen bezüglich der Aminosäuresequenz noch Variationen der Glykosylierung sind. Solche Derivate können kovalente oder aggregierte Zusammenlagerungen mit chemischen Resten einschließen. Diese Derivate fallen in die drei allgemeinen Klassen: (1) Salze, (2) kovalente Modifikationen von Seitenketten und terminalen Aminosäuren, und (3) Adsorptionskomplexe, zum Beispiel mit Zellmembranen. Solche kovalenten oder aggregierten Zusammenlagerungen sind nützlich als Immunogene, als Reagenzien in Immunassays, oder in Reinigungsverfahren, wie zum Beispiel bei der Affinitätsreinigung von Antigenen oder von anderen bindenden Proteinen. Zum Beispiel kann ein Primaten-CTLA-8-Antigen nach im Stand der Technik hinreichend bekannten Verfahren durch kovalente Bindung an einen festen Träger, wie zum Beispiel an Bromcyan-aktivierte Sepharose, immobilisiert werden, oder es kann an Polyolefin-Oberflächen adsorbiert werden, mit oder ohne Glutaraldehyd-Quervernetzung, um es im Assay einzusetzen oder um es zur Reinigung von Anti-CTLA-8-Protein-Antikörpern oder von seinem Rezeptor oder von anderen Bindungspartnern einzusetzen. Primaten-CTLA-8-Antigene können darüber hinaus mit einer detektierbaren Gruppe markiert werden; sie können zum Beispiel durch die Chloramin-T-Methode radioiodiniert werden, kovalent an seltene Erdchelate (earth chelates) gebunden werden, oder mit einem anderen fluoreszenten Rest gekoppelt werden, um sie in diagnostischen Assays einzusetzen. Die Reinigung von CTLA-8-Protein kann durch immobilisierte Antikörper oder Bindungspartner erreicht werden.

[0076] Ein erfindungsgemäßes, solubilisiertes CTLA-8-Antigen oder CTLA-8-Fragment kann als Immunogen zur Herstellung von Antisera oder Antikörpern verwendet werden, die spezifisch für das Protein oder für Fragmente desselben sind. Das gereinigte Antigen kann verwendet werden, um monoklonale Antikörper oder bindende Fragmente mittels Screening zu durchsuchen, die durch Immunisierung mit unterschiedlichen Formen unreiner Präparate, die das Protein enthalten, erzeugt wurden. Der Ausdruck „Antikörper“ umfasst insbesondere auch Antigen-bindende Fragmente von natürlichen Antikörpern. Die gereinigten CTLA-8-Proteine können auch als Reagenz verwendet werden, um beliebige Antikörper zu detektieren, die als Reaktion auf die Anwesenheit von erhöhten Mengen des Proteins oder von Zellfragmenten, die das Antigen enthalten, gebildet werden, wobei beides diagnostisch für einen abnormen oder spezifischen physiologischen oder krankhaften Zu-

stand sein kann. Zusätzlich können Antigen-Fragmente auch als Immunogene dienen, um die Antikörper der vorliegenden Erfindung herzustellen, wie direkt anschließend beschrieben wird. Die vorliegende Erfindung schlägt beispielsweise Antikörper vor, die gegen Aminosäuresequenzen erzeugt wurden, welche durch die Nukleotidsequenzen nach SEQ ID NO: 3, 5 oder 7 kodiert sind, oder gegen Proteinfragmente, die diese enthalten. Insbesondere werden in der vorliegenden Erfindung Antikörper vorgeschlagen, die Bindungsaffinität für spezifische Fragmente haben, von denen vorhergesagt wird, dass sie außerhalb der Lipid-Doppelschicht liegen, oder Antikörper, die gegen diese Fragmente erzeugt werden.

[0077] Die vorliegenden Erfindung schlägt die Isolierung von zusätzlichen Varianten aus nahe verwandten Spezies vor. Eine Southern-Blot Analyse ergab, dass ähnliche genetische Einheiten in anderen Säugern vorkommen, wie zum Beispiel in der Ratte und in der Maus. Es ist wahrscheinlich, dass CTLA-8-Proteine bei Spezies-Varianten weit verbreitet sind, zum Beispiel in Hylobates, Gorillas und Cercopitheciidae.

[0078] Die Erfindung stellt ferner Mittel bereit, um eine Gruppe verwandter Antigene zu isolieren, die sowohl Abweichungen als auch Ähnlichkeiten bezüglich der Struktur, Expression und Funktion aufweisen. Die Aufklärung vieler physiologischen Wirkungen des Antigens wird durch die Isolierung und Charakterisierung von unterschiedlichen Spezies-Varianten stark beschleunigt werden. Die vorliegende Erfindung stellt insbesondere nützliche Sonden bereit, um zusätzliche, homologe genetische Einheiten in unterschiedlichen Primaten-Spezies zu identifizieren.

[0079] Die isolierten Gene werden es erlauben, Zellen zu transformieren, denen die Expression eines entsprechenden CTLA-8-Proteins fehlt, z.B. entweder Spezies-Typen oder Zellen, denen entsprechende Antigene fehlen, und die eine negative Hintergrund-Aktivität aufweisen sollten. Die Expression transformierter Gene wird es erlauben, antigenisch reine Zelllinien mit definierten Varianten oder Einzelspezies-Varianten zu isolieren. Dieses Vorgehen wird eine sensitivere Detektion und Unterscheidung der physiologischen Wirkungen von CTLA-8-Proteinen ermöglichen. Subzelluläre Fragmente, zum Beispiel Zytoplasten oder Membranfragmente, können isoliert und verwendet werden.

[0080] Die Zergliederung der kritischen Strukturelemente, welche die unterschiedlichen physiologischen Funktionen oder Differenzierungs-Funktionen der Proteine bewirken, ist mit Standardtechniken der modernen Molekularbiologie möglich, insbesondere durch Vergleich mit Mitgliedern der verwandten Klasse. Siehe z.B. die Homolog-Scanning-Mutagenese-Technik, die in Cunningham, et al. (1989) Science 243: 1330–1336 beschrieben wird; und Verfahren wie sie von O'Dowd, et al. (1988) J. Biol. Chem. 263: 15985–15992; und Lechleiter, et al. (1990) EMBO J. 9: 4381–4390 verwendet wurden.

[0081] Funktionelle Domänen oder Segmente können zwischen Spezies-Varianten ersetzt werden, um zu bestimmen, welche strukturellen Eigenschaften sowohl für die Bindungspartner-Affinität als auch für die Bindungspartner-Spezifität sowie in der Signaltransduktion wichtig sind. Eine Ansammlung von unterschiedlichen Varianten wird verwendet werden, um mittels Screening nach Molekülen zu suchen, die kombinierte Eigenschaften bei der Wechselwirkung mit verschiedenen Spezies-Varianten der Bindungspartner aufweisen.

[0082] Unter gewissen Umständen kann eine Internalisierung des Antigens auftreten, und es kann eine Wechselwirkung zwischen intrazellulären Komponenten und „extrazellulären“ Proteinsegmenten, die in Wechselwirkungen involviert sind, auftreten. Die spezifischen Segmente im CTLA-8-Protein, die in Wechselwirkung mit anderen intrazellulären Komponenten treten, können durch Mutagenese identifiziert werden oder durch direkte biochemische Mittel, zum Beispiel durch Quervernetzungs- oder Affinitätsmethoden. Eine strukturelle Analyse durch Kristallographie oder andere physikalische Methoden werden ebenfalls anwendbar sein. Eine weitere Untersuchung zum Mechanismus der biologischen Funktion wird die Untersuchung von assoziierten Komponenten einschließen, die durch Affinitätsmethoden oder durch genetische Mittel isolierbar werden können, zum Beispiel durch Komplementationsanalyse von Mutanten.

[0083] Die Untersuchung der Expression und Kontrolle des CTLA-8-Proteins wird fortgesetzt werden. Die kontrollierenden Elemente, die mit den Antigenen assoziiert sind, können differentiell-entwicklungsbiologische, gewebespezifische, oder andere Expressionsmuster aufweisen. Stromaufwärts oder stromabwärts liegende genetische Regionen, zum Beispiel Kontrollelemente, sind von Interesse.

[0084] Strukturelle Studien des Antigens werden zum Erstellen neuer Varianten führen, insbesondere von Analoga, die Agonisten- oder Antagonisten-Eigenschaften auf Bindungspartner ausüben. Dies kann mit den bereits beschriebenen Screening-Verfahren kombiniert werden, um Varianten mit dem gewünschten Aktivitätsspektrum zu isolieren.

[0085] Die Expression in anderen Zelltypen wird oft zu Glykosylierungsunterschieden bei einem bestimmten Antigen führen. Unterschiedliche Spezies-Varianten können unterschiedliche Funktionen aufweisen, die auf Strukturunterschieden beruhen, welche nicht die Aminosäuresequenz betreffen. Unterschiedliche Modifikationen können für unterschiedliche Funktionen verantwortlich sein, und die Aufklärung dieser Wirkungen ist nunmehr möglich.

[0086] Somit stellt die vorliegende Erfindung wichtige Reagenzien bezüglich der Antigen-Bindungspartner-Interaktion bereit. Obwohl sich die obige Beschreibung vor allem auf das humane CTLA-8-Protein konzentrierte, wird der Fachmann sofort erkennen, dass die Erfindung auch andere Antigene umfasst, zum Beispiel Varianten von Affen und anderen Primaten-Spezies oder allelische Varianten sowie Varianten derselben.

Antikörper

[0087] Antikörper können gegen die unterschiedlichen CTLA-8-Proteine erzeugt werden, einschließlich Spezies-Varianten oder allelische Varianten und Fragmente derselben, sowohl in ihren natürlich vorkommenden Formen als auch in ihren rekombinanten Formen. Darüber hinaus können Antikörper gegen CTLA-8-Proteine sowohl in ihren aktiven Formen als auch in ihren inaktiven Formen erzeugt werden. Auch anti-idiotypische Antikörper werden vorgeschlagen.

[0088] Antikörper, einschließlich Bindungsfragmente und Einzelkettenversionen, können gegen vorbestimmte Fragmente der Antigene durch Immunisierung von Tieren mit Konjugaten der Fragmente mit immunogenen Proteinen erzeugt werden. Monoklonale Antikörper werden ausgehend von Zellen hergestellt, die den gewünschten Antikörper sekretieren. Diese Antikörper können mittels Screening darauf untersucht werden, ob sie an normale oder defekte CTLA-8-Proteine binden, oder sie können auf agonistische oder antagonistische Aktivitäten untersucht werden, die beispielsweise durch einen Bindungspartner vermittelt werden. Diese monoklonalen Antikörper werden üblicherweise mindestens mit einem K_D von etwa 1 mM binden, noch üblicher von mindestens etwa 300 μ M, typischerweise von mindestens etwa 10 μ M, noch typischer von mindestens etwa 30 μ M, bevorzugt von mindestens etwa 10 μ M, und noch bevorzugter von mindestens etwa 3 μ M oder besser.

[0089] Die erfindungsgemäßen Antikörper, einschließlich Antigenbindende Fragmente, können signifikanten diagnostischen oder therapeutischen Wert haben. Sie können wirkungsvolle Antagonisten sein, die an einen Bindungspartner binden, und die Antigen-Bindung verhindern, oder sie können die Fähigkeit eines Antigens, eine biologische Reaktion zu bewirken, verhindern. Sie können ferner als nicht-neutralisierende Antikörper nützlich sein und können an Toxine oder Radionuklide gekoppelt werden, so dass bei Bindung des Antikörpers an das Antigen, eine Zelle, die dieses exprimiert, z.B. an seiner Oberfläche, getötet wird. weiterhin können diese Antikörper an Wirkstoffe oder anderen therapeutische Mittel gekoppelt werden, entweder direkt oder indirekt mittels eines Verbindungsmoleküls (linker), und sie können dadurch ein gezieltes Targeting bewirken.

[0090] Die Antikörper der vorliegenden Erfindung können auch in diagnostischen Anwendungen nützlich sein. Als Capture-Antikörper oder nicht-neutralisierende Antikörper können sie mittels Screening auf die Fähigkeit untersucht werden, an die Antigene zu binden, ohne die Bindung durch einen Partner zu inhibieren. Als neutralisierende Antikörper können sie in kompetitiven Assays nützlich sein. Sie werden ferner bei der Detektion oder Quantifizierung von CTLA-8-Protein oder seinen Bindungspartnern nützlich sein. Siehe zum Beispiel Chan (Hrsg.) (1987) Immunoassay: A Practical Guide Academic Press, NY; und Price und Newman (Hrsg.) (1991) Principles and Practice of Immunoassay Stockton Press, NY.

[0091] Antigen-Fragmente können mit anderen Materialien verbunden werden, insbesondere mit Polypeptiden, um in Form von fusionierten oder kovalent verbundenen Polypeptide als Immunogene eingesetzt zu werden. Ein Antigen und dessen Fragmente können mit einer Vielzahl von Immunogenen fusioniert oder kovalent verbunden werden, wie zum Beispiel mit Keyhole-Limpet-Hämocyanin, Rinderserumalbumin, Tetanustoxin, usw. Siehe Microbiology, Hoeber Medical Division, Harper and Row, 1969; Landsteiner (1962) Specificity of Serological Reactions, Dover Publications, New York, und Williams, et al. (1967) Methods in Immunology and Immunochemistry, Band 1, Academic Press, New York, für Beschreibungen von Verfahren zur Herstellung polyclonaler Antisera. Ein typisches Verfahren umfasst die Hyperimmunisierung eines Tieres mit einem Antigen. Das Blut des Tieres wird kurz nach den wiederholten Immunisierungen gesammelt, und das Gamma-Globulin wird isoliert.

[0092] In einigen Fällen wird es erwünscht sein, monoklonale Antikörper aus verschiedenen Säuger-Wirten herzustellen, wie zum Beispiel aus Mäusen, Nagern, Primaten, Menschen, usw. Die Beschreibungen von

Techniken zur Herstellung derartiger monoklonaler Antikörper können zum Beispiel in Stites, et al. (Hrsg.) Basic and Clinical Immunology (4. Auflage), Lange Medical Publications, Los Altos, CA, und den darin zitierten Literaturziten; in Harlow und Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press; in Goding (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2. Auflage) Academic Press, New York, gefunden werden; und insbesondere in Kohler und Milstein (1975) in Nature 256: 495–497, wo eine Methode zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern diskutiert wird. Kurz zusammengefasst umfasst die Methode die Injektion eines Tieres mit einem Immunogen. Das Tier wird anschließend getötet, und aus seiner Milz werden Zellen entnommen, die dann mit Myelomzellen fusioniert werden. Das Ergebnis ist eine Hybridzelle oder ein „Hybridom“, die (das) in der Lage ist, sich in vitro zu vermehren. Die Hybridom-Population wird anschließend mittels Screening untersucht, um einzelne Klone zu isolieren, von denen jeder eine einzige Antikörper-Spezies gegen das Immunogen sekretiert. Somit sind die erhaltenen einzelnen Antikörper-Spezies Produkte von immortalisierten und klonierten einzelnen B-Zellen aus dem immunisierten Tier, welche als Reaktion auf eine spezifisch erkannte Stelle auf der immunogenen Substanz gebildet wurden.

[0093] Andere geeignete Techniken umfassen Verfahren, bei denen man Lymphozyten in vitro dem antigenen Polypeptid aussetzt, oder alternativ dazu die Selektion von Antikörper-Bibliotheken in Phagen oder ähnlichen Vektoren. Siehe Huse, et al. (1989) "Generation of a Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda", Science 246: 1275–1281; und Ward, et al. (1989) Nature 341: 544–546. Die Polypeptide und Antikörper der vorliegenden Erfindung können mit oder ohne Modifikation verwendet werden, wobei chimäre oder humanisierte Antikörper eingeschlossen sind. Oftmals werden die Polypeptide und Antikörper durch Verbindung (entweder kovalent oder nicht-kovalent) mit einer Substanz markiert, die ein detektierbares Signal bereitstellt. Eine große Vielzahl von Markierungen und Konjugationstechniken ist bekannt und ausführlich sowohl in der wissenschaftlichen als auch in der Patentliteratur beschrieben. Geeignete Markierungen umfassen Radionuklide, Enzyme, Substrate, Cofaktoren, Inhibitoren, fluoreszente Reste, chemilumineszente Reste, magnetische Partikel und dergleichen. Patente, welche die Verwendung solcher Markierungen lehren, umfassen die U.S. Patent Nrn. 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 und 4,366,241. Auch rekombinante Immunglobuline können hergestellt werden, siehe Cabilly, U.S. Patent No. 4,816,567.

[0094] Die erfindungsgemäßen Antikörper können auch für eine Affinitätschromatographie zur Isolierung des Proteins verwendet werden. Es können Säulen hergestellt werden, bei denen die Antikörper mit einem festen Träger verbunden sind, zum Beispiel mit Partikeln, wie Agarose, Sephadex oder dergleichen, wobei ein Zellsatz über die Säule geleitet wird, die Säule anschließend gewaschen wird, gefolgt von ansteigenden Konzentrationen eines milden Denaturierungsmittels, wodurch das gereinigte CTLA-8-Protein freigesetzt werden wird.

[0095] Die Antikörper können auch verwendet werden, um Expressionsbibliotheken mittels Screening nach bestimmten Expressionsprodukten zu durchsuchen. Üblicherweise sind die in einer derartigen Methode eingesetzten Antikörper mit einem Rest markiert, der einen einfachen Nachweis der Anwesenheit von Antigen durch Antikörper-Bindung ermöglicht.

[0096] Antikörper, die gegen jedes CTLA-8-Protein erzeugt wurden, werden auch nützlich sein, um anti-idiotypische Antikörper zu erzeugen. Diese werden nützlich sein, um verschiedene immunologische Zustände nachzuweisen, die mit der Expression des entsprechenden Antigens in Beziehung stehen.

Verwendungsmöglichkeiten

[0097] Die vorliegende Erfindung stellt Reagenzien bereit, die in diagnostischen Anwendungen, wie sie vorliegend an anderer Stelle beschrieben werden, z.B. im Rahmen der allgemeinen Beschreibung von physiologischen oder entwicklungsbiologischen Anomalien oder nachstehend im Rahmen der Beschreibung von Kits zur Diagnose, Anwendung finden werden.

[0098] Die vorliegende Erfindung stellt ferner Reagenzien mit signifikantem therapeutischem Wert bereit. Das CTLA-8-Protein (natürlich vorkommend oder rekombinant), Fragmente desselben und dagegen gerichtete Antikörper sollten gemeinsam mit Substanzen, für die eine Bindungsaffinität zum CTLA-8-Protein bekannt ist, bei der Behandlung von Zuständen nützlich sein, die mit abnormer Physiologie oder Entwicklung verbunden sind, einschließlich abnorme Zellvermehrung, zum Beispiel bei Tumorerkrankungen oder bei degenerativen Zuständen. Abnorme Zellvermehrung, Regeneration, Degeneration und Atrophie könnten durch geeignete therapeutische Behandlung unter Verwendung der vorliegend bereitgestellten Zusammensetzungen moduliert werden. Zum Beispiel sollte eine Erkrankung oder Störung, die mit abnormer Expression eines CTLA-8-Antigens oder mit abnormer Signalübertragung durch ein CTLA-8-Antigen assoziiert ist, ein geeignetes Ziel für einen Agonis-

ten oder Antagonisten des Proteins sein.

[0099] Andere abnorme entwicklungsbiologische Zustände sind in Zelltypen bekannt, für die durch Northern-Blot-Analyse gezeigt wurde, dass sie mRNA für das CTLA-8-Antigen besitzen. Siehe Berkow (Hrsg.) *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*, Merck & Co., Rahway, N.J.; und Thorn, et al. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill, N.Y. Diese Probleme könnten unter Verwendung der vorliegend bereitgestellten Zusammensetzungen einer Prävention oder Behandlung zugänglich sein.

[0100] Rekombinante Antikörper, die an CTLA-8-Protein binden, können gereinigt und anschließend an einen Patienten verabreicht werden. Für den therapeutischen Einsatz können diese Reagenzien mit weiteren aktiven oder inerten Inhaltsstoffen kombiniert werden, zum Beispiel mit herkömmlichen pharmazeutisch akzeptablen Trägersubstanzen oder Verdünnungsmitteln, zum Beispiel immunogene Adjuvantien, gemeinsam mit physiologisch unschädlichen Stabilisierungsmitteln und Hilfsstoffen. Diese Zusammensetzungen können sterilfiltriert und in Dosierungsformen abgefüllt werden, zum Beispiel durch Lyophilisierung in Dosierampullen oder Lagerung in stabilisierten wässrigen Zubereitungen. In dieser Erfindung wird ferner vorgeschlagen, Antikörper oder bindende Fragmente derselben einzusetzen, einschließlich Formen die nicht Komplement-bindend sind.

[0101] Das Screening nach Bindungspartnern oder Substanzen, die eine Bindungsaffinität für ein CTLA-8-Antigen aufweisen, kann unter Verwendung von CTLA-8 durchgeführt werden, einschließlich der Isolierung von assoziierten Substanzen. Anschließend können biologische Assays verwendet werden, um festzustellen, ob die Substanz eine intrinsische biologische Aktivität hat, und somit ein Agonist oder Antagonist ist, indem sie eine Aktivität des Antigens blockiert. Die Erfindung schlägt ferner vor, Antikörper gegen das CTLA-8-Protein als Antagonisten in therapeutischen Anwendungen zu verwenden. Dieser Ansatz sollte bei anderen Spezies-Varianten des CTLA-8-Proteins besonders nützlich sein.

[0102] Die für eine wirksame Therapie benötigten Mengen an Reagenzien werden von vielen Faktoren abhängen, u.a. dem Mittel zur Verabreichung, dem Zielorgan, dem physiologischen Zustand des Patienten und von der Verabreichung anderer Medikamenten. Deshalb sollten Behandlungsdosen titriert werden, um Sicherheit und Wirksamkeit zu optimieren. Typischerweise können in vitro verabreichte Dosen nützliche Richtlinien für geeignete Mengen zur in situ Verabreichung dieser Reagenzien sein. Tierversuche mit wirksamen Dosen zur Behandlung von bestimmten Störungen werden weitere voraussagende Hinweise zur Dosierung beim Menschen ergeben. Verschiedene Erwägungen sind beschrieben worden, zum Beispiel in Gilman, et al. (Hrsg.) (1990) *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics*, 8. Auflage, Pergamon Press; und in Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 17. Auflage (1990), Mack Publishing Co., Easton, Penn. Verfahren zur Verabreichung werden dort und nachfolgend diskutiert, zum Beispiel für orale, intravenöse, intraperitoneale oder intramuskuläre Verabreichung, transdermale Diffusion, und andere. Siehe auch Langer (1990) *Science* 249: 1527–1533. Pharmazeutisch akzeptable Trägersubstanzen werden Wasser, Salzlösungen, Puffer und andere Verbindungen umfassen, wie sie zum Beispiel im Merck Index, Merck & Co., Rahway, N.J., beschrieben sind. Man würde üblicherweise erwarten, dass die Dosisbereiche bei Mengen unterhalb von 1 mM Konzentrationen liegen, typischerweise unterhalb von etwa 10 μ M Konzentrationen, üblicherweise unterhalb von etwa 100 nM, bevorzugt unterhalb von etwa 10 pM (picomolar), und am meisten bevorzugt unterhalb von etwa 1 fM (femtomolar), gemeinsam mit einem geeigneten Träger. Zur kontinuierliche Verabreichung werden oftmals Formulierungen zur verzögerten Freisetzung oder ein Apparat zur verzögerten Freisetzung verwendet werden.

[0103] Das CTLA-8-Protein, Fragmente desselben und Antikörper gegen das Protein oder dessen Fragmente, Antagonisten und Agonisten können direkt dem zu behandelnden Wirt verabreicht werden, oder es kann abhängig von der Größe der Substanzen wünschenswert sein, sie vor ihrer Verabreichung mit Trägerproteinen, wie zum Beispiel Ovalbumin oder Serumalbumin zu koppeln. Therapeutische Formulierungen können in jeder herkömmlichen Dosierungs-Formulierung verabreicht werden. Während es bei dem aktiven Bestandteil möglich ist, diesen allein zu verabreichen, wird bevorzugt, diesen als pharmazeutische Formulierung einzusetzen. Formulierungen umfassen typischerweise mindestens einen wie oben definierten aktiven Bestandteil zusammen mit einem oder mehreren akzeptablen Trägern desselben. Jeder Träger sollte sowohl pharmazeutisch als auch physiologisch in dem Sinne akzeptabel sein, dass er mit den anderen Bestandteilen kompatibel und nicht schädlich für den Patienten ist. Formulierungen umfassen solche, die für die orale, rektale, nasale oder parenterale (einschließlich subkutaner, intramuskulärer, intravenöser und intradermaler) Verabreichung geeignet sind. Die Formulierungen können geeigneterweise in Einheits-Dosierungsform eingesetzt werden, und sie können mit jeder der im Stand der Technik hinreichend bekannten Verfahren hergestellt werden. Siehe zum Beispiel Gilman, et al. (Hrsg.) (1990) *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics*, 8. Auflage, Pergamon Press, Parrytown, NY; Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 17. Auflage (1990),

Mack Publishing Co., Easton, Penn.; Avis, et al. (Hrsg.) (1993) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications* 2. Auflage, Dekker, NY; Lieberman, et al. (Hrsg.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets* 2. Auflage, Dekker, NY; und Lieberman, et al. (Hrsg.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems* Dekker, NY. Die Therapie entsprechend der vorliegenden Erfindung kann mit anderen chemotherapeutischen oder chemopräventiven Reagenzien kombiniert werden oder in Verbindung damit eingesetzt werden.

[0104] Sowohl die natürlich vorkommenden als auch die rekombinanten Formen der erfindungsgemäßen CTLA-8-Proteine sind besonders in Kits und in Assay-Methoden nützlich, die in der Lage sind, nach Substanzen mit Bindungsaktivität für die Proteine zu suchen. Mehrere Verfahren für automatisierte Assays sind in den letzten Jahren entwickelt worden, um das Screening von Zehntausenden von Substanzen in kurzer Zeit zu erlauben. Siehe zum Beispiel Fodor, et al. (1991) *Science* 251: 767–773, worin Mittel zum Testen auf eine Bindungsaffinität beschrieben werden, indem eine Vielzahl von definierten Polymeren auf einem festen Substrat synthetisiert wird. Die Entwicklung geeigneter Assays kann durch die Verfügbarkeit großer Mengen an gereinigtem, löslichem CTLA-8-Protein, wie es in der vorliegende Erfindung bereitgestellt wird, deutlich vereinfacht werden.

[0105] Diese Erfindung ist besonders nützlich beim Screening von Substanzen, wobei das rekombinante Antigen in einer Vielzahl von Wirkstoff-Screening-Techniken eingesetzt wird. Die Vorteile der Verwendung eines rekombinanten Proteins beim Screening nach spezifischen Liganden umfassen: (a) eine verbesserte, erneuerbare Bezugsquelle für das Antigen aus einer spezifischen Bezugsquelle; (b) eine potentiell größere Anzahl von Antigen-Molekülen pro Zelle, was zu einem besserem Verhältnis von Signal und Hintergrund in den Assays führt; und (c) eine Spezies-Varianten-Spezifität (was theoretisch zu einer höheren biologischen Spezifität und einer höheren Krankheits-Spezifität führt). Das gereinigte Protein kann in einer Vielzahl von Assays (typischerweise in vitro Assays) getestet werden, in denen biologisch relevante Reaktionen bewertet werden. Siehe zum Beispiel Coligan *Current Protocols in Immunology*; Hood et al., *Immunology Benjamin/Cummings*; Paul (Hrsg.) *Fundamental Immunology*; und *Methods in Enzymology Academic Press*.

[0106] Ein Verfahren des Wirkstoff-Screenings verwendet eukaryontische oder prokaryontische Wirtszellen, die stabil mit rekombinanten DNA-Molekülen transformiert sind, welche die CTLA-8-Antigene exprimieren. Es können Zellen isoliert werden, die ein Antigen isoliert von anderen funktionell äquivalenten Antigenen exprimieren. Derartige Zellen, entweder lebensfähig oder in fixierter Form, können für Standard-Protein-Protein-Bindungsassays verwendet werden. Siehe auch Parce, et al. (1989) *Science* 246: 243–247; und Owicki, et al. (1990) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 87: 4007–4011, die sensitive Verfahren zur Detektion zellulärer Reaktionen beschreiben. Kompetitive Assays, bei denen Zellen (die Bezugsquelle des CTLA-8-Proteins) mit einem markierten Bindungspartner oder Antikörper, der eine bekannte Bindungsaffinität zum Liganden hat, wie zum Beispiel einem ^{125}I -Antikörper, und mit einer Testprobe, deren Bindungsaffinität zur Bindungszusammensetzung gemessen wird, in Kontakt gebracht und inkubiert werden, sind besonders nützlich. Die gebundenen und die freien markierten Bindungszusammensetzungen werden anschließend getrennt, um das Ausmaß der Antigen-Bindung zu bestimmen. Die Menge der gebundenen Test-Verbindung ist umgekehrt proportional zur Menge des markierten Rezeptors, der an die bekannte Quelle bindet. Eine beliebige von zahlreichen Techniken kann verwendet werden, um gebundenes von freiem Antigen zu trennen, um das Ausmaß der Bindung zu bestimmen. Dieser Trennungsschritt könnte typischerweise eine Methode wie Adhäsion an Filter gefolgt von Waschen, Adhäsion an Plastik gefolgt von Waschen oder Zentrifugation der Zellmembranen umfassen. Lebensfähige Zellen könnten auch verwendet werden, um die Auswirkungen von Wirkstoffen auf die vom CTLA-8-Protein vermittelte Funktionen mittels Screening zu untersuchen, zum Beispiel Mengen von sekundären Botenmolekülen, d.h. Ca^{++} ; Zellproliferation; Änderungen des Inositolphosphat-Pools; und anderes. Einige Nachweisverfahren erlauben es, den Trennungsschritt auszulassen, zum Beispiel ein Nähesensitives Detektionssystem. Calcium-empfindliche Farbstoffe werden nützlich sein, um Ca^{++} -Mengen unter Einsatz eines Fluorimeters oder eines Fluoreszenz-Zellsortierapparats zu bestimmen.

[0107] Ein weiteres Verfahren verwendet Membranen von transformierten eukaryontischen oder prokaryontischen Wirtszellen als Bezugsquelle für das CTLA-8-Protein. Diese Zellen sind mit DNA-Vektoren stabil transformiert, welche die Expression eines membranassoziierten CTLA-8-Proteins steuern, zum Beispiel einer konstruierten membrangebundenen Form. Im wesentlichen würden die Membranen aus den Zellen präpariert und in beliebige Bindungsassay vom Rezeptor/Ligand-Typ eingesetzt werden, wie zum Beispiel in den oben beschriebenen kompetitiven Assay.

[0108] Ein weiterer Ansatz ist es, solubilisiertes ungereinigtes oder solubilisiertes gereinigtes CTLA-8-Protein aus transformierten eukaryontischen oder prokaryontischen Wirtszellen zu verwenden. Dies ermöglicht einen „molekularen“ Bindungsassay mit den Vorteilen einer erhöhten Spezifität, der Möglichkeit zur Automatisierung und einem hohen Durchsatz beim Wirkstoff-Test.

[0109] Eine andere Technik für das Wirkstoff-Screening betrifft einen Ansatz, der beim Screening nach Substanzen, die geeignete Bindungsaffinität für CTLA-8 haben, einen hohen Durchsatz erlaubt, und detailliert in Geysen, European Patent Application 84/03564, veröffentlicht am 13. September 1984, beschrieben ist. Zunächst wird eine große Anzahl unterschiedlicher kleiner Peptid-Testsubstanzen auf einem festen Substrat synthetisiert, zum Beispiel auf Plastikstiften oder auf einer anderen geeigneten Oberfläche, siehe Fodor, et al. (1991). Anschließend läßt man alle Stifte mit solubilisierter ungereinigter oder solubilisierter gereinigter CTLA-8-Bindungszusammensetzung reagieren und wäscht anschließend. Der nächste Schritt umfasst die Detektion gebundener Bindungszusammensetzung.

[0110] Ein rationales Wirkstoff-Design (rational drug design) kann auch auf strukturellen Untersuchungen der molekularen Gestalt des CTLA-8-Proteins und anderer Effektoren oder Analoga basieren. Effektoren können andere Proteine sein, die als Reaktion auf eine Antigen-Bindung andere Funktionen vermitteln, oder andere Proteine, die normalerweise mit dem Antigen wechselwirken. Ein Mittel zur Bestimmung der Regionen, die mit spezifischen anderen Proteinen wechselwirken, ist eine physikalische Strukturbestimmung, zum Beispiel Röntgen-Kristallographie oder zweidimensionale NMR-Techniken. Diese werden Richtlinien bezüglich der Aminosäurereste liefern, die molekulare Kontaktregionen bilden. Für eine detaillierte Beschreibung der Strukturbestimmung von Proteinen, siehe zum Beispiel Blundell und Johnson (1976) Protein Crystallography, Academic Press, New York.

[0111] Das gereinigte CTLA-8-Protein kann direkt auf Platten geschichtet werden, um in den oben erwähnten Techniken des Wirkstoff-Screenings verwendet zu werden. Nicht-neutralisierende Antikörper gegen diese Liganden können jedoch als Capture-Antikörper verwendet werden, um den entsprechenden Liganden auf der festen Phase zu immobilisieren.

Kits

[0112] Die vorliegende Erfindung schlägt ferner vor, CTLA-8-Proteine, Fragmente derselben, Peptide und ihre Fusionsprodukte in einer Vielzahl von diagnostischen Kits und in Verfahren zum Nachweis der Anwesenheit einer Bindungszusammensetzung einzusetzen. Typischerweise wird der Kit ein Fach haben, das entweder ein definiertes CTLA-8-Peptid oder CTLA-8-Gen-Segment enthält, oder ein Reagenz, welches das eine oder das andere erkennt, zum Beispiel Antigen-Fragmente oder Antikörper. Siehe zum Beispiel Chen (Hrsg.) (1987) Immunoassay: A Practical Guide, Academic Press, Orlando, FL; Price und Newman (Hrsg.) (1991) Principles and Practice of Immunoassay, Stockton Press, New York; und Ngo (Hrsg.) (1988) Nonisotopic Immunoassay, Plenum Press, NY.

[0113] Ein Kit zur Bestimmung der Bindungsaffinität einer Testverbindung für ein CTLA-8-Protein würde typischerweise umfassen: eine Testverbindung; eine markierte Verbindung, zum Beispiel einen Antikörper, der bekannte Bindungsaffinität für das Antigen hat; eine Bezugsquelle für CTLA-8-Protein (natürlich vorkommend oder rekombinant); und ein Mittel zur Trennung der gebundenen von der freien markierten Verbindung, wie zum Beispiel eine feste Phase zur Immobilisierung des Antigens. Nachdem die Substanzen mittels Screening durchsucht worden sind, können diejenigen, die eine geeignete Bindungsaffinität für das Antigen haben, in geeigneten biologischen Assays bewertet werden, die im Stand der Technik hinreichend bekannt sind, um zu bestimmen, ob sie ähnliche biologische Aktivitäten gegen das natürliche Antigen aufweisen. Durch die Verfügbarkeit von rekombinanten CTLA-8-Protein-Polypeptiden werden auch hinreichend definierte Standards zur Kalibrierung dieser Assays bereitgestellt.

[0114] Ein bevorzugter Kit zur Bestimmung der Konzentration von, zum Beispiel, einem CTLA-8-Protein in einer Probe würde typischerweise enthalten: eine markierte Verbindung, zum Beispiel einen Antikörper, der bekannte Bindungsaffinität für das Antigen hat, eine Bezugsquelle für das Antigen (natürlich vorkommend oder rekombinant) und ein Mittel zur Trennung der gebundenen von der freien markierten Verbindung, wie zum Beispiel eine feste Phase zur Immobilisierung des CTLA-8-Proteins. Es werden normalerweise Fächer bereitgestellt, die Reagenzien und Anleitungen enthalten.

[0115] Ein Verfahren zur Bestimmung der Konzentration von CTLA-8-Protein in einer Probe würde typischerweise folgende Schritte umfassen: (1) Herstellung von Membranen aus einer Probe, die aus einer Bezugsquelle für membrangebundenes CTLA-8-Protein besteht; (2) Waschen der Membranen und Suspendieren derselben in einem Puffer; (3) Solubilisierung des Antigens durch Inkubation der Membranen in einem Kulturmedium, dem ein geeignetes Detergens zugegeben wurde; (4) Anpassung der Detergenskonzentration des solubilisierten Antigens; (5) Inkontaktbringen und Inkubation der besagten Verdünnung mit radioaktiv markiertem Antikörper, um Komplexe zu bilden; (6) Gewinnung der Komplexe, beispielsweise mittels Filtration durch mit Polye-

thylenimin behandelte Filter; und (7) Messung der Radioaktivität der gewonnenen Komplexe.

[0116] Antikörper, einschließlich Antigen-bindende Fragmente, die spezifisch für das CTLR-8-Protein oder dessen Fragmente sind, sind in diagnostischen Anwendungen nützlich, um die Anwesenheit erhöhter Mengen an CTLA-8-Protein und/oder dessen Fragmenten zu detektieren. Solche diagnostischen Assays können Lysate, lebende Zellen, fixierte Zellen, Immunfluoreszenz, Zellkulturen, und Körperflüssigkeiten verwenden, und sie können ferner die Detektion von Antigenen umfassen, die mit dem Protein im Serum verwandt sind, oder ähnliches. Diagnostische Assays können homogen (ohne Trennungsschritt zwischen freiem Reagenz und dem Protein-Protein-Komplex) oder heterogen (mit Trennungsschritt) sein. Es gibt unterschiedliche kommerzielle Assays, wie zum Beispiel den Radioimmunassay (RIA), den Enzymgebundenen Immunsorptions-Assay (ELISA), den Enzym-Immunoassay (EIA), die Enzym-verstärkte Immunoassay-Technik (EMIT), den substratmarkierten fluoreszenten Immunoassay (SLFIA), und dergleichen. Zum Beispiel können unmarkierte Antikörper eingesetzt werden, wenn ein zweiter Antikörper verwendet wird, der markiert ist und den Antikörper gegen ein CTLA-8-Protein, oder gegen ein bestimmtes Fragment desselben erkennt. Ähnliche Assays wurden auch ausführlich in der Literatur diskutiert. Siehe zum Beispiel Harlow und Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH.

[0117] Anti-idiotypische Antikörper können in ähnlicher Weise zur Diagnose der Anwesenheit von Antikörpern gegen ein CTLA-8-Protein verwendet werden, und als solche können sie diagnostisch für verschiedene abnorme Zustände sein. Zum Beispiel kann die Überproduktion von CTLA-8-Protein zur Ausbildung von verschiedenen immunologischen Reaktionen führen, die diagnostisch für abnorme physiologische Zustände sein können, insbesondere bei proliferativen Zuständen der Zelle, wie zum Beispiel bei Krebs oder bei abnormer Differenzierung.

[0118] Häufig werden die Reagenzien für diagnostische Assays in Kits geliefert, um die Sensitivität des Assays zu optimieren. Im Sinne der Erfindung und abhängig von der Art des Assays, des Protokolls und der Markierung, wird entweder markierter oder unmarkierter Antikörper, oder markiertes CTLA-8-Protein bereitgestellt. Dies erfolgt üblicherweise in Verbindung mit anderen Additiven, wie Puffern, Stabilisierungsreagenzien, zur Signalerzeugung notwendigen Materialien, wie Substraten für Enzyme, und dergleichen. Der Kit wird vorzugsweise auch Anweisungen zum richtigen Gebrauch und zur Beseitigung des Inhalts nach dessen Gebrauch beinhalten. Typischerweise hat der Kit Fächer für jedes nützliche Reagenz. Es ist wünschenswert, dass die Reagenzien als ein trockenes, lyophilisiertes Pulver bereitgestellt werden, wobei die Reagenzien in einem wässrigen Medium rekonstituiert werden können, um geeignete Konzentrationen der Reagenzien zur Durchführung des Assays bereitzustellen.

[0119] Jeder der oben erwähnten Bestandteile des Wirkstoff-Screenings und der diagnostischen Assays kann ohne Änderungen verwendet werden, oder er kann auf unterschiedlichen Wegen verändert werden. Zum Beispiel kann die Markierung durch kovalente oder nichtkovalente Verbindung mit einem Rest erreicht werden, der direkt oder indirekt ein nachweisbares Signal liefert. In jedem dieser Assays können das Antigen, die Testverbindung, das CTLA-8-Protein, oder die dagegen gerichteten Antikörper direkt oder indirekt markiert sein. Möglichkeiten zur direkten Markierung umfassen die Markierungsgruppen: radioaktive Markierungen wie ^{125}I , Enzyme (U.S. Pat. No. 3,645,090) wie Peroxidase und alkalische Phosphatase, und fluoreszente Markierungen (U.S. Pat. No. 3,940,475), die in der Lage sind, Änderungen in der Fluoreszenzintensität, eine Wellenlängenverschiebung oder eine Fluoreszenz-Polarisierung anzuzeigen. Möglichkeiten zur indirekten Markierung umfassen die Biotinylierung eines Bestandteils, gefolgt von der Bindung an Avidin, das mit einer der oben erwähnten Markierungsgruppen markiert ist.

[0120] Es gibt ferner viele Verfahren zur Trennung des gebundenen vom freien Antigen, oder alternativ dazu zur Trennung der gebundenen von der freien Testverbindung. Das CTLA-8-Protein kann auf verschiedenen Trägern immobilisiert werden, gefolgt von Waschen. Geeignete Träger umfassen Plastik, wie eine ELISA-Platte, Filter und Kügelchen. Verfahren zur Immobilisierung des CTLA-8-Proteins auf einem Träger umfassen (sind jedoch nicht beschränkt auf) direkte Adhäsion an Plastik, die Verwendung eines Capture-Antikörpers, chemische Kopplung und Kopplung durch Biotin-Avidin. Der letzte Schritt bei diesem Vorgehen umfasst die Fällung des Protein-Protein-Komplexes mittels eines von mehreren Verfahren, einschließlich derjenigen, die zum Beispiel ein organisches Lösungsmittel wie Polyethylenglykol oder ein Salz wie Ammoniumsulfat verwenden. Andere geeignete Trennungstechniken umfassen (sind jedoch nicht beschränkt auf) das Verfahren mit Fluoreszenz-Antikörpern auf magnetisierbaren Partikeln, welches in Rattle, et al. (1984) *Clin. Chem.* 30: 1457-1461 beschrieben wird, und die Doppel-Antikörper-Magnetpartikeltrennung, die in U.S. Patent No. 4,659,678 beschrieben wird.

[0121] Verfahren zur Verbindung von Proteinen oder ihrer Fragmente mit den unterschiedlichen Markierungen wurden in der Literatur ausführlich beschrieben und bedürfen an dieser Stelle keiner ausführlichen Diskussion. Viele dieser Techniken umfassen die Verwendung von aktivierten Carboxygruppen, entweder durch die Verwendung von Carbodiimid oder von aktiven Estern, um Peptidbindungen zu bilden, die Bildung von Thioestern durch Reaktion einer Mercaptogruppe mit einem aktivierten Halogen wie Chloracetyl, oder ein aktivierten Olefin wie Maleimid, zur Bildung einer Verbindung, oder dergleichen. Auch Fusionsproteine werden in diesen Anwendungen Verwendung finden.

[0122] Ein anderer diagnostischer Aspekt dieser Erfindung betrifft die Verwendung von Oligonukleotid- oder Polynukleotid-Sequenzen, die aus der Sequenz eines CTLA-8-Proteins entnommen wurden. Diese Sequenzen können als Sonden zum Nachweis der Antigen-mRNA-Mengen in Proben von Patienten eingesetzt werden, bei denen ein abnormer Zustand vermutet wird, zum Beispiel Krebs oder ein entwicklungsbiologisches Problem. Für die Herstellung von RNA- und DNA-Nukleotidsequenzen, die Markierung der Sequenzen, sowie für die bevorzugte Länge der Sequenzen gibt es in der Literatur umfangreiche Beschreibungen und Diskussionen. Normalerweise sollte eine Oligonukleotid-Sonde mindestens 14 Nukleotide aufweisen, üblicherweise mindestens 18 Nukleotide, und die Polynukleotid-Sonden können bis zu mehreren Kilobasen lang sein. Unterschiedliche Markierungen können eingesetzt werden, am häufigsten Radionuklide, insbesondere ³²P. Es können jedoch auch andere Techniken eingesetzt werden, wie zum Beispiel die Verwendung von Biotin-modifizierten Nukleotiden, um sie in ein Polynukleotid einzuführen. Das Biotin dient anschließend als Bindungsstelle für die Bindung an Avidin oder Antikörper, die wiederum mit einer Vielzahl von Markierungen markiert sein können, wie zum Beispiel mit Radionukliden, mit fluoreszenten Substanzen, mit Enzymen oder dergleichen. Alternativ dazu können Antikörper eingesetzt werden, die spezifische Duplexe erkennen, einschließlich DNA-Duplexe, RNA-Duplexe, DNA-RNA-Hybrid-Duplexe oder DNA-Protein-Duplexe. Die Antikörper können wiederum markiert sein, und der Assay kann so durchgeführt werden, dass der Duplex an eine Oberfläche gebunden wird, sodass bei der Duplex-Bildung auf der Oberfläche die Anwesenheit des Antikörpers, der an den Duplex gebunden hat, detektiert werden kann. Die Verwendung von Sonden gegen die neue Anti-Sense-RNA kann mit jeder herkömmlichen Technik durchgeführt werden, wie Nukleinsäure-Hybridisierung, Plus- und Minus-Screening, rekombinatorische Sonden-Untersuchung, Translation mit Hybridfreisetzung (hybrid released translation; HRT) und Translation mit Hybridarrest (hybrid arrested translation; HART). Dies umfasst auch Amplifikations-Techniken wie die Polymerasekettenreaktion (PCR).

[0123] Es werden darüber hinaus diagnostische Kits vorgeschlagen, die auch die qualitative oder quantitative Anwesenheit von anderen Markern überprüfen. Eine Diagnose oder Prognose kann auf der Kombination vieler Indikationen beruhen, die als Marker verwendet werden. Somit können Kits zum Nachweis von Markerkombinationen verwendet werden. Siehe zum Beispiel Viallet, et al. (1989) Progress in Growth Factor Res. 1: 89–97.

[0124] Der weite Umfang dieser Erfindung wird am besten durch die nachfolgenden Beispiele verständlich, welche die Erfindung nicht auf spezielle Ausführungsformen beschränken sollen.

BEISPIELE

I. Allgemeine Methoden

[0125] Einige der Standardmethoden werden zum Beispiel in Maniatis, et al. (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press; Sambrook, et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (2. Auflage), Bände 1–3, CSH Press, NY; Ausubel et al., Biology, Greene Publishing Associates, Brooklyn, NY; oder Ausubel, et al. (1987 und Ergänzungsbände) Current Protocols in Molecular Biology, Greene/Wiley, New York; Innis, et al. (Hrsg.) (1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications Academic Press, N.Y., beschrieben und zitiert. Verfahren der Proteinaufreinigung umfassen Verfahren wie Ammoniumsulfat-Fällung, Säulenchromatographie, Elektrophorese, Zentrifugation, Kristallisierung und andere. Siehe zum Beispiel Ausubel, et al. (1987 und periodische Ergänzungsbände); Deutscher (1990) "Guide to Protein Purification" in Methods in Enzymology, Band 182, und andere Bände in dieser Reihe; sowie Literatur von Herstellern zur Verwendung von Proteinaufreinigungs-Produkten, zum Beispiel Pharmacia, Piscataway, N.J., oder Bio-Rad, Richmond, CA. Die Kombination mit rekombinanten Techniken erlaubt die Fusion mit geeigneten Segmenten, zum Beispiel mit einer FLAG-Sequenz, oder einem Äquivalent, die (das) mittels einer Sequenz fusioniert werden kann, welche mit einer Protease entfernbare ist. Siehe zum Beispiel Hochuli (1989) Chemische Industrie 12: 69–70; Hochuli (1990) "Purification of Recombinant Proteins with Metal Chelate Absorbent" in Setlow (Hrsg.) Genetic Engineering, Principle and Methods 12: 87–98, Plenum Press, N.Y.; und Crowe, et al. (1992) QIAexpress: The High Level Expression & Protein Purification System QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA.

[0126] FACS-Analysen werden in Melamed, et al. (1990) Flow Cytometry and Sorting Wiley-Liss, Inc., New York, NY; Shapiro (1988) Practical Flow Cytometry Liss, New York, NY; und Robinson, et al. (1993) Handbook of Flow Cytometry Methods Wiley-Liss, New York, NY, beschrieben.

Bezugsquelle für die CTLA-8-mRNA

[0127] Verschiedene Zelllinien werden durch Screening mit einer geeigneten Sonde auf eine hohe mRNA-Expression hin untersucht. Basierend auf dem Expressionsniveau der CTLA-8-mRNA werden geeignete Zelllinien ausgewählt. Die Anmelder verwendeten subtraktive Hybridisierungsmethoden bei aktivierten cytotoxischen T-Zellen.

Isolierung eines CTLA-8-kodierenden Klons

[0128] Standard-PCR-Techniken werden verwendet, um die Sequenz eines CTLA-8-Gens ausgehend von einer genomischen oder einer cDNA-Bibliothek oder ausgehend von mRNA zu amplifizieren. Geeignete Primer werden aus den bereitgestellten Sequenzen ausgewählt, und es wird ein Klon von vollständiger Länge isoliert. Der Klon von vollständiger Länge oder geeignete Fragmente desselben können als Hybridisierungs-Sonden verwendet werden, zum Beispiel, um unter Verwendung stringenter oder weniger stringenter Hybridisierungsbedingungen nach anderen homologen Genen zu suchen.

[0129] In einem anderen Verfahren werden Oligonukleotide zum Durchsuchen einer Bibliothek mittels Screening verwendet. Es werden synthetische Oligonukleotide in geeigneten Orientierungen als Primer in Kombination mit Polymerasekettenreaktions-(PCR)-Techniken verwendet, um korrekte Klone aus einer Bibliothek zu selektieren.

II. Isolierung von humanem CTLA-8.

[0130] Eine humane genomische Bibliothek wurde von Clontech (Cat. HL1006d) bezogen und mittels Screening mit einer cDNA-Sonde untersucht, die aus einer 453 Basenpaaren großen, vollständigen kodierenden Sequenz eines Maus-CTLA-8 bestand. Siehe SEQ ID NO: 1. Es wurde herausgefunden, dass mehrere unabhängige Lambda-Klone stark mit der mCTLA-8-Sonde hybridisierten. Ein Klon enthielt ein hybridisierendes XbaI-Fragment von etwa 2000 Basenpaaren, das einem Fragment entsprach, welches zuvor mit einer ähnlichen Sonde in einem Southern-Blot in humaner genomischer DNA detektiert worden war. Dieses Fragment von 2000 Basenpaaren wurde in Bluescript (Stratagene) subkloniert und sequenziert. Dies zeigte eine Region von 240 Basenpaaren (siehe SEQ ID NO: 5) mit 83,8% Homologie zu dem Maus-CTLA-8 nach SEQ ID NO: 1. Die Translation dieser Region ergab eine Aminosäuresequenz mit 70,8 Homologie zu den 79 Carboxyterminalen Aminosäuren des putativen Maus-CTLA-8-Proteins. Das Exon wurde als Sonde verwendet, um eine cDNA-Bibliothek mittels Screening zu durchsuchen, wobei diese mit einem Primer hergestellt wurde, der den letzten 21 Nukleotiden der kodierenden Region entsprach. Drei unabhängige cDNA-Klone wurden erhalten, die die vollständige kodierende Region des humanen CTLA-8 enthielten. Der offene Leserahmen von 468 Basenpaaren kodiert ein Polypeptid von 155 Aminosäuren mit einem theoretischen Molekulargewicht von 17100 Dalton. Siehe SEQ ID NO: 7-8.

[0131] Dieses humane CTLA-8 ist zu 66,4 homolog zum ORF-13 des Virus, und zu 58,3 homolog zum kodierten Maus-CTLA-8-Protein. Darüber hinaus sind die 6 Cysteine bei den drei Genen konserviert, ebenso wie die putativen Glykosylierungs- und Phosphorylierungsstellen.

[0132] Die Analyse der Aminosäuresequenz von humanem CTLA-8 ergab einen hydrophoben Abschnitt von 19 Resten, von 7 bis etwa 25, am Amino-Terminus, ähnlich einem Signalpeptid. Es ist sehr wahrscheinlich, dass das humane CTLA-8 ein sekretiertes Protein ist, das ein Molekulargewicht aufweist, welches dem eines Cytokins ähnelt.

III. Biochemische Charakterisierung von CTLA-8-Proteinen.

[0133] Zwei Formen von humanem CTLA-8 wurden in heterologen Zellen exprimiert; die native Form, und eine rekombinante Form mit FLAG-Peptid am Carboxy-Terminus. Siehe zum Beispiel Crowe, et al. (1992) QIA-express: The High Level Expression & Protein Purification System QIAGEN Inc., Chatsworth, CA; und Hopp, et al. (1988) Bio/Technology 6: 1204-1210. Diese zwei Formen des humanen CTLA-8-Proteins wurden in die Expressionsvektoren pME18S und pEE12 eingebracht und anschließend durch Elektroporation in COS-7-Zellen bzw. NSO-Zellen transfiziert. Die elektroporierten Zellen wurden anschließend für 48 Stunden in RPMI-Me-

dium kultiviert, das mit 10% fötalem Kälberserum supplementiert war. Die Zellen wurden anschließend mit ^{35}S -Met und ^{35}S -Cys inkubiert, um die zellulären Proteine zu markieren. Ein Vergleich der Proteine unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE zeigte, dass die mit dem humanen CTLA-8 transfizierten Zellen ein Polypeptid von 15000 Dalton sekretierten. Eine nicht-reduzierende SDS-PAGE zeigte 2 spezifische Banden bei etwa 28000 Dalton und etwa 33000 Dalton.

[0134] Um festzustellen, ob die von aktivierten CD4⁺ T-Zellen produzierte natürliche Form des humanen CTLA-8 ähnlich wie bei transfizierten COS-7-Zellen und NSO-Zellen ebenfalls als Dimer sekretiert wird, wurden mononukleäre periphere Blutzellen (PBMC) aus 500 ml humanem Blut über einen Ficoll-Gradienten aufgereinigt. B-Zellen, CD8⁺ T-Zellen, Monozyten und NK-Zellen wurden unter Verwendung von 100 µl Ascites-Flüssigkeit abgereichert, die Anti-CD19, Anti-CD8 und Anti-CD14 enthielt sowie 25 µg monoklonalen NKH1-Antikörper (Coulter, Hialeah, FL). Nach Inkubation für 30 Minuten bei 4°C wurden die PBMC zweimal in RPMI gewaschen, das 10% fötales Kälberserum (FCS) enthielt. Paramagnetische Kügelchen, die mit Ziegen-Antikörpern gegen Maus-IgG (Dynabeads M450, Dynal, Oslo, Norwegen) beschichtet waren, wurden in einer Endkonzentration von 5 Kügelchen pro abzureichernder Zelle zugegeben. Unerwünschte Zellen wurden anschließend durch 3 Passagen über einen Magneten entfernt. Die verbleibenden Zellen waren CD4⁺ Zellen mit einer Reinheit von 87%; diese wurden auf 10^7 Zellen/ml in DMEM F12 (Gibco, Gaithersburg, MD) verdünnt, das 10% FCS, 10 ng/ml PMA (Sigma, St. Louis, MO) und 500 ng/ml Ionomycin (Sigma, St. Louis, MO) enthielt. Nach Inkubation für 4 Stunden bei 37°C in 5% CO₂ wurde das Medium gegen Methionin- und Cystein-freies DMEM (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA) ausgetauscht, das mit 1% dialysiertem FCS, 10 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin supplementiert war, und es wurde für 1 Stunde bei 37°C in 5% CO₂ inkubiert. 100 µCi/ml ^{35}S -Methionin und ^{35}S -Cystein (Amersham) wurden zugegeben, und die metabolische Markierung wurde für 18 Stunden bei 37°C in 5% CO₂ durchgeführt. Nach einer Vorklärung der Überstände mit Anti-IFN-γ Mab B27 und 0,5 ml Protein-G Sepharose (Sigma, St. Louis, MO) wurden die Überstände unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen humanes CTLA-8 immunpräzipitiert. Immunpräzipitierte Proteine wurden auf einer SDS-PAGE analysiert. CD4⁺ T-Zellen und transfizierte NSO-Zellen zeigten zwei Banden bei 28000 und 33000 Dalton, die Dimeren aus humanem CTLA-8 entsprachen. Somit zeigen humanes CTLA-8, das aus transfizierten NSO-Zellen erhalten wurde, und CTLA-8, das von aktivierten T-Zellen isoliert wurde, die gleichen biologischen Eigenschaften.

IV. Herstellung von humanem CTLA-8 im großen Maßstab

[0135] Für biologische Assays wurde humanes CTLA-8 und humanes CTLA-8-FLAG in großen Mengen in transfizierten COS-7-Zellen, die in RPMI-Medium gezüchtet wurden, das mit 1% Nutridoma HU (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) supplementiert war, hergestellt, und anschließend aufgereinigt.

[0136] Zur Herstellung größerer Mengen an nativem humanem CTLA-8 oder humanem CTLA-8-FLAG wurden entsprechend der von Celltech (Slough, Berkshire, UK; Internationale Patentanmeldungen WO 86/05807, WO 87/04462, WO 89/01036 und WO 89/10404) entwickelten Methode stabile Transformanten von NSO-Zellen hergestellt. Sowohl CTLA-8 als auch CTLA-8-FLAG wurden in pEE12 subkloniert und anschließend durch Elektroporation in NSO-Zellen transfiziert. Transfizierte NSO-Zellen wurden in selektivem, Glutamin-freiem DMEM ausgesät, das mit 10% fötalem Kälberserum supplementiert wurde, wie es im Celltech Protokoll beschrieben ist. Überstände der besten Produktionslinien wurden in biologischen Assays und zur Reinigung von humanem CTLA-8 und humanem CTLA-8-FLAG verwendet.

Reinigung von humanem CTLA-8-Protein

[0137] Es wurde üblicherweise 1 Liter Überstand, der humanes CTLA-8 oder humanes CTLA-8-FLAG enthielt, über eine 60-ml-Säule geschickt, die Zn⁺⁺-Ionen auf einer chelatisierenden Sepharose „Fast-Flow“-Matrix (Pharmacia, Uppsala, Schweden) enthielt. Nach Waschen mit 10 Volumen Bindungspuffer (His-Bind Buffer kit, Novagen, Madison, WI) wurden die von den Metall-Ionen zurückgehaltenen Proteine mit einem Gradienten von 20–100 mM Imidazol eluiert. Der Gehalt an humanem CTLA-8-FLAG in den eluierten Fraktionen wurde durch Dot-Blot bestimmt, wobei der monoklonale Anti-FLAG-Antikörper M2 (Eastman Kodak, New Haven, CT) verwendet wurde. Der Gehalt an humanem CTLA-8 wurde hingegen durch Silberfärbung einer nicht-reduzierenden SDS-PAGE beurteilt. Die CTLA-8-haltigen Fraktionen wurden anschließend vereinigt und gegen PBS dialysiert und wurden entweder in biologischen Assays verwendet oder durch Anionenaustausch-HPLC über eine DEAE-Säule weiter aufgereinigt.

Herstellung von CTLA-8-spezifischen Antikörpern

[0138] Balb/c Inzucht-Mäuse wurden intraperitoneal mit 1 ml gereinigtem humanem CTLA-8-FLAG immunisiert, das am Tag 0 in komplettem Freund-Adjuvans emulgiert war, und an den Tagen 15 und 22 in inkomplettem Freund-Adjuvans. Die Mäuse wurden mit 0,5 ml intravenös verabreichtem, gereinigtem humanem CTLA-8 „geboostet“.

[0139] Zur Herstellung von Hybridomzellen wurde die nicht-sekretierende Myeloma-Zelllinie SP2/0-Ag8 und Polythylenglykol 1000 (Sigma, St. Louis, MO) als Fusionsreagenz verwendet. Hybridomzellen wurden in eine Falcon-Gewebekulturplatte mit 96 Vertiefungen (Becton Dickinson, NJ) gegeben und mit DMEM F12 (Gibco, Gaithersburg, MD) gefüttert, das mit 80 µg/ml Gentamycin, 2 mM Glutamin, 10% Pferdeserum (Gibco, Gaithersburg, MD), 1% ADCM (CRTS, Lyon, Frankreich), 10^{-5} M Azaserin (Sigma, St. Louis, MO) und 5×10^{-5} M Hypoxanthin supplementiert war. Hybridom-Überstände wurden mittels Immuncytochemie (ICC) auf die Produktion von Antikörpern gegen humanes CTLA-8 durchsucht, wobei Aceton-fixierte COS-7-Zellen verwendet wurden, die mit humanem CTLA-8 transfiziert worden waren, sowie durch ELISA, wobei humanes, aus COS-7-Überständen gereinigtes CTLA-8-FLAG als Beschichtungs-Antigen verwendet wurde. Aliquots von positiven Zellklonen wurden für 6 Tage expandiert und kryokonserviert, und sie wurden in Ascites-Flüssigkeit aus mit Pristan (2,6,10,14-Tetramethylpentadecan, Sigma, St. Louis, MO) behandelten Balb/c Mäusen vermehrt, welche 15 Tage zuvor eine intraperitoneale Pristan-Injektion erhalten hatten. Es wurden etwa 10^5 Hybridomzellen in 1 ml PBS intraperitoneal verabreicht, und 10 Tage später wurde Ascites-Flüssigkeit von jeder Maus gesammelt.

[0140] Nach Zentrifugation der Ascites-Flüssigkeit wurde die Antikörper-Fraktion durch Ammoniumsulfatfällung und Anionen-Austausch-Chromatographie auf einer Zephyr-D Siliciumsäule (IBF Sepracor), die mit 20 mM Tris pH 8,0 äquilibriert war, isoliert. Die Proteine wurden mit einem NaCl-Gradienten eluiert (in einem Bereich von 0 bis 1 M NaCl). Fraktionen von 2 ml wurden gesammelt und mittels ELISA auf die Anwesenheit von Anti-CTLA-8 Antikörper getestet. Die Fraktionen mit spezifischer Anti-CTLA-8-Aktivität wurden vereinigt, dialysiert und eingefroren. Aliquots der gereinigten monoklonalen Antikörper wurden mit Peroxidase markiert.

Quantifizierung von humanem CTLA-8

[0141] Von den für CTLA-8 spezifischen Antikörpern wurden Ab25 und der Peroxidase-markierte Ab16 ausgewählt, um mittels Sandwich-Assay die Mengen an humanem CTLA-8 zu quantifizieren. Gereinigter Ab25 wurde auf 2 µg/ml in Beschichtungspuffer verdünnt (Carbonatpuffer, pH 9,6 15 mM Na_2CO_3 , 35 mM NaHCO_3). Mit dieser verdünnten Lösung wurden die Vertiefungen einer ELISA-Platte mit 96 Vertiefungen über Nacht bei Raumtemperatur beschichtet (Immunoplate Maxisorp F96 zertifiziert, NUNC, Dänemark). Die Platten wurden anschließend einmal manuell mit einem Waschpuffer gewaschen, der aus phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und 0,05 Tween 20 (Technicon Diagnostics, USA) bestand. 110 µl gereinigtes humanes CTLA-8, das in TBS-B-T-Puffer [20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% BSA (Sigma, St. Louis, MO) und 0,05% Tween 20] verdünnt war, wurden in jede Vertiefung der Platte gegeben. Nach einer Inkubation von 3 Stunden bei 37°C wurden die Platten einmal gewaschen. 100 µl Peroxidase-markierter Ab16, der auf 5 µg/ml in TBS-B-T-Puffer verdünnt war, wurden in jede Vertiefung der Platte gegeben und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden anschließend dreimal in Waschpuffer gewaschen. 100 µl Peroxidase-Substrat, 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS), das auf 1 mg/ml in Citrat-/Phosphatpuffer verdünnt war, wurden in jede Vertiefung der Platte gegeben, und die kolorimetrische Reaktion wurde bei 405 nm gemessen. Die kleinste nachweisbare Konzentration an humanem CTLA-8 betrug 0,015 ng/ml.

V. Isolierung von CTLA-8-Homologen

[0142] Die Bindungszusammensetzung wird verwendet, um eine Expressionsbibliothek mittels Screening zu untersuchen, die aus einer Zelllinie hergestellt wurde, welche ein CTLA-8-Protein exprimiert. Standard-Färbefahrer werden verwendet, um intrazelluläres oder an der Oberfläche exprimiertes Antigen nachzuweisen, oder es werden transformierte Zellen, die das Antigen an der Oberfläche exprimieren mittels „Panning“ durchsucht. Das Screening nach intrazellulärer Expression wird mit verschiedenen Färbungs- oder Immunfluoreszenz-Methoden durchgeführt. Siehe auch McMahan, et al. (1991) EMBO J. 10: 2821–2832.

[0143] Beschichte beispielsweise am Tag 0 2-Kammer-Objektträger von Permanox pro Kammer mit 1 ml Fibronectin, 10 ng/ml in PBS, für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Wasche einmal mit PBS. Plattiere anschließend $2-3 \times 10^5$ COS-Zellen pro Kammer in 1,5 ml Wachstumsmedium aus. Inkubiere über Nacht bei 37°C.

[0144] Bereite am Tag 1 für jede Probe 0,5 ml einer Lösung aus 66 mg/ml DEAE-Dextran, 66 mM Chloroquin und 4 mg DNA in serumfreiem DME vor. Für jede Gruppe wird eine Positivkontrolle hergestellt, zum Beispiel mit huIL-10-FLAG cDNA mit 1 und 1/200 Verdünnung, sowie eine negative Leerprobe. Wasche die Zellen mit serumfreiem DME. Setze die DNA-Lösung zu und inkubiere für 5 Stunden bei 37°C. Entferne das Medium und setze 0,5 ml 10% DMSO in DME für 2,5 Minuten zu. Entferne die Lösung und wasche einmal mit DME. Setze 1,5 ml Wachstumsmedium zu und inkubiere über Nacht.

[0145] Wechsel am Tag 2 das Medium. Am Tag 3 oder am Tag 4 werden die Zellen fixiert und gefärbt. Wasche die Zellen zweimal mit Hanks gepufferter Salzlösung (HBSS) und fixiere sie für 5 Minuten in 4% Paraformaldehyd (PFA)/Glucose. Wasche dreimal mit HBSS. Nachdem alle Flüssigkeit entfernt wurde, können die Objektträger bei -80°C gelagert werden. Für jede Kammer werden 0,5 ml Inkubationen wie folgt durchgeführt. Setze HBSS/Saponin (0,1%) mit 32 ml/ml von 1 M NaN₃ für 20 Minuten zu. Die Zellen werden anschließend mit HBSS/Saponin 1x gewaschen. Der lösliche Antikörper wird zu den Zellen gegeben und für 30 Minuten inkubiert. Wasche die Zellen zweimal mit HBSS/Saponin. Setze den sekundären Antikörper zu, zum Beispiel Vector-Anti-Maus-Antikörper in einer 1/200 Verdünnung, und inkubiere für 30 Minuten. Stelle ELISA-Lösung her, zum Beispiel Vector-Elite-ABC Meerrettich-Peroxidase-Lösung (ABC HRP-Lösung), und inkubiere für 30 Minuten vor. Verwende beispielsweise 1 Tropfen Lösung A (Avidin) und 1 Tropfen Lösung B (Biotin) pro 2,5 ml HBSS/Saponin. Wasche die Zellen zweimal mit HBSS/Saponin. Setze ABC HRP-Lösung zu und inkubiere für 30 Minuten. Wasche die Zellen zweimal mit HBSS, wobei der zweite Waschschrift 2 Minuten dauert, was die Zellen verschließt. Setze anschließend Vector Diaminobenzoesäure (DAB) für 5 bis 10 Minuten zu. Verwende 2 Tropfen Puffer plus 4 Tropfen DAB plus 2 Tropfen H₂O₂ pro 5 ml Glas-destilliertem Wasser. Entferne die Kammer vorsichtig und wasche den Objektträger in Wasser. Trockne für einige Minuten an der Luft und setze anschließend 1 Tropfen Crystal Mount und ein Deckgläschen zu. Backe bei 85–90°C für 5 Minuten.

[0146] Alternativ dazu können die Bindungszusammensetzungen verwendet werden, um eine Affinitätsreinigung durchzuführen oder um Zellen auszusortieren, die das Antigen exprimieren. Siehe zum Beispiel Sambrook, et al. oder Ausubel, et al.

[0147] Ähnliche Verfahren sind anwendbar, um entweder Spezies-Varianten oder allelische Varianten zu isolieren. Spezies-Varianten werden unter Verwendung von Spezies-übergreifenden Kreuzhybridisierungsmethoden isoliert, die auf einer Sonde aus einem Isolat vollständiger Länge oder aus einem Fragment von einer Spezies basieren.

Biologische Aktivität von humanem CTLA-8

[0148] Synoviozyten werden aus Patienten mit rheumatoider Arthritis isoliert, die sich einer Synovektomie unterziehen. Primäre Zelllinien werden nach dem Verfahren von Dechanet, et al. (1993) J. Immunol. 151: 4908–4917, etabliert. In den Passagen 3 bis 8 werden Synoviozyten mit 10⁴ Zellen/Kammer in einer Platte mit 96 Vertiefungen und flachem Boden ausgesät. CTLA-8 wurde in die Vertiefungen gegeben und für 48 Stunden inkubiert. Die Überstände wurden anschließend geerntet und entweder sofort analysiert oder eingefroren. Alle Proben wurden in Dreifachansätzen mittels ELISA analysiert. ELISA-Kits für IL-6, IL-8, und GM-CSF stammten von Medgenix (Fleurus, Belgien). ELISA-Kits für MIP-1a und TGFβ stammten von R&D Systems (Minneapolis, MN). Die Konzentrationen an Prostaglandin E2 (PGE2) wurden mit einem RIA-Kit (New England Nuclear, Boston, MA) gemessen.

[0149] Gereinigtes, natives humanes CTLA-8 und CTLA-8-FLAG, das entweder von COS-7-transfizierten oder von NSO-transfizierten Zellen produziert worden war, induzierte signifikant die Sekretion von IL-6 aus rheumatoiden Synoviozyten von verschiedenen Patienten. In ähnlicher Weise stimulierte gereinigtes, natives humanes CTLA-8 aus NSO-Zellen die Sekretion von IL-8 und PGE2 aus rheumatoiden Synoviozyten.

[0150] Monoklonale Anti-CTLA-8-Antikörper wurden auf ihre Fähigkeit getestet, die biologische Aktivität von humanem CTLA-8 zu blockieren. 1 ng/ml humanes CTLA-8 wurde mit 1 µg/ml monoklonalem Anti-CTLA-8-Antikörper inkubiert, bevor es zu den Synoviozyten gegeben wurde. Die meisten monoklonalen Antikörper waren in der Lage, die Sekretion von IL-6 aus Synoviozyten partiell oder vollständig zu blockieren. In ähnlicher Weise wurde auch die von humanem CTLA-8 induzierte Sekretion von IL-8 und PGE2 durch den monoklonalen Anti-CTLA-8-Antikörper inhibiert. Zusammengefasst wiesen diese Ergebnisse darauf hin, dass CTLA-8 als proinflammatorisches Cytokin wirkt, das Fibroblasten-Zellen dazu veranlaßt, einen proinflammatorischen Mediator zu sekretieren, z.B. IL-6, IL-8, oder PGE2.

[0151] In dem nachstehend gezeigten Sequenzprotokoll ist SEQ ID NO: 1 die Nukleinsäuresequenz einer

Maus-CTLA-8-cDNA. SEQ ID NO: 2 ist die Aminosäuresequenz eines Maus-CTLA-8-Peptids. SEQ ID NO: 3 ist die Nukleinsäuresequenz eines ORF13 des Herpesvirus. SEQ ID NO: 4 ist die vorhergesagte Aminosäuresequenz eines ORF13 des Herpesvirus. SEQ ID NO: 5 ist die Nukleinsäuresequenz einer humanen CTLA-8-Exon-cDNA. SEQ ID NO: 6 ist die Aminosäuresequenz eines vorhergesagten humanen CTLA-8-Exons. SEQ ID NO: 7 ist die cDNA-Sequenz eines humanen CTLA-8 vollständiger Länge. SEQ ID NO: 8 ist die vorhergesagte Aminosäuresequenz eines humanen CTLA-8, das eine N-terminale Signalsequenz enthält. SEQ ID NO: 9 ist die vorhergesagte, reife biologisch aktive Aminosäuresequenz.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Schering Corporation
- (B) STRASSE: 2000 Galloping Hill Road
- (C) STADT: Kenilworth
- (D) STAAT: New Jersey
- (E) LAND: USA
- (F) POSTLEITZAHL: 07033-0530
- (G) TELEFAX: 908-298-5388
- (H) TELEX: 219165

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: INSERM
- (B) STRASSE: 101 rue de Tolbiac
- (C) STADT: Paris
- (D) STAAT:
- (E) LAND: Frankreich
- (F) POSTLEITZAHL: 75654
- (G) TELEFON:
- (H) TELEFAX:
- (I) TELEX:

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: GEREINIGTES PRIMATEN-CTLA-8-ANTIGENE UND VERWANDTE REAGENZIEN

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 8

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) ART DES MEDIUMS: Diskette
- (B) COMPUTER: Apple Macintosh
- (C) BETRIEBSSYSTEM: Macintosh 7.0
- (D) SOFTWARE: Microsoft Word 5.1a

(v) DATEN ZUR GEGENWÄRTIGEN ANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER:

(B) ANMELDEDATUM:

(vi) DATEN ZUR FRÜHEREN ANMELDUNGEN

(A) ANMELDENUMMER: US 08/250,846

(B) ANMELDEDATUM: 27. Mai 1994

(vi) DATEN ZUR FRÜHEREN ANMELDUNGEN

(A) ANMELDENUMMER: US 08/177,747

(B) ANMELDEDATUM: 5. Januar 1994

(vi) DATEN ZUR FRÜHEREN ANMELDUNGEN

(A) ANMELDENUMMER: US 08/077,203

(B) ANMELDEDATUM: 14. Juni 1993

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 1080 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(ix) MERKMAL

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) ORT: 12..464

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:1:

GAATTCATC C ATG TGC CTG ATG CTG TTG CTG CTA CTG AAC CTG GAG GCT	50
Met Cys Leu Met Leu Leu Leu Leu Leu Asn Leu Glu Ala	
1 5 10	

ACA GTG AAG GCA GCG GTA CTC ATC CCT CAA AGT TCA GTG TGT CCA AAC	98
Thr Val Lys Ala Ala Val Leu Ile Pro Gln Ser Ser Val Cys Pro Asn	
15 20 25	

GCC GAG GCC AAT AAC TTT CTC CAG AAC GTG AAG GTC AAC CTG AAA GTC	146
Ala Glu Ala Asn Asn Phe Leu Gln Asn Val Lys Val Asn Leu Lys Val	
30 35 40 45	
ATC AAC TCC CTT AGC TCA AAA GCG AGC TCC AGA AGG CCC TCA GAC TAC	194
Ile Asn Ser Leu Ser Ser Lys Ala Ser Ser Arg Arg Pro Ser Asp Tyr	
50 55 60	
CTC AAC CGT TCC ACT TCA CCC TGG ACT CTG AGC CGC AAT GAG GAC CCT	242
Leu Asn Arg Ser Thr Ser Pro Trp Thr Leu Ser Arg Asn Glu Asp Pro	
65 70 75	
GAT AGA TAT CCT TCT GTG ATC TGG GAG GCA CAG TGC CGC CAC CAG CGC	290
Asp Arg Tyr Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Gln Cys Arg His Gln Arg	
80 85 90	
TGT GTC AAC GCT GAG GGG AAG TTG GAC CAC CAC ATG AAT TCT GTT CTC	338
Cys Val Asn Ala Glu Gly Lys Leu Asp His His Met Asn Ser Val Leu	
95 100 105	
ATC CAG CAA GAG ATC CTG GTC CTG AAG AGG GAG CCT GAG AAG TGC CCC	386
Ile Gln Gln Glu Ile Leu Val Leu Lys Arg Glu Pro Glu Lys Cys Pro	
110 115 120 125	
TTC ACT TTC CGG GTG GAG AAG ATG CTG GTG GGC GTG GGC TGC ACC TGC	434
Phe Thr Phe Arg Val Glu Lys Met Leu Val Gly Val Gly Cys Thr Cys	
130 135 140	
GTT TCC TCT ATT GTC CGC CAT GCG TCC TAAACAGAGA CCTGAGGCTA	481
Val Ser Ser Ile Val Arg His Ala Ser	
145 150	
GGCCCTAAGA AACCCCTGCG TTTCTCTGCA AACTTCCTTG TCTTTTAAA	531
ACAGTTCACA GTTGAATCTC AGCAAGTGAT ATGGATTAA AGGCGGGGTT	581
AGAATTGTCT GCCTTCCACC CTGAAAAGAA GGCGCAGAGG GGATATAAAT	631
TGCTTCTTGT TTTTCTGTGG GCTTTAAATT ATTTATGTAT TTACTCTATC	681
CCGAGATAAC TTTGAGGCAT AAGTTATTTT AATGAATTAT CTACATTATT	731
ATTATGTTTC TTAATGCAGA AGACAAAATT CAAGACTAAG AAATTTTATT	781
ATTTAAAAGG TAAAACCTAT ATTTATATGA GCTATTTATG GGTCTATTTA	831
TTTTTCTTCA GTGCTAAGAT CATGATTATC AGATCTACCT AAGGAAGTCC	881
TAAATAATAT TAAATATTAA TTGAAATTTT AGTTTACTA TTTGCTTATT	931
TAAAGTTCCC TCCTCTGAAT GGTGTGAAAT CAAACCTCGT TTTATGTTTT	981
TAAATTATTG AGGCTTCGAA AAATTGGGCA ATTTAGCTTC CTACTGTGTG	1031
TTTAAAAACC TTGTAACAAT ATCACTATAA TAAATTTTTG GAAGAAAAT	1081

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 150 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:2

```

Met Cys Leu Met Leu Leu Leu Leu Asn Leu Glu Ala Thr Val Lys
 1           5           10           15

Ala Ala Val Leu Ile Pro Gln Ser Ser Val Cys Pro Asn Ala Glu Ala
          20           25           30

Asn Asn Phe Leu Gln Asn Val Lys Val Asn Leu Lys Val Ile Asn Ser
          35           40           45

Leu Ser Ser Lys Ala Ser Ser Arg Arg Pro Ser Asp Tyr Leu Asn Arg
          50           55           60

Ser Thr Ser Pro Trp Thr Leu Ser Arg Asn Glu Asp Pro Asp Arg Tyr
          65           70           75           80

Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Gln Cys Arg His Gln Arg Cys Val Asn
          85           90           95

Ala Glu Gly Lys Leu Asp His His Met Asn Ser Val Leu Ile Gln Gln
          100          105          110

Glu Ile Leu Val Leu Lys Arg Glu Pro Glu Lys Cys Pro Phe Thr Phe
          115          120          125

Arg Val Glu Lys Met Leu Val Gly Val Gly Cys Thr Cys Val Ser Ser
          130          135          140

Ile Val Arg His Ala Ser
          145          150

```

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 456 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(ix) MERKMAL

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) ORT: 1..453

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3

ATG ACA TTT AGA ATG ACT TCA CTT GTG TTA CTT CTG CTG CTG AGC ATA	48
Met Thr Phe Arg Met Thr Ser Leu Val Leu Leu Leu Leu Ser Ile	
1 5 10 15	
GAT TGT ATA GTA AAG TCA GAA ATA ACA AGC GCA CAA ACC CCA AGA TGC	96
Asp Cys Ile Val Lys Ser Glu Ile Thr Ser Ala Gln Thr Pro Arg Cys	
20 25 30	
TTA GCT GCT AAC AAT AGC TTT CCA CGG TCT GTG ATG GTT ACT TTG AGC	144
Leu Ala Ala Asn Asn Ser Phe Pro Arg Ser Val Met Val Thr Leu Ser	
35 40 45	
ATC CGT AAC TGG AAT ACT AGT TCT AAA AGG GCT TCA GAC TAC TAC AAT	192
Ile Arg Asn Trp Asn Thr Ser Ser Lys Arg Ala Ser Asp Tyr Tyr Asn	
50 55 60	
AGA TCT ACG TCT CCT TGG ACT CTC CAT CGC AAT GAA GAT CAA GAT AGA	240
Arg Ser Thr Ser Pro Trp Thr Leu His Arg Asn Glu Asp Gln Asp Arg	
65 70 75 80	
TAT CCC TCT GTG ATT TGG GAA GCA AAG TGT CGC TAC TTA GGA TGT GTT	288
Tyr Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg Tyr Leu Gly Cys Val	
85 90 95	
AAT GCT GAT GGG AAT GTA GAC TAC CAC ATG AAC TCA GTC CCT ATC CAA	336
Asn Ala Asp Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val Pro Ile Gln	
100 105 110	
CAA GAG ATT CTA GTG GTG CGC AAA GGG CAT CAA CCC TGC CCT AAT TCA	384
Gln Glu Ile Leu Val Val Arg Lys Gly His Gln Pro Cys Pro Asn Ser	
115 120 125	
TTT AGG CTA GAG AAG ATG CTA GTG ACT GTA GGC TGC ACA TGC GTT ACT	432
Phe Arg Leu Glu Lys Met Leu Val Thr Val Gly Cys Thr Cys Val Thr	
130 135 140	
CCC ATT GTT CAC AAT GTA GAC TAA	456
Pro Ile Val His Asn Val Asp	
145 150	

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 151 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:4

```

Met Thr Phe Arg Met Thr Ser Leu Val Leu Leu Leu Leu Leu Ser Ile
 1           5           10           15

Asp Cys Ile Val Lys Ser Glu Ile Thr Ser Ala Gln Thr Pro Arg Cys
      20           25           30

Leu Ala Ala Asn Asn Ser Phe Pro Arg Ser Val Met Val Thr Leu Ser
      35           40           45

Ile Arg Asn Trp Asn Thr Ser Ser Lys Arg Ala Ser Asp Tyr Tyr Asn
      50           55           60

Arg Ser Thr Ser Pro Trp Thr Leu His Arg Asn Glu Asp Gln Asp Arg
      65           70           75           80

Tyr Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg Tyr Leu Gly Cys Val
      85           90           95

Asn Ala Asp Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val Pro Ile Gln
      100          105          110

Gln Glu Ile Leu Val Val Arg Lys Gly His Gln Pro Cys Pro Asn Ser
      115          120          125

Phe Arg Leu Glu Lys Met Leu Val Thr Val Gly Cys Thr Cys Val Thr
      130          135          140

Pro Ile Val His Asn Val Asp
145          150

```

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENZEINGESCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 240 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(ix) MERKMAL

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) ORT: 1..240

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5

```

AGC CGC AAT GAG GAC CCT GAG AGA TAT CCC TCT GTG ATC TGG GAG GCA 48
Ser Arg Asn Glu Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala
  1           5           10           15

AAG TGC CGC CAC TTG GGC TGC ATC AAC GCT GAT GGG AAC GTG GAC TAC 96
Lys Cys Arg His Leu Gly Cys Ile Asn Ala Asp Gly Asn Val Asp Tyr
      20           25           30

CAC ATG AAC TCT GTC CCC ATC CAG CAA GAG ATC CTG GTC CTG CGC AGG 144
His Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Glu Ile Leu Val Leu Arg Arg
      35           40           45

GAG CCT CCA CAC TGC CCC AAC TCC TTC CGG CTG GAG AAG ATA CTG GTG 192
Glu Pro Pro His Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu Glu Lys Ile Leu Val
      50           55           60

TCC GTG GGC TGC ACC TGT GTC ACC CCG ATT GTC CAC CAT GTG GCC TA 240
Ser Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Ile Val His His Val Ala
  65           70           75           80

```

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 79 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

```

Ser Arg Asn Glu Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala
  1           5           10           15

Lys Cys Arg His Leu Gly Cys Ile Asn Ala Asp Gly Asn Val Asp Tyr
      20           25           30

His Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Glu Ile Leu Val Leu Arg Arg
      35           40           45

Glu Pro Pro His Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu Glu Lys Ile Leu Val
      50           55           60

Ser Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Ile Val His His Val Ala
  65           70           75

```


(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) Länge: 510 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) Ort 43..507

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

```

GGCACAACT CATCCATCCC CAGTTGATTG GAAGAAACAA CG ATG ACT CCT GGG      54
                               Met Thr Pro Gly
                               1

AAG ACC TCA TTG GTG TCA CTG CTA CTG CTG CTG AGC CTG GAG GCC ATA      102
Lys Thr Ser Leu Val Ser Leu Leu Leu Leu Ser Leu Glu Ala Ile
  5                10                15                20

GTG AAG GCA GGA ATC ACA ATC CCA CGA AAT CCA GGA TGC CCA AAT TCT      150
Val Lys Ala Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly Cys Pro Asn Ser
                25                30                35

GAG GAC AAG AAC TTC CCC CGG ACT GTG ATG GTC AAC CTG AAC ATC CAT      198
Glu Asp Lys Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn Leu Asn Ile His
                40                45                50

AAC CGG AAT ACC AAT ACC AAT CCC AAA AGG TCC TCA GAT TAC TAC AAC      246
Asn Arg Asn Thr Asn Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser Asp Tyr Tyr Asn
                55                60                65

CGA TCC ACC TCA CCT TGG AAT CTC CAC CGC AAT GAG GAC CCT GAG AGA      294
Arg Ser Thr Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu Asp Pro Glu Arg
  70                75                80

TAT CCC TCT GTG ATC TGG GAG GCA AAG TGC CGC CAC TTG GGC TGC ATC      342
Tyr Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His Leu Gly Cys Ile
  85                90                95                100

AAC GCT GAT GGG AAC GTG GAC TAC CAC ATG AAC TCT GTC CCC ATC CAG      390
Asn Ala Asp Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val Pro Ile Gln
                105                110                115

CAA GAG ATC CTG GTC CTG CGC AGG GAG CCT CCA CAC TGC CCC AAC TCC      438
Gln Glu Ile Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His Cys Pro Asn Ser
                120                125                130

TTC CGG CTG GAG AAG ATA CTG GTG TCC GTG GGC TGC ACC TGT GTC ACC      486
Phe Arg Leu Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys Thr Cys Val Thr
                135                140                145

CCG ATT GTC CAC CAT GTG GCC TAA      510
Pro Ile Val His His Val Ala
  150                155

```

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 155 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

```

Met Thr Pro Gly Lys Thr Ser Leu Val Ser Leu Leu Leu Leu Leu Ser
 1           5           10           15

Leu Glu Ala Ile Val Lys Ala Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly
      20           25           30

Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn
      35           40           45

Leu Asn Ile His Asn Arg Asn Thr Asn Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser
      50           55           60

Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu
 65           70           75           80

Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His
      85           90           95

Leu Gly Cys Ile Asn Ala Asp Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser
      100          105          110

Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His
      115          120          125

Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu Glu Lys Ile/Lys Leu Val Ser Val Gly Cys
      130          135          140

Thr Cys Val Thr Pro Ile Val His His Val/Leu Ala
145          150          155

```

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 132 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

```

Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys
 1           5           10           15

Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn Leu Asn Ile His Asn Arg Asn
          20           25           30

Thr Asn Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr
          35           40           45

Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser
          50           55           60

Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His Leu Gly Cys Ile Asn Ala Asp
65           70           75           80

Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile
          85           90           95

Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu
          100          105          110

Glu Lys Ile/Lys Leu Val Ser Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Ile
          115          120          125

Val His His Val/Leu Ala
          130

```

Patentansprüche

1. Nukleinsäure, die ein Primaten-CTLA-8-Protein kodiert, welches eine Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO: 8 oder 9 umfasst.
2. Nukleinsäure gemäß Anspruch 1, wobei die Nukleinsäure eine Sequenz nach SEQ ID NO: 7 umfasst.
3. Im wesentlichen reines Primaten-CTLA-8-Protein, das die Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO: 8 oder 9 umfasst.
4. Zusammensetzung, die ein Protein gemäß Anspruch 3 und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger umfasst.
5. Antikörper, der spezifisch an eine Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO: 8 oder 9 bindet.
6. Antikörper gemäß Anspruch 5, wobei der Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist.
7. Antikörper gemäß Anspruch 6, wobei der Antikörper markiert ist.
8. Antikörper gemäß Anspruch 6, wobei der Antikörper eine von CTLA-8 induzierte Sekretion eines Entzündungsmediators blockiert.

9. Antikörper gemäß Anspruch 8, wobei der Entzündungsmediator IL-6, IL-8 oder PGE2 ist.

10. In vitro-Verfahren zur Modulierung der Physiologie oder Entwicklung einer Zelle, bei dem man die Zelle mit einem Antikörper in Kontakt bringt, der spezifisch an eine Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO: 8 oder 9 bindet.

11. In vitro-Verfahren zur Modulierung der von CTLA-8 induzierten Sekretion eines Entzündungsmediators aus einer Zelle in ein Gewebe, bei dem man das Gewebe mit

- a) einem Antikörper, der spezifisch an eine Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO: 8 oder 9 bindet, oder mit
- b) einer Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO: 8 oder 9 in Kontakt bringt.

12. Verfahren gemäß Anspruch 11, bei dem der Entzündungsmediator IL-6, IL-8 oder PGE2 ist.

13. Kit, umfassend:

- a) eine Nukleinsäure, die mindestens zu 95% mit einer Nukleinsäure identisch ist, welche ein Primaten-CTLA-8-Protein kodiert, wobei das Protein die Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO: 8 oder 9 umfasst; oder
- b) ein im wesentlichen reines Primaten-CTLA-8-Protein, wobei das Protein die Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO: 8 oder 9 umfasst; oder
- c) einen Antikörper, der spezifisch an eine Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO: 8 oder 9 bindet.

14. Kit gemäß Anspruch 13, bei dem die kodierende Nukleinsäure eine Sequenz nach SEQ ID NO: 7 umfasst.

15. Kit gemäß Anspruch 13, bei dem das Protein ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus

- a) einem Protein, das von einem Menschen abgeleitet ist;
- b) einem Protein, das mindestens ein Polypeptidsegment von SEQ ID NO: 8 oder 9 umfasst; und
- c) einem Protein, das ein post-translationales Modifikationsmuster aufweist, welches sich von einem natürlichen Primaten-CTLA-8-Protein unterscheidet.

16. Kit gemäß Anspruch 13, das einen Antikörper umfasst, wobei:

- a) das CTLA-8-Protein von einem Menschen abgeleitet ist;
- b) der Antikörper gegen eine Peptidsequenz von SEQ ID NO: 8 oder 9 gerichtet ist;
- b) der Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist; oder
- d) der Antikörper markiert ist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen