



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **317836**

(13) **B1**

(51) Int Cl⁷

C 07 K 14/725, 19/00 ,
C 12 N 15/12

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19963018	(86)	Innt.inng.dag og søknadsnr	
(22)	Inng.dag	1996.07.19	(85)	Videreføringsdag	
(24)	Løpedag	1996.07.19	(30)	Prioritet	1995.07.21, US, 505058
(41)	Alm.tilgj	1997.01.22			
(45)	Meddelt:	2004.12.20			
(71)	Søker	Bristol-Myers Squibb Co , 345 Park Avenue, NY10154 NEW YORK, US			
(72)	Oppfinner	Jeffrey A. Ledbetter, Seattle, WA, US Peter S Linsley, 2430 9th Avenue West, Seattle, WA 98119, US Robert Peach, Edmonds, WA, US			
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS , Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, NO			
(54)	Benevnelse	CTLA4-mutantmolekyl, fremgangsmåte for fremstilling og anvendelse derav, inkludert nukleinsyremolekyl som koder for CTLA4-mutantmolekylet, plasmid og vertsvektor-system omfattende nukleinsyremolekylet og farmasøytisk blanding omfattende CTLA-mutantmolekylet			
(56)	Anførte publikasjoner	Ingen			
(57)	Sammendrag				

Det beskrives CTLA4-mutantmolekyler som ligander for B7-antigenet. Likeledes beskrives fremgangsmåter for ekspresjon av CTLA4-mutantmolekyler som løselige, funksjonelle molekyler, og for fremstilling av CTLA4-mutantfusjonsproteiner, samt for anvendelse av disse molekylene til regulering av T-celleinteraksjoner, og immunresponser mediert av slike interaksjoner.

Foreliggende oppfinnelse vedrører CTLA4-mutantmolekyl, fremgangsmåte for fremstilling og anvendelser derav, inkludert nukleinsyremolekyl som koder for CTLA4-mutantmolekylet, plasmid og vertsvektor-system omfattende nukleinsyremolekylet og farmasøytisk blanding omfattende CTLA-mutantmolekylet.

Foreliggende oppfinnelse vedrører mer spesielt ekspresjon av CTLA4-mutantmolekyler og fremgangsmåter for å regulere cellulære interaksjoner ved å benytte CTLA 4-mutantmolekylene.

I denne søknad gjøres det henvisninger til ulike publikasjoner. Beskrivelsene i disse publikasjonene inkorporeres herved med hele deres innhold i foreliggende beskrivelse for å gi en mer fullstendig beskrivelse av teknikkens stilling på dette området.

Sentrale begivenheter som fører til en spesifikk immunrespons overfor antigener involverer nær assosiering mellom T-lymfocytter og antigen-presenterende celler (APC). For at T-celler med hell skal heve celle-medierte eller antistoff-medierte immunresponser opp til en antigen stimulus, fordres klare aktiverings-signaler fra den antigen-presenterende celle. Et antigen-spesifikt signal inntre når T-celle-antigenreseptoren binder seg til antigene peptider presentert av molekyler tilhørende MHC (major histocompatibility complex) på overflaten av APC. Denne ene begivenhet er imidlertid ikke nok til å stimulere T-celler til å proliferere, og kan alene føre til klonal inaktivering eller anergi (Schwartz, R.H. (1990) Science 248:1349-1356). For at det skal inntre en effektiv immunrespons må det til T-cellen også avgis et andre ikke-antigen spesifikt kostimulerende signal fra en APC (Freeman et al., (J. Immunol. 143(8):2714-2722 (1989)).

CTLA4 er en T-celle-overflatereseptor som assosieres med B7 mot-reseptoren, hvilket vil si B7-1 (CD80) og B7-2 (CD86), som uttrykkes på antigen-presenterende celler (Hathcock et al., "Comparative Analysis of B7-1 and B7-2 Co-Stimulatory Ligands: Expression and Function" 1994 Journal of Experimental Medicine, 180(2):631-40). Denne assosiering etablerer den molekylære basis for en viktig T-celle kostimulerende bane, hvis primære funksjon er å indusere T-celle-cytokinproduksjon og proliferasjon etter eksponering for antigen (Linsley et al., J. Exp. Med. 173:721-730 (1991)). Bestyrkende data har vist at en form av CTLA4, nemlig CTLA4Ig, virker som en potent inhibitor av immunresponser in vitro, ved å blokkere CD28/B7-interaksjoner, hvorved T-celleproliferasjon forhindres og antigen-spesifikk ikke-responsivitet indueres (Blazar et al., "In vivo Blockade of

CD28/CTLA4: B7/BB1 Interaction with CTLA4-Ig Reduces Lethal Murine Graft-Versus-Host Disease Across the Major Histocompatibility Complex Barrier in Mice", Blood, 1994, 15. juni, 83(12):3815-25).

Disse kostimulerende signalers natur har vært i fokus for intense
5 forskningsanstrengelser, hvor målet ikke bare har vært å forstå immunsystemet, men også å utvikle terapeutiske midler som kunne blokkere avgivelsen av kostimulerende signaler, og derved ytterligere manipulere immunresponser. CTLA4-mutant-molekylene ifølge oppfinnelsen, er utviklet for disse formål.

Foreliggende oppfinnelse beskriver CTLA4-molekyler som er blitt mutert for å
10 påvirke deres evne til å binde B7-ligandene. Disse mutasjonene er lokalisert til det ekstracellulære domenet av CTLA4. Nærmere bestemt er mutasjonene frembragt i posisjonene for den første tyrosindel innen MYPPPY-motivet av det ekstracellulære CTLA4-domenet. Vi viser at mutantene (dvs. de som har alanin, arginin, asparagin, asparaginsyre, cystein, glutamin, glutaminsyre, glycin, histidin, isoleucin, leucin, lysin,
15 metionin, fenylalanin, prolin, serin, treonin, tryptofan eller valin i denne posisjon) har evnen til å binde B7-1 (CD80). Enkelte av disse binder imidlertid ikke B7-2 (CD86). I tillegg tilveiebringes fremgangsmåter for å fremstille og benytte CTLA4-mutantmolekylene ifølge oppfinnelsen.

20 Kort beskrivelse av figurene

Figur 1 er et diagram som viser forskyvningstilpassede oppstilte sekvenser av medlemmer av CD28 og CTLA4 familien. Sekvenser av human (H), mus (M), rotte (R), og høns (Ch) CD28 er stillet på linje med human- og mus-CTLA4. Restene er nummerert fra det modne proteins N-terminal med signalpeptidene og
25 transmembrandomenene understreket og CDR-analoge regioner avmerket. Mørkskraverte områder viser fullstendig konservering av rester, mens lyst skraverte områder viser konservative aminosyresubstitusjoner i alle familiemedlemmer (SEKV. ID. Nr.:1-6).

Figur 2 er en grafisk fremstilling som viser CTLA4Ig- og CD28Ig-mutanter som
30 binder B7-1.

Figur 3 er et skjematisk kart av CTLA4/CD28Ig-hybridfusjonsproteiner. Åpne områder representerer CD28-sekvens; fylte områder representerer CTLA4-sekvens; kryssmerkede områder representerer begynnelsen av IgG Fc (se også Tabell I).

Figur 4 er en grafisk fremstilling som viser at CTLA4/CD28Ig-hybridfusjonsproteiner begjærlig binder seg til B7-1 CHO-celler.

Figur 5 er en grafisk fremstilling som viser at CTLA4/CD28Ig-hybridfusjonsproteiner begjærlig binder seg til B7-1 CHO-celler.

Figur 6 er en molekylmodell av et monomert CTLA4Ig v-lignende ekstracellulært domene.

Figur 7 er et stolpediagram hvor evnen til CTLA4Ig villtype (w.t.) sammenlignes med mutantmolekyler for binding av CHO-celler som uttrykker enten CD80 eller CD86. Villtypemolekylet er betegnet MYPPPY, som utgjør sekvensen for det naturlig forekommende motiv. De individuelle mutanter angis på samme måte. Bokstavsymbolet for aminosyren substituert i den andre posisjon i dette heksapeptid, indikerer den spesifikke mutasjon.

Figur 8 er en sammenligning av villtype- (w.t.) og mutant-bindingsevne under bruk av forskjellige konsentrasjoner av disse CTLA4Ig fusjonsproteinene. Som omtalt i Figur 7, er mutantene angitt med deres respektive motivsekvenser.

Figur 9 er en undersøkelse av antistoffkonkurranse med LCL 816-cellelinjen. Denne figur sammenligner CTLA4Ig villtype- og mutantproteinbinding til CD80 eller CD86 i nærvær av forskjellige konsentrasjoner av anti-CD80- eller anti-CD86-antistoffer. Som omtalt i Figur 7, er de spesifikke proteiner angitt med deres respektive motivsekvenser.

I denne beskrivelse har følgende ord og vendinger de angitte betydninger.

I denne sammenheng betyr "blokkering av B7-interaksjon" å interferere med bindingen av B7-antigenene til deres ligander, som f.eks. CD28 og/eller CTLA4, og derved hindre T-celle- og B-celleinteraksjon.

I denne sammenheng betyr et "B7-bindende molekyl" et hvilket som helst molekyl som vil binde ett eller begge, B7-antigenene.

I denne sammenheng betyr et "molekyl reaktivt med CD80-antigenet" et hvilket som helst molekyl som vil gjenkjenne og binde CD80.

I denne sammenheng betyr et "molekyl reaktivt med CD86-antigenet" et hvilket som helst molekyl som vil gjenkjenne og binde CD86.

I denne sammenheng betyr et "ikke-CTLA4-molekyl" et hvilket som helst molekyl som kan knyttes til eller forbindes med det ekstracellulære CTLA4-domenet og ikke interfererer med bindingen av CTLA4 til dens mål. Disse molekylerne inkluderer en polypeptidmerking, en immunglobulin (Ig)-hale, et biologisk eller

kjemisk aktivt protein, så som papillomavirus E7-genproduktet, melanom-assosiert antigen p97 og HIV env-protein eller en sekvens av aminosyrer som gjør den ekstracellulære del av CTLA4, eller mutageniserte former derav, løselige og aktive.

Med tanke på en mer fullstendig forståelse følger en videre beskrivelse av oppfinnelsen.

Oppfinnelsen tilveiebringer CTLA4-mutantmolekyler som er reaktive med CD80-antigenet, hvor det første tyrosin i aminosyremotivet MYPPPY i det ekstracellulære CTLA4-domenet, er erstattet med fenylalanin eller tryptofan. CTLA4-mutantmolekyler kan ha mange former. Den eneste begrensning er at formen beholder sin evne til å binde CD80.

Ifølge en utførelsesform av oppfinnelsen, er CTLA4-mutantmolekylet et funksjonelt, løselig CTLA4-mutantmolekyl. Det ekstracellulære CTLA4-domenet er et eksempel på et løselig CTLA4-mutantmolekyl. I et eksempel binder det løselige CTLA4-mutantmolekyl CD80-antigenet, men binder ikke CD86-antigenet.

I en annen utførelsesform av oppfinnelsen har det løselige CTLA4-mutantmolekyl det ekstracellulære domenet av mutagenisert CTLA4 bundet til et non-CTLA4-molekyl (også omtalt som CTLA4-mutantfusjonsproteiner), så som en polypeptidmerking. Andre utførelsesformer av løselige CTLA4-molekyler, inkluderer de som har det ekstracellulære domene av mutagenisert CTLA4 fusjonert eller forbundet med en del av et biologisk eller kjemisk aktivt protein, som f.eks. papillomavirus E7-genproduktet, melanom-assosiert antigen p97 og HIV env-protein.

I henhold til foreliggende oppfinnelse kan CTLA4-mutante og homologe molekyler ifølge oppfinnelsen ha andre aminosyresubstitusjoner og fremdeles beholde den funksjonelle egenskap til CTLA4-mutantmolekyler, nemlig at molekyler som har slike substitusjoner fremdeles vil binde CD80-antigenet. Disse aminosyresubstitusjonene inkluderer, men er ikke nødvendigvis begrenset til, aminosyresubstitusjoner kjent som "konservative".

Det er for eksempel innenfor proteinkjemien velkjent at visse aminosyresubstitusjoner, betegnet "konservative aminosyresubstitusjoner", ofte kan foretas i et protein uten å endre hverken konformasjonen eller funksjonen av proteinet. Slike forandringer innbefatter erstatning av en hvilken som helst av isoleucin (I), valin (V) og leucin (L) med en annen av disse hydrofobe aminosyrene; asparaginsyre (D) med glutaminsyre (E) og vice versa; glutamin (Q) med asparagin (N) og vice versa; og serin (S) med treonin (T) og vice versa. Andre substitusjoner kan også ansees

som konservative, avhengig av vedkommende aminosyres miljø og dens rolle i proteinets tredimensjonale struktur. For eksempel kan glycin (G) og alanin (A) ofte byttes om, likeså alanin og valin (V).

Metionin (M) som er relativt hydrofob, kan ofte byttes ut med leucin og isoleucin og iblant med valin. Lysin (K) og arginin (R), lar seg ofte skifte ut i posisjoner hvor det vesentlige trekk ved aminosyren er dens ladning, og hvor forskjellen mellom de to aminosyrerestenes ulike pK-verdier ikke er vesentlig. Også andre endringer kan ansees som "konservative" i bestemte omgivelser.

Ifølge et annet aspekt av foreliggende oppfinnelse tilveiebringes en fremgangsmåte for fremstilling av et CTLA4-mutantmolekyl som omfatter dyrkning av vertsvektorsystemet ifølge krav 13, slik at CTLA4-mutantmolekylet dannes og gjenvinning av det således dannede CTLA4-mutantmolekyl.

Teknikkene for kloning og ekspresjon av DNA-sekvenser som koder for aminosyresekvenser som tilsvarer CTLA4-mutantmolekyler, f.eks. syntese av oligonukleotider, PCR, transformering av celler, konstruksjonsvektorer, ekspresjonssystemer og lignende, er velkjente på området, og de fleste utøvere er fortrolige med standardressursene for bestemte betingelser og prosedyrer. De etterfølgende avsnitt er imidlertid tatt med for lettvinthets skyld og for å peke på eventuelle modifikasjoner av standardteknikker og kan gi en viss veiledning.

I ytterligere aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse nukleinsyremolekyl som koder for CTLA4-mutantmolekylet ifølge oppfinnelsen, plasmid som omfatter nevnte nukleinsyremolekyl samt et vertsvektor-system som omfatter plasmidet ifølge oppfinnelsen.

Kloning og ekspresjon av kodende sekvenser for reseptorer og fusjonsproteiner

Konstruksjoner tilsvarende CTLA4-mutantmolekyler ifølge foreliggende oppfinnelse ble fremstillet som beskrevet av Linsley et al., J. Exp. Med. 173:721-730 (1991), som herved med hele sitt innhold inkorporeres i foreliggende beskrivelse.

Alternativt kan cDNA-kloner fremstilles fra RNA oppnådd fra celler som uttrykker B7-antigen og CD28-reseptor, på grunnlag av kjennskapet til de publiserte sekvenser for disse proteiner (Aruffo & Seed, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:8573-8577 (1987) og Freeman et al., "Murine B7-2, an Alternative CTLA4 Counter-Receptor that Co-

Stimulates T-cell Proliferation and Interleukin 2 Production" (1993) Journal of Experimental Medicine 178(6):2185-92) ved å benytte standardprosedyrer.

CTLA4-mutantmolekyler bestående av DNA som koder for aminosyresekvenser tilsvarende det ekstracellulære domenet av mutagenisert CTLA4 og hengselområdet, CH2- og CH3-regionene i humant IgG1, ble konstruert ved limering av PCR-fragmenter. Det cDNA som koder for aminosyresekvensene amplifiseres ved å benytte PCR-teknikk (polymerase kjedereaksjon) (US-patent 4.683.195 og 4.683.202 til Mullis et al., og Mullis & Faloona, Methods Enzymol. 154:335-350 (1987)). Det ble oppnådd CTLA4Ig mutantfusjonspolypeptider som hadde DNA som kodet for aminosyresekvenser fra ca. posisjon 1 til ca. posisjon 125 av det ekstracellulære domenet av CTLA4 og som tilsvarer hengselet, CH2- og CH3-regionene av IgG1.

cDNA fremstillet ved PCR fra hele det cellulære RNA fra flere humane leukemi-cellelinjer ble underkastet screening ved, som primære, å benytte oligonukleotider fra den publiserte sekvens av CTLA4-genet (Dariavach et al., supra). Av de undersøkte cDNA ga H38-celler (en HTLV II-assosiert leukemilinje) best utbytte av de PCR-produkter som hadde den forventede størrelse. Siden det ikke ble identifisert noe signalpeptid for CTLA4 i CTLA4-genet, ble N-terminalen av den predikerte sekvens av CTLA4 fusjonert til signalpeptidet av onkostatins M (Malik et al., Molec. and Cell. Biol. 9:2847 (1989)) i to trinn ved å benytte oligonukleotider. Produktet fra PCR-reaksjonen ble ligert med den cDNA som kodet for de aminosyresekvensene som tilsvarte hengselet, CH2- og CH3-regionene av IgG1 inn i en ekspresjonsvektor, som f.eks. CDM8 eller π LN.

For å få et DNA som kodet for hele lengden av det humane CTLA4, ble et cDNA som koder for transmembrane og cytoplasmiske domener av CTLA4 oppnådd ved PCR fra H38-celler og forbundet med et fragment fra CTLA4Ig, oppnådd som beskrevet ovenfor, som kodet for onkostatins M-signalpeptidet, fusjonert til N-terminalen av CTLA4, ved å benytte oligonukleotidprimere som beskrevet i Eksempelene nedenfor. PCR-fragmentene ble ligert inn i plasmidet CDM8, hvilket resulterte i et ekspresjonsplasmid som kodet for hele lengden av CTLA4-genet og som ble betegnet OMCTLA4.

For å frembringe mutasjoner i bestemte regioner av CTLA4-sekvensen, ble det foretatt seterettet mutagenese på π LN-vektoren, som inneholdt den løselige kimære form av CTLA4 (CTLA4Ig), hvor det ekstracellulære domenet av CTLA4

genetisk ble fusjonert til hengsel-regionen og konstante regioner av en human IgG tung kjede (Linsley et al., J. Exp. Med. 173:721-730 (1991)). De CTLA4Ig-seterettede mutantene ble fremstillet ved å kode de ønskede mutasjoner inn i overlappende oligonukleotidprimere og frembringe mutantene ved PCR (Ho et al.,
 5 1989, supra) under bruk av π LN CTLA4Ig plasmidkonstruksjonen som templat.

For å frembringe en lang rekke mutanter som var rettet mot det ekstra-cellulære domenet, ble kodonet for det første tyrosin i MYPPPY-motivet endret for å oppnå nye kodoner som kodet for hver av de øvrige 19 aminosyrene. Siden dette motiv synes å være avgjørende for CTLA-B7-ligandinteraksjonene, vil alle CTLA4-
 10 molekyler som inneholder disse mutasjonene, ha fått endret sin evne til å binde B7-antigenene.

For å fremstille større mengder av klonet DNA, ble vektorer inneholdende mutant CTLA4-DNA ifølge oppfinnelsen, transformert inn i egnede vertsceller, som f.eks. bakteriecellelinjen *E. coli* stamme MC1061/p3 (Invitrogen Corp., San Diego,
 15 CA) ved å benytte standardprosedyrer, og koloniene underkastet screening med henblikk på de passende plasmider.

Klonene som inneholdt mutant CTLA4-DNA oppnådd som beskrevet ovenfor, transfekteres deretter inn i passende vertsceller for ekspresjon. Avhengig av den anvendte vertscelle, foretas transfeksjonen ved å benytte standardteknikker som er
 20 egnet for slike celler. Transfeksjon inn i pattedyrceller skjer for eksempel ved å benytte DEAE-dextran-mediert transfeksjon, CaPO_4 -kopresipitasjon, lipofeksjon, elektroporering eller protoplastfusjon, samt andre kjente metoder, inklusivt: lysozymfusjon eller erytrocyttfusjon, "scraping", direkte opptak, osmotisk- eller sukrose-sjokk, direkte mikroinjeksjon, indirekte mikroinjeksjon, f.eks. ved hjelp av
 25 erytrocytt-medierte teknikker og/eller ved å underkaste vertscellen elektriske strømstøt. Denne oppregning av transfeksjonsteknikker ansees ikke som fullstendig, idet andre fremgangsmåter for innføring av genetisk informasjon i celler uten tvil vil bli utviklet.

Ekspresjon i eukaryote vertscellekulturer avledet fra flercellede organismer foretrekkes (Tissue Cultures, Academic Press, Cruz & Patterson, red. (1973)). Disse
 30 systemene har den ytterligere fordel at de har evne til å spleise ut introner slik at de kan benyttes direkte for å uttrykke genomiske fragmenter. Egnede vertscellelinjer innbefatter kinesisk hamsterovarium (CHO), apenyrrer (COS), VERO- og HeLa-celler.

I henhold til foreliggende oppfinnelse foretrekkes cellelinjer som stabilt uttrykker fusjonskonstruksjonene.

Ekspresjonsvektorer for slike celler innbefatter vanligvis promotere og kontrollsekvenser som er forlikelige med pattedyrceller, som for eksempel CMV-promoter (CDM8-vektor) og ASV (avian sarcoma virus) (π LN-vektor). Andre vanlig benyttede tidlige og sene promotere innbefatter slike fra SV40 (Simian Virus 40) (Fiers, et al., Nature, 273:113 (1973)) eller andre virale promotere, så som de som er avledet fra polyoma, adenovirus 2, og bovint papillomavirus. Den kontrollerbare promoteren, hMTII (Karin, et al., Nature, 299:797-802 (1982)) kan også benyttes.

Generelle sider ved transformasjoner med pattedyrceller som vertssystem har vært beskrevet av Axel (US-patent 4.399.216 av 16. august, 1983). Det viser seg nå at "enhancer"-regioner er viktige for optimalisering av ekspresjonen. Dette er i alminnelighet sekvenser som finnes oppstrøms eller nedstrøms for promoter-regionen i ikke-kodende DNA-regioner. Replikasjonsorigo kan, ved behov, oppnås fra virale kilder. Integrasjon i kromosomet er imidlertid en vanlig mekanisme for DNA-replikasjon i eukaryoter.

Selv om foretrukne vertsceller for ekspresjon av fusjonskonstruksjonene inkluderer eukaryote celler som COS- eller CHO-celler, kan andre eukaryote mikroorganismer også benyttes som verter. Laboratoriestammer av *Saccharomyces cerevisiae*, bakegjær, er de mest anvendte, men andre stammer så som *Schizosaccharomyces pombe* kan benyttes. Vektorer som gjør bruk av for eksempel 2μ replikasjonsorigo av Broach, Meth. Enz. 101:307 (1983), eller andre replikasjonsorigo som er forlikelige med gjær (for eksempel Stinchcomb et al., Nature 282:39 (1979)); Tschempe et al., Gene 10:157 (1989); og Clarke et al., Meth. Enz. 101:300 (1983)) kan benyttes. Kontrollsekvenser for gjærvektorer innbefatter promotere for syntesen av glykolytiske enzymer (Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg. 7:149 (1968); Holland et al., Biochemistry 17:4900 (1978)). Andre promotere som er kjent på området, inkluderer CMV-promoteren som foreligger i CDM8-vektoren (Toyama & Okayama, FEBS 268:217-221 (1990)); promoteren for 3-fosfoglyceratkinase (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255:2073 (1980)), samt de for andre glykolytiske enzymer. Andre promotere som har den ytterligere fordel at transkripsjonen kontrolleres av vekstbetingelsene, er promoterregionene for alkoholdehydrogenase 2, isocytokrom C, sur fosfatase, nedbrytende enzymer assosiert med nitrogen-metabolisme og enzymer som er ansvarlige for maltose- og

galaktoseutnyttelse. Det antas også at terminatorsekvenser er ønskelige i 3'-enden av de kodende sekvenser. Slike terminatorsekvenser finnes i den 3'-ikke-translaterte region etter de kodende sekvenser i gener som skriver seg fra gjær.

Som et alternativ kan prokaryote celler benyttes som ekspresjonsverter.

- 5 Prokaryoter utgjøres oftest av ulike stammer av *E. coli*, men andre mikrobielle stammer kan også benyttes. Vanlig anvendte prokaryote kontrollsekvenser som her er definert å innbefatte promotere for transkripsjonsinitiering, eventuelt med en operator, sammen med sekvenser for ribosombindingssetet, inkluderer slike vanlig benyttede promotere som β -laktamase- (penicillinase) og laktose- (*lac*)
- 10 promotersystemene (Chang et al., *Nature* 198:1056 (1977)), tryptofan (*trp*)-promotersystemet (Goeddel et al., *Nucleic Acids Res.* 8:4057 (1980)) og den lambda-avledede P_L -promoter og N-gen ribosombindingssetet (Shimatake et al., *Nature* 292:128 (1981)).

- De nukleotidsekvensene som koder for CTLA4-mutantmolekyler kan uttrykkes
- 15 i en rekke systemer omtalt nedenfor. cDNA kan kuttes ut med passende restriksjonsenzymmer og ligeres inn i passende prokaryote eller eukaryote ekspresjonsvektorer for slik ekspresjon. Ekspresjonen av CTLA4-mutantmolekyler som fusjonsproteiner gjør dannelse av dimerer av disse proteiner mulig.

- Ekspresjon av den mutante CTLA4-reseptor ifølge oppfinnelsen oppnås ved å
- 20 transfektere en celledinje, som f.eks. COS-celler, og påvise ekspresjon ved binding av de CTLA4-transfekterte celler til en ligand for CTLA4-reseptoren, for eksempel ved å teste for binding av cellene til B7Ig-fusjonsprotein. Ekspresjon av mutant-CTLA4Ig-fusjonsprotein ifølge oppfinnelsen oppnås ved å transfektere en celledinje, som f.eks. COS-celler, og påvise ekspresjon ved testing for binding av mutant-
- 25 CTLA4Ig-fusjonsprotein til celler som uttrykker den passende ligand.

- Sekvenser av de resulterende konstruksjoner bekreftes gjennom DNA-sekvensering under bruk av kjente fremgangsmåter, for eksempel som beskrevet av Sanger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463 (1977), som videre beskrevet av Messing et al., *Nucleic Acids Res.* 9:309 (1981) eller ved hjelp av metoden til Maxam
- 30 et al., *Methods Enzymol.* 65:499 (1980)).

Konstruksjon og ekspresjon av løselige CTLA4-mutantmolekyler

De passende DNA-fragmentene av CTLA4-mutantmolekyler og protein-partnere eller merkingen (f.eks. biologiske eller kjemisk aktive molekyler, så som

ovalbumin, p97, E7 og env gp120) kan isoleres fra cDNA ved PCR ((US-patent 4.683.195 og 4.683.202 til Mullis et al., og Mullis & Faloona, Methods Enzymol. 154:335-350 (1987)).

DNA for fusjonsproteinene for CTLA4 kan fremstilles ved å ligere DNA av CTLA4 med DNA for forskjellige proteinmerkinger. Ved ELISA- og FACS-analyser ble bindingen og ekspresjonen av de løselige CTLA4-mutantmolekylene påvist ved å benytte antistoffer rettet mot merkingen, f.eks. ovalbumin, env gp120, HPV E7 og p97.

DNA-sekvensen av ovalbumingenet er kjent (Schweers et al. J. Biol. Chem. (1990) 265(13):7590-5); DNA-sekvensen av E7 papillomavirus onkogenet er kjent (Tindle et al., J. Gen. Vir. (1990) 71:1347-54; DNS-sekvensen av det melanom-assosierte antigen p97 er kjent (Kahn et al., J. Immunol. (1991) 146(9):3235-41); DNA-sekvensen av env gp120 er kjent (Wain-Hobson et al., "Nucleotide sequence of AIDS virus LAV" Cell (1985) 40:9-17; Ratner et al., "Complete nucleotide sequence of the AIDS virus HTLV3" Nature 313:277-284 (1985)). Identiteten av de resulterende gener for hver av de løselige molekylene (dvs. fusjonsproteiner) kan bekreftes ved DNA-sekvensering.

Fusjonsproteinenes cDNA kan uttrykkes enten i pattedyr- (cos, DEAE-dekstrantransfeksjon) eller insekt-baculovirustransfeksjon) cellelinjer (Jones et al. Nature (1986) 523:346). Supernatantene av de transfekterte cellelinjene ble høstet, analysert og fusjonsproteinene deretter rensset ved affinitetskromatografi.

Isolering av proteinprodukter

DNA som koder for den aminosyresekvens som tilsvarer det ekstracellulære domenet av CTLA4, inklusivt kodonene for en signalsekvens, så som den for onkostatin M, i celler som er i stand til riktig prosessering, fusjoneres med DNA som koder for den aminosyresekvens som tilsvarer Fc-domenet av et naturlig dimert protein. Rensing av disse fusjonsproteinproduktene etter sekresjon fra cellene forenkles således ved å benytte antistoffer som er reaktive med anti-immunglobulindelen av fusjonsproteinene. Når fusjonsproteinet utskilles i mediet, gjenvinnes det ved å benytte standardteknikker for proteinrensing, som for eksempel ved å påsettes protein-A-kolonner.

CTLA4-proteiner som har de bestemte aminosyresubstitusjoner i posisjonen for det første tyrosin i MYPPPY-motivet, har enestående bindingsevner. Mutanter

som frembringes ved å erstatte dette tyrosin med fenyylalanin eller med tryptofan, har evnen til å skjelne mellom B7-antigenene. Disse mutantmolekylene vil binde B7-1- (CD80) antigenet, men ikke B7-2- (CD86) antigenet. Disse mutantmolekylene kan derfor benyttes for å skjelne mellom de to antigenene. Dessuten kan disse mutantene benyttes for på ulik måte, å påvirke de spesifikke biologiske prosessene som medieres av de forskjellige B7-antigenene.

I henhold til foreliggende oppfinnelse tilveiebringes anvendelser av CTLA4-mutantmolekylet ifølge oppfinnelsen for fremstilling av farmasøytiske blandinger.

CTLA4-mutantmolekyler og/eller fragmenter derav, kan omsettes med B7 positive celler, så som B-celler, for å regulere immunresponser mediert av T-celle-interaksjoner med B7-antigen-positive celler, eller benyttes *in vitro* for leukocyttyping for å definere B-celle-modningstilstander og/eller B-celle-assosierte sykdommer (Yokochi et al., J. Immuno. 128(2):823). Overflate-immunofarving av leukocyter oppnås ved immun-fluorescenssteknikk eller immun-enzymatiske metoder, men andre påvisningsmetoder er også mulige.

Løselige CTLA4-mutantmolekyler og/eller fragmenter og derivater av disse proteinene, kan også benyttes for å reagere med B7-positive celler, inklusivt B-celler, for å regulere immunresponser mediert av T-celle-avhengige B-celleresponser.

Betegnelsen "fragment" betyr i denne sammenheng en del av den aminosyresekvens av proteinet betegnet "CTLA4", som er i stand til å binde B7. Et fragment av det løselige CTLA4-mutantmolekyl som kan benyttes, er et polypeptid som har en aminosyresekvens som tilsvarer en del av den aminosyresekvens som tilsvarer den CTLA4-reseptor som benyttes for å oppnå det løselige CTLA4-protein som her er beskrevet.

I et ytterligere aspekt av oppfinnelsen tilveiebringes en farmasøytisk blanding som omfatter CTLA4-mutantmolekylet ifølge oppfinnelsen og en farmasøytisk akseptabel bærer.

CTLA4-mutantmolekyler kan innføres *in vivo* i en passende farmasøytisk bærer, dvs. administreres i et individ for behandling av patologiske tilstander, som f.eks. sykdommer i immunsystemet eller kreft (Pearson et al., "Transplantation Tolerance Induced by CTLA4-Ig" Transplantation, 1994, 27. juni, 57(12):1701-6; Bolling et al., "The Effect of Combinations Cyclosporine and CTLA4-Ig Therapy on Cardiac Allograft Survival", Journal of Surgical Research, 1994, 57(1):60-4).

I en foretrukket utførelse omfatter den farmasøytiske blandingen ytterligere et cytokin, immunosuppressant eller cyclosporin.

Innføring av CTLA4-mutantmolekyler *in vivo* forventes å resultere i forstyrrelse av T-celle-interaksjoner med andre celler, så som B-celler, som resultat av bindingen av liganden til B7-positive celler. Forhindringen av normal T-celle-interaksjon kan resultere i nedsatt T-celleaktivitet, for eksempel nedsatt T-celle-proliferasjon. Dessuten forventes administrering av mutant-fusjonsprotein *in vivo* å resultere i regulering av *in vivo* nivåene av cytokiner, inklusivt, men ikke begrenset til, interlevkiner, f.eks. interlevkin ("IL")-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, vekstfaktorer inklusivt tumorvekstfaktor ("TGF"), kolonistimulerende faktor ("CSF"), interferoner ("IFN") og tumornekrosefaktor ("TNF") for å fremme ønskede virkninger hos et individ. Når fusjonsproteinet for eksempel innføres *in vivo*, kan det blokkere produksjonen av cytokiner, som bidrar til malign vekst, for eksempel av tumorceller. Fusjonsproteinet kan også blokkere proliferasjon av virus som er avhengig av T-celleaktivering, som f.eks. det virus som forårsaker AIDS, HTLV1.

Som angitt ovenfor, er virkningen av administrering av CTLA4-mutantmolekyler eller dets fragmenter *in vivo*, iblant hemmende, hvilket skyldes blokkering med fusjonsproteinet av CTLA4 og CD28-utløsning som resultat av T-celle/B-cellekontakt. For eksempel kan CTLA4-mutantmolekylet blokkere T-celleproliferasjon. Innføring av CTLA4-mutantmolekylet *in vivo* vil således gi virkninger både på T- og B-cellemedierte immunresponser. Fusjonsproteinet kan også administreres i kombinasjon med innføringen av cytokiner eller andre terapeutiske reagenser.

Det kan benyttes andre reagenser, inklusivt derivater som er reaktive med CTLA4-mutantmolekylet, for å regulere T-celle-interaksjoner. For eksempel kan antistoffer og/eller antistoff-fragmenter som er reaktive med CTLA4-reseptoren, underkastes screening for å påvise de som kan inhibere bindingen av CTLA4-mutantmolekylet til B7-1-antigenet. Antistoffene eller antistoff-fragmenter som Fab- eller F(ab')₂-fragmenter, kan deretter benyttes til omsetning med T-cellene, for eksempel for å inhibere T-celleproliferasjon.

CTLA4-mutantmolekylet kan benyttes til å identifisere ytterligere forbindelser som kan regulere interaksjonen mellom CTLA4- eller CD28- og B7-antigenene. Slike forbindelser kan inkludere små naturlig forekommende molekyler som kan benyttes for omsetning med B-celler og/eller T-celler. Eksempelvis kan

fermenteringsbuljonger undersøkes med henblikk på evnen til å inhibere CTLA4/B7-interaksjoner. Dessuten kan derivater av det ovenfor beskrevne CTLA4Ig-mutant-fusjonsprotein benyttes for å regulere T-celle-proliferasjon. For eksempel kan fragmentene eller derivatene benyttes til å blokkere T-celleproliferasjon i

5 transplantat-mot-vert (GVH) sykdom som ledsager allogen benmargstransplantasjon.

CD28-mediert T-celleproliferasjonen er cyklosporinresistent i motsetning til proliferasjon som styres av CD3/Ti-cellerreseptor-komplekset (June et al., Mol. Cell. Biol. 7:4472-4481 (1987)). Cyklosporin er relativt ineffektiv ved behandling av GVH-sykdom (Storb, Blood, 68:119-125 (1986)). GVH-sykdom antas å medieres av T-lymfocytter som uttrykker CD28-antigen (Storb & Thomas, Immunol. Rev. 88:215-238 (1985)). CTLA4-mutantmolekylene kan således være anvendelige for seg, eller i kombinasjon med immun-suppressiva så som cyklosporin, for å blokkere T-celleproliferasjon ved GVH-sykdom og for å behandle andre patologiske tilstander, som f.eks. autoimmunitet, transplantatforkastelse, infeksjøs sykdommer og neoplas. De

10 mutant-CTLA4-molekylene som her er beskrevet, kan formuleres i en rekke doseringsformer som inkluderer, men ikke er begrenset til, flytende løsninger eller suspensjoner, tabletter, piller, pulvere, suppositorier, polymere mikrokapsler eller mikroversikler, liposomer og injiserbare eller infunderbare løsninger. Den foretrukne form avhenger av administrasjonsmåten og av den terapeutiske anvendelse.

20 Den mest virksomme måte for administrering og dosering av molekylene ifølge foreliggende oppfinnelse avhenger av sykdommens alvorlighetsgrad og forløp, pasientens helse og respons på behandlingen og behandlende leges vurdering. Doseringen av molekylene bør derfor tilpasses den enkelte pasient.

Sammenhengen mellom doser for dyr av forskjellig størrelse og art, innbefattet mennesket, på basis av mg/m^2 overflateareal er beskrevet av Freireich, E.J. et al., (Quantitative Comparison of Toxicity of Anticancer Agents in Mouse, Rat, Hamster, Dog, Monkey and Man. Cancer Chemother, Rep. , 50, 219-244, May, 1966).

25

Det kan foretas tilpasninger av doseringsregimer for å optimalisere vekst-inhiberingsresponsen. Doser kan avdeles og administreres på døgnbasis eller reduseres forholdsmessig ut fra situasjonen. For eksempel kan det administreres flere doser i døgnet, eller kan dosen reduseres i forhold til den bestemte terapeutiske situasjon.

30

Ifølge foreliggende oppfinnelse kan en virksom mengde for behandling av et individ, være mellom ca. 0,1 og ca. 10 mg/kg legemsvekt. Den virksomme mengde kan også være en mengde mellom ca. 1 og ca. 10 mg/kg legemsvekt.

5

CTLA4-mutantmolekyler ifølge oppfinnelsen forventes å være anvendelige *in vivo* som inhibitor av T-celleaktivitet fremfor ikke-spesifikke inhibitorer, så som cyklosporin og glukosteroider.

Det B7-1-antigen (CD80) som uttrykkes på aktiverte B-celler og celler av andre linjer, og CTLA4-reseptoren uttrykt på T-celler, kan binde seg direkte til hverandre, og denne interaksjon kan mediere celle-celleinteraksjon. B7-2-antigen (CD86) uttrykt på aktiverte B-celler og celler av andre linjer, samt CD28-reseptoren uttrykt på T-celler, kan binde seg direkte til hverandre og denne interaksjon kan mediere celle-celleinteraksjon. Selv om B7-1 har større spesifisitet for CTLA4, og B7-2 har større spesifisitet for CD28, forekommer også en viss grad av kryssreaktivitet mellom disse ligandene (Kuchroo et al., Cell, 80, 707-718 (1995)).

Interaksjoner mellom disse ligandene utløser direkte aktiveringsveiene i T-cellene og fører til cytokinproduksjon, T-celleproliferasjon og B-celledifferensiering til immunglobulinproduserende celler. Den B-celleaktivering som inntreffer kan forårsake øket ekspresjon av B7-antigen og ytterligere CD28-stimulering, hvilket fører til en kronisk inflammasjonstilstand, f.eks. ved autoimmunsykdommer, allograft-forkastelse, transplantat-mot-vert sykdom eller kroniske allergiske reaksjoner. Blokkering eller inhibering av denne reaksjon kan ha den effekt at den hindrer T-celle-cytokinproduksjon og således forhindrer eller reverserer inflammatoriske reaksjoner.

Løselig CTLA4-molekyler har tidligere vært vist å være en potent inhibitor av *in vitro* lymfocytffunksjoner som fordrer T-celle og B-celleinteraksjon (Se opphavelig søknad, USSN 08/228.208). Dette antyder viktigheten av interaksjoner mellom B7-antigener og deres motreseptorer, CTLA4 og/eller CD28.

Nylige data tyder på at B7-1- og B7-2-molekylene aktiverer egne T-celle-subsett på ulik måte. Nærmere bestemt knyttes disse antigenene til differensieringen av CD4-T-hjelpercellene som etter stimulering, differensieres til to distinkte subpopulasjoner (betegnet Th1 og Th2) som begge produserer sitt eget sett av cytokiner og medierer separate effektorfunksjoner. Det er vesentlig at disse ulike

subsett synes å spille bestemte roller i en rekke kliniske sykdomstilstander (Cohen, J. Science, 262, 175-176 (1993) og Simon et al., P.N.A.S. 91, 8562-8566 (1994)). Ved å påvirke effektorfunksjonene av disse T-celle-subsettene, kan CTLA4-mutantmolekyler forhindre eller reversere disse sykdomstyper.

Under betingelser hvor T-celle/B-celleinteraksjoner forekommer som resultat av kontakt mellom T-celler og B-celler, kan binding av innførte CTLA4-mutantmolekyler slik at de reagerer med B7-antigen-positive celler, for eksempel B-celler, gripe inn i, dvs. inhibere T-celle/B-celleinteraksjoner som resulterer i regulering av immunresponser. På grunn av den eksklusivt inhiberende effekt forventes CTLA4-mutantmolekyler å være anvendelige *in vivo* som en inhibitor av T-celleaktivitet fremfor ikke-spesifikke inhibitorer som cyklosporin og glukosteroider.

De etterfølgende eksempler er angitt for å illustrere foreliggende oppfinnelse og for å være til hjelp for fagmannen ved utnyttelsen av denne.

15 EKSEMPEL 1

Gjennom setespesifikk og homolog mutagenese har vi påvist regioner i CTLA4Ig som fordres for dens begjærlige binding til B7-1. Det etterfølgende er en beskrivelse av hvorledes løselige CTLA4/CD28-hybridfusjonsproteiner som binder B7, fremstilles.

20 MATERIALER OG METODER

Monoklonale antistoffer (mAbs). Murine CTLA4-spesifikke mAbs ble fremstillet og karakterisert som tidligere beskrevet (Linsley et al., J. Exp. Med., (1992) 176:1595-1604). Antistoff 9.3 (anti-CD28) har vært beskrevet tidligere ((Hansen et al., Immunogenetics 10:247-260 (1980)).

Cellekultur

Fremstillingen av stabilt transfekterte B7-1-positive CHO-celler har tidligere vært beskrevet (Linsley et al., i J. Exp. Med. 173:721-730 (1991); P.S. Linsley et al., J. Exp. Med. 174:561 (1991)).

Celler ble opprettholdt i DMEM supplert med 10% føtalt bovint serum (FBS), 0,2 mM prolin og 1 μ M metotrexat. COS-celler ble dyrket i DMEM supplert med 10% FBS. CTLA4Ig ble fremstillet i CHO-celler som tidligere beskrevet (Eksempel 2 i USSN 08/228.208).

CTLA4Ig og CD28Ig-sete-rettede mutant-ekspresjonsplasmider

Seterettet mutagenese ble foretatt på en vektor som kodet for en løselig
 5 kimær form av CTLA4 (CTLA4Ig) hvor det ekstracellulære domenet av CTLA4
 genetisk ble fusjonert til hengsel- og konstante regioner av en human IgG-tung kjede
 (Linsley et al., J. Exp. Med. 173:721-730 (1991)). CTLA4Ig-seterettete mutanter ble
 fremstillet ved å kode den ønskede mutasjon inn i overlappende oligonukleotid-
 primere og utvikle mutantene ved PCR (Ho et al., 1989, supra) under bruk av
 10 CTLA4Ig-plasmidkonstruksjonen som templat.

Det ble fremstillet seks mutanter som kodet for substitusjon til alanin i de høyt
 konserverte heksapeptid 98MYPPPY103 som utgjør en del av det formodede
 CDR3-lignende domene (Figur 1) (Ho et al., 1989, supra). Disse mutantene er
 beskrevet i Tabell II. Dessuten ble to mutanter som kodet henholdsvis for restene
 15 P103A og Y104A (MYPPAY (SEKV. ID. Nr.:7) og MYPPPA (SEKV. ID. Nr.:8) fra
 CD28Ig 99MYPPPY104-heksapeptidet også fremstillet etter samme metode ved å
 benytte CD28Ig som templat. Disse mutantene er også beskrevet i Tabell II.

Primere som var nødvendige for PCR-reaksjoner, men ikke for å innføre
 mutasjoner, inkluderte (1) en CDM8-foroverrettet (CDM8FP) primer som koder for en
 20 komplementær sekvens oppstrøms for HindIII-restriksjonssetet i 5'-enden av CDM8-
 stuffer-regionen, og (2) en revers primer (CDM8RP) som koder for en komplementær
 sekvens nedstrøms for XbaI-setet i 3'-enden av CDM8-stuffer-regionen.

Disse primerne kodet for følgende sekvenser:

25 CDM8FP: 5'-AATACGACTCACTATAGG (SEKV. ID. Nr.:9)
 CDM8RP: 5'-CACCACACTGTATTAACC (SEKV. ID. Nr.:10)

PCR-betingelsene var 6 min. ved 94°C, etterfulgt av 25 runder på 1 min. ved
 94°C, 2 min. ved 55°C og 3 min. ved 72°C. Taq-polymerase og de anvendte
 30 reaksjonsbetingelsene var som foreslått av leverandøren (Perkin Elmer Cetus,
 Emeryville, CA). PCR-produkter ble kuttet med HindIII og XbaI og ligert til
 HindIII/XbaI-kuttet CDM8-ekspresjonsvektor.

For å bekrefte at de ønskede mutasjoner var skutt inn og for å fastslå at
 sekundærmutasjoner ikke forekom, ble hvert CTLA4Ig-mutant-fusjonsprotein (et

eksempel på et løselig CTLA4-mutant-fusjonsprotein) sekvensert ved hjelp av dideoxy-kjede-terminerings/ekstensjonsreaksjonen med Sequenase-reagenser benyttet i henhold til produsentens anbefalinger (United States Biochemical Corp., Cleveland, OH).

- 5 Plasmider ble transfektert inn i COS-celler (Aruffo et al., Cell, 61:1303 (1990)) og det kondisjonerte medium benyttet som kilde for de resulterende Ig-mutant-fusjonsproteinene.

CTLA4/CD28Ig-hybridekspresjonsplasmider

- 10 CTLA4/CD28Ig-hybrid-scan-plasmider som kodet for konstruksjonene HS2, HS4-A, HS4-B og HS5 (Figur 3 og Tabell I) ble fremstillet ved PCR ved å benytte overlappende oligonukleotidprimere utviklet for å innføre CTLA4-sekvenser i CD28Ig, samtidig som det ekvivalente området fra CD28 ble utelatt. De samme CDM8-foroverrettede og reverse PCR-primere beskrevet ovenfor, ble også benyttet. Det
15 følgende er en liste over de CTLA4/CD28-hybrid-fusjonsproteinene som ble fremstillet.

BETEGNELSE	RAMMEVERK	MODIFIKASJONER
HS1	CTLA4	1-24 AV CD28 97-125 AV CD28
HS2	CD28	1-22 AV CTLA4 96-125 AV CTLA4
HS3	CTLA4	96-125 AV CD28
HS4	CD28	96-123 AV CTLA4
HS4A	CD28	96-113 AV CTLA4
HS4B	CD28	114-123 AV CTLA4
HS5	CD28	25-32 AV CTLA4
HS6	CTLA4	25-32 AV CD28
HS7	CD28	96-123 AV CTLA4 25-32 AV CTLA4
HS8	CD28	25-32 AV CTLA4 96-113 AV CTLA4
HS9	CD28	25-32 AV CTLA4 114-123 AV CTLA4

HS10	CD28	96-123 AV CTLA4 51-58 AV CTLA4
HS11	CD28	25-32 AV CTLA4 51-58 AV CTLA4 96-123 AV CTLA4
HS12	CD28	51-58 AV CTLA4 96-113 AV CTLA4
HS13	CD28	25-32 AV CTLA4 51-58 AV CTLA4 96-113 AV CTLA4
HS14	CD28	51-58 AV CTLA4

Hver cDNA-konstruksjon ble genetisk forbundet med cDNA som koder for hengsel og konstante regioner av et humant IgG1 for å oppnå løselig kimærer.

En HS6-hybrid ble fremstillet på lignende måte som beskrevet ovenfor, bortsett fra at den CDR1-lignende region i CTLA4Ig ble erstattet med den tilsvarende region fra CD28Ig.

HS7-, HS8- og HS-9-konstruksjoner ble fremstillet ved å erstatte et ~350 basepar HindIII/HpaI 5'-fragment av henholdsvis HS4, HS4-A og HS4-B med det tilsvarende cDNA-fragment som var kuttet på lignende måte fra HS5, hvorved den CDR1-lignende løkke av CTLA4 ble innført i de hybridene som allerede inneholdt den CTLA4 CDR3-lignende region.

HS10-HS13-konstruksjoner er domenehomologe mutanter som ble fremstillet ved å innføre den CDR2-lignende løkke av CTLA4Ig i tidligere konstruerte homologe mutanter. Dette ble gjort ved overlappende PCR-mutagenese, hvorunder primere ble utviklet for å innføre CTLA4 CDR2-lignende sekvenser i homologe templat

HS4 tjente følgelig som et templat for å fremstille HS10; HS7 tjente som templat for å fremstille HS11; HS4-A tjente som templat for å fremstille HS12; og HS8 tjente som templat for å fremstille HS13 (Figur 3 og Tabell I). De ovenfor beskrevne CDM8-primere ble også benyttet i disse konstruksjonene.

HS14-hybrid-konstruksjonen ble fremstillet ved å erstatte den CDR2-lignende løkke av CD28 med den tilsvarende løkke fra CTLA4Ig (Figur 3 og Tabell I).

Oligonukleotidprimere utviklet for å innføre disse endringene ble benyttet for overlappende PCR-mutagenese identisk med den beskrevet for andre mutanter.

PCR-reaksjoner og subkloning inn i CDM8 ble foretatt som beskrevet ovenfor. Igjen ble alle mutanter sekvensert ved hjelp av dideoxy-kjedeterminerings-
5 /ekstensjonsreaksjonen.

Plasmider som koder for hver av mutantene ble transfektert inn i COS-celler, og de resulterende løselige Ig-fusjonsproteinene ble kvantifisert i kulturmedier og visualisert gjennom western-blott som beskrevet i neste avsnitt.

Kvantifisering av de resulterende Ig-fusjonsproteiner i kulturmedier

Løselige mutant-fusjonsproteiner ble kvantifisert gjennom en enzymatisk immunoassay ved å bestemme mengden av forekommende Ig i serumfrie kulturmedier av COS-celler.

15 Mikrotiterplater (Immulon2; Dynatech Labs., Chantilly, VA) ble dekket med 0,5 µg/mL geit-anti-humant IgG (Jackson ImmunoResearch Labs., West Chester, PA) i 16-24 timer ved 4°C. Brønner ble blokkert i 1 time med prøvefortynningsmidlet (Genetic Systems, Seattle, WA) og deretter vasket med PBS inneholdende 0,05% Tween 20 (PBS-Tw).

20 COS-cellekulturmedier som inneholdt fusjonsproteiner ble tilsatt i forskjellige fortynninger og inkubert i 1 time ved 22°C. Kjente konsentrasjoner av CTLA4Ig ble også tilsatt til separate brønner på hver plate med henblikk på en standardkurve.

Etter vasking ble pepperrotperoksydase (HRP)-konjugert geit-anti-humant IgG (Tago, Burlingame, CA) fortynnet 1:12.000, tilsatt og inkubert i 1 time ved 22°C.

25 Brønnene ble deretter vasket og inkubert med 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin- (TMB) substrat (Genetic Systems) i 15 minutter før reaksjonen ble stanset ved tilsetning av 1N H₂SO₄. Den optiske densitet ble målt ved de to bølgelengdene 450 og 630 nm på en mikrotiterplate-leser (Genetic Systems).

Konsentrasjonen av mutant-Ig-fusjonsprotein ble bestemt ved sammenligning
30 med en standardkurve av kjente konsentrasjoner av CTLA4Ig.

Immunpresipitasjon og western-blott analyse

CTLA4/CD28Ig-hybrid-fusjonsproteiner i kulturmediet ble adsorbert til protein A-Sepharose ved inkubering over natten ved 4°C. Kulene ble vasket med PBS

inneholdende 0,1% Nonidet-P40 (NP40) og deretter ble SDS PAGE-prøvebuffer tilsatt og det eluerte protein avsatt på en SDS polyakrylamidgel.

Western blotting av proteinet over på nitrocellulose, ble foretatt i henhold til standardmetoder. Nitrocellulosemembranene ble deretter blokkert med PBS

5 inneholdende 0,1% NP40 og 1% fettfritt tørrmelkpulver.

Etter vasking i PBS-Tw ble membranene inkubert med alkalisk fosfatase-konjugert geit-anti-humant IgG (Boehringer, Mannheim, Indianapolis, IN) fortynnet 1:1000 og inkubert i 1 time ved 22°C. Blottene ble deretter vasket og fremkalt ved å benytte standardmetoder.

10

Enzymatisk immunoassay av B7-positive CHO-celler

Den evne som CTLA4Ig-mutant-fusjonsproteiner og CTLA4/CD28Ig-hybrid-fusjonsproteiner har til å binde B7-1 stabilt uttrykt på CHO-celler, ble bestemt ved enzym-immunoassay.

15 Mikrotiterplater med 96 rundbunnede brønner behandlet med vevskultur (Corning, Corning, NY) ble inokulert med B7-1 positive CHO-celler med 10^3 celler/brønn. To dager senere ble de konfluente cellene fiksert i 95% etanol i 15 minutter.

20 Etter vasking med PBS-Tw, ble mutant-Ig-fusjonsproteiner tilsatt i forskjellige konsentrasjoner og inkubert i 1 time ved 4°C. Etter vasking, ble HRP-konjugert geit-anti-humant IgG (Tago) fortynnet 1:10.000 og inkubert i 1 time ved 22°C.

Brønnene ble deretter vasket og tilsatt TMB-substrat som ovenfor, hvorpå de fikk reagere i 30 min. før reaksjonen ble stanset med 1N H₂SO₄. Brønninnholdets absorbans ble målt ved 450 nm.

25

Bindingsbestemmelse av CD28Ig-seterettet mutant-fusjonsprotein

Seterettede mutant-fusjonsproteiner av CD28Ig ble bestemt med henblikk på deres evne til å binde B7-1 ved en indirekte enzym-immunoassay. Brønner i ELISA-plater ble dekket med kimært fusjonsprotein som inneholdt det ekstracellulære domenet av humant B7-1 fusjonert til en mus-IgG1-Fc region ved 5 µg/mL i 16 timer ved 4°C. Brønnene ble blokkert i 1 time med prøvefortynningsmiddel (Genetic Systems) og deretter vasket med PBS-Tw. COS-cellekulturmedier inneholdende kjente konsentrasjoner av mutant-fusjonsprotein ble tilsatt i forskjellige konsentrasjoner og inkubert i 1 time ved 22°C.

30

Kjente konsentrasjoner av CD28Ig ble også tilsatt til egne brønner på hver plate. Etter vasking ble HRP-konjugert geit-anti-humant IgG (Tago), fortynnet 1:10.000, tilsatt og inkubert i 1 time ved 22°C. TMB-substrat ble tilsatt og den optiske densitet avlest som beskrevet for kvantifiseringen av Ig-fusjonsproteiner i kulturmedier.

Binding av mAb til Ig-fusjonsproteiner

Den evne som anti-CTLA4 mAb og anti-CD28 mAb 9,3 har til å binde CTLA4/CD28Ig-hybrid-fusjonsproteiner og CTLA4Ig-mutant-fusjonsproteiner ble bestemt ved enzym-immunoassay.

Brønner i mikrotiterplater (Immulon2) ble dekket med 0,5 µg/mL geit-anti-humant IgG (Jackson) i 16-24 timer ved 4°C. Platene ble blokkert i 1 time med prøvefortynningsmidlet (Genetic Systems), vasket med PBS-Tw og deretter inkubert med Ig-fusjonsproteinene i 1 time ved 22°C. Etter vasking ble brønnene inkubert med 1 µg/mL mAb i 1 time ved 22°C.

Etter ytterligere vasking ble HRP-konjugert geit-anti-mus Ig (Tago), fortynnet 1:10.000, tilsatt og inkubert i 1 time ved 22°C. TMB-substrat ble tilsatt og den optiske densitet målt som beskrevet ovenfor.

CTLA4-molekylmodell

En tilnærmet tredimensjonal modell av det CTLA4-ekstracellulære domenet ble utviklet på basis av konserveringen av konsensusrester i IGSF variabel-lignende domener.

Ved å benytte slike IGSF-konsensusrester som "ankerfester" for forskyvnings-tilpasning av sekvenser, ble CTLA4-rester tilordnet A-, B-, C-, C'-, C"-, D-, E-, F-, G-kjedene av en Ig-variabel foldning (Williams/Barclay, 1988, supra) og de forbindende løkkeregioner (Figur 6).

CTLA4-modellen ble bygget (InsightII, Discover, Molecular Modeling and Mechanics Programs, resp., Biosym Technologies, Inc., San Diego) ved å benytte den variable tunge kjede av HyHEL-5 (Sheriff et al., 1987, PNAS, 84:8075-8079) som templatstruktur. Sidekjede-erstatninger og løkkekonformasjoner ble approksimert ved å benytte konformasjonell søkning (Brucoleri et al., 1988, 335:564-568).

Flere versjoner av modellen med modifiserte forskyvningstilpasninger av enkelte rester til β -kjeder eller løkker, ble testet ved bruk av 3D-profilanalyse (Lüthy et al., 1992, Nature, 336:83-85) for å forbedre den opprinnelige forskyvnings-tilpasning av sekvensen av den CTLA4-ekstracellulære region til en IGSF-variabel foldning.

RESULTATER

Konstruksjon og bindingsaktivitet av CTLA4Ig og CD28Ig-mutant-fusjonsproteiner

En forskyvningstilpasning av sekvenser av forskjellige homologer av CD28 og CTLA4 er vist i Figur 1. I Figur 1 er sekvenser av CD28 fra menneske (H), mus (M), rotte (R) og høns (Ch) bragt på linje med human- og mus-CTLA4. Restene er nummerert fra det modne proteins N-terminal med signalpeptidene og transmembrane-domene understreket og de CDR-analoge regionene angitt. Mørkskraverte områder viser fullstendig konservering av rester, mens svakt skyggelagte områder viser konservative aminosyresubstitusjoner, for alle medlemmer av familien.

Regioner med sekvenskonservering er spredt over de ekstracellulære domener av disse proteinene, hvor den mest rigorøse konservering sees innen heksapeptid- MYPPPY-motivet (SEKV: ID. Nr.:11) lokalisert i den CDR3-lignende løkke av både CTLA4 og CD28 (Figur 1). Dette tyder på at denne region muligens kan spille en rolle ved interaksjonen med et B7-antigen, f.eks. B7-1 og B7-2.

For å teste denne muligheten, ble seterettede alanin-scanning-mutasjoner innført i denne CTLA4Ig-region ved å benytte PCR-oligonukleotidprimer-rettet mutagenese, hvilket resulterte i CTLA4Ig-mutant-fusjonsproteiner. Tilsvarende, ble to alaninmutasjoner innført i CD28Ig-MYPPPY-motivet, hvilket resulterte i CD28Ig-mutant-fusjonsproteiner.

Alle cDNA-konstruksjoner ble sekvensert for å bekrefte de ønskede mutasjoner før transfeksjon inn i COS-celler. Konsentrasjonene av mutant-Ig-fusjonsproteiner i serumfrie COS-cellekulturmedier ble bestemt ved hjelp av en Ig-kvantifiseringsmetode.

Evnen til hvert CTLA4Ig-mutant-fusjonsprotein til å binde seg til B7-1 uttrykt på stabilt transfekterte CHO-celler, ble deretter bestemt ved hjelp av en indirekte celle-bindende immunoassay. Binding av CD28Ig mutant-fusjonsproteiner til B7-1 ble

bestemt ved en indirekte enzym-immunoassay. Hver enkelt av disse bestemmelsene er beskrevet under materialer og metoder.

Mutagenesen av hver rest av CTLA4Ig MYPPPY-motivet til Ala, hadde en sterk effekt på bindingen til B7-1 som vist i Figur 2. Figur 2 viser at mutasjoner i MYPPPY-motivet av CTLA4Ig og CD28Ig avbryter binding til B7-1. Seterrettede mutant-Ig-fusjonsproteiner ble produsert i transient transfektete COS-celler, kvantifisert og undersøkt med henblikk på deres evne til å binde B7-1.

I Figur 2 ble fusjonsproteinkvantifikasjoner gjentatt minst to ganger med parallellbestemmelser. Nærmere bestemt viser Figur 2 at CTLA4Ig-mutanter binder seg til stabilt transfektete, etanol-fikserte B7-1+ CHO-celler dyrket til konfluens i ELISA-vevskulturplater. Bindingsdataene er uttrykt som gjennomsnittet for parallellbrønner og er representative for minst to eksperimenter.

Y99A- og P101A-mutanter bandt seg til B7-1, men med betraktelig redusert evne i forhold til villtype CTLA4Ig. Derimot oppviste mutantene M98A, P100A, P102A og Y103A et nesten fullstendig tap av binding. Dessuten oppviste ikke CD28Ig MYPPPY-mutantene P103A og Y104A påvisbar binding til B7-1 immobilisert på brønner i ELISA-plater (Figur 2).

B7-1 transfektete CHO-celler som ble inkubert med CTLA4Ig mutant-fusjonsprotein, merket med anti-humant FITC og bestemt ved å benytte FACSCAN, viste likeverdige resultater. Resultatene demonstrerer tydelig at MYPPPY-motivet har en avgjørende rolle for binding til B7-1 både i CTLA4Ig og i CD28Ig.

Karakterisering av CTLA4/CD28Ig-hybrid-fusjonsproteiner

Siden MYPPPY-motivet går igjen både i CTLA4Ig og i CD28Ig, kan dette ikke alene svare for den forskjell i binding til B7-1 som man ser med CTLA4Ig og CD28Ig. Mindre godt konserverte resters bidrag til den meget begjærlige binding av B7-1 ble målt ved å benytte en rekke homologe mutanter.

De tre CDR-lignende regionene i CD28 ble i ulike kombinasjoner erstattet med de tilsvarende regionene fra det CTLA4-ekstracellulære domenet (Figur 3 og Tabell I). Figur 3 er et kart over CTLA4/CD28Ig-mutant-fusjonsproteiner som viser % bindingsaktivitet til B7-1+ CHO-celler i forhold til CTLA4Ig. Konserverte cysteinrester (C) er vist i posisjonene henholdsvis 22, 93 og 121 (CTLA4-nummerering). Dessuten vises posisjonen av MYPPPY-motivet. Åpne områder representerer CD28-sekvens; fylte områder representerer CTLA4-sekvens; kryss-skraverte områder representerer

begynnelsen av IgG Fc (se også Tabell I). De prosentuelle bindingsaktiviteter ble bestemt ved å sammenligne bindingskurver (Figur 4/5) i forhold til CTLA4Ig og fastslå den mutantkonsentrasjon som trengtes for å gi den samme O.D. som den for CTLA4Ig. Forholdet mellom mutantprotein og CTLA4Ig-konsentrasjon ved en
 5 bestemt O.D. ble deretter uttrykt som % bindingsaktivitet. Minst to A450-avlesninger ble tatt fra den rettlinjede del av CTLA4Ig-bindingskurven og den gjennomsnittlige % bindingsaktivitet bestemt.

Ialt 14 hybride cDNA-konstruksjoner ble fremstillet, sekvensert og transfektert inn i COS-celler. Konsentrasjonene av Ig-fusjonsproteiner i serumfritt kulturmedium
 10 ble bestemt og deres elektroforese-mobilitet sammenlignet ved SDS PAGE som inkluderte western blotting.

Under reduserende betingelser vandret hvert kimært protein med en relativ molekylmasse som varierte mellom den for CTLA4Ig (Mr-50kDa) og CD28Ig (Mr-70kDa) avhengig av størrelsen av den utskiftede region.

Under ikke-reduserende betingelser vandret proteinene først og fremst mellom 100-140 kDa, noe som tyder på at disse fusjonsproteinene forelå som disulfid-bundne dimerer på tross av mutagenese av cysteinrestene i hengsel-regionen av Fc.

Siden fire av de fem konserverte cysteinrestene i CTLA4 og CD28 antas å
 20 være involvert i intrakjede-disulfidbindinger, kunne dimeriseringen av fusjonsproteinene derfor mest sannsynlig tilskrives den femte konserverte cysteinrest i posisjon 121 i CTLA4 (posisjon 123 i CD28).

Binding av CTLA4/CD28Ig-hybrid-fusjonsproteiner til B7-1

Hybrid-fusjonsproteinene ble undersøkt med henblikk på deres evne til å
 25 binde seg til B7-1 ved hjelp av den samme indirekte celle-bindings-immunoassay som ble benyttet for å bestemme de setespesifikke CTLA4Ig og CD28Ig mutante fusjonsproteinene.

Under disse betingelsene er bindingen mellom CD28Ig og B7-1 knapt
 30 påvisbar (Figurene 4/5). Erstatning av restene 97 til 125 (den CDR3-lignende forlengede region) i CD28 med de tilsvarende rester av CTLA4 resulterte imidlertid i ca. 2,5 størrelsesordeners økning i binding av CD28Ig-analogen til B7-1 (Figurene 4/5). Figurene 4/5 viser at CTLA4/CD28Ig mutant-fusjonsproteiner er involvert i CDR-analogue regioner i den meget begjærlige binding til B7-1 CHO-celler. Mutantene ble

bestemt som beskrevet under Figur 2. Dataene er uttrykt som gjennomsnittet for parallellbrønner og er representative for minst tre forsøk. Fra disse kurvene ble % bindingsaktivitet i forhold til CTLA4Ig bestemt som forklart og vist i tilknytning til Figur 3.

5 Bindingen av denne konstruksjon, betegnet HS4 (Figur 3) til B7-1, er tilnærmet fem ganger mindre enn for villtype CTLA4Ig. HS2-hybriden som inkluderer ytterligere N-terminale rester av CTLA4 (aminosyrene 1-22), forbedret ikke hybrid-molekylets evne til å binde seg til B7-1, sett i forhold til HS4.

10 HS6-konstruksjonen som representerer CTLA4Ig-sekvensen bortsett fra at den inneholder den CDR1-lignende region av CD28 (restene 25-32) gir lignende binding. Den ytterligere inkludering av den CTLA4 CDR1-lignende region (restene 25-32) i HS4-konstruksjonen (betegnet HS7), viste imidlertid ytterligere forbedret binding, slik at bindingsaffiniteten er ca. 44% av CTLA4Ig (Figur 3).

15 Derimot øket ikke inklusjon av den CDR2-lignende region av CTLA4 (restene 51-58) i HS4 (konstruksjon HS10) bindingen ytterligere (Figur 3). Et lignende resultat ble funnet for konstruksjon HS11 som hadde sekvensene for alle tre CDR-lignende regioner av CTLA4 inkludert i CD28Ig. HS5-hybriden som inneholdt kun det CDR1-lignende domene av CTLA4, bandt meget svakt.

20 CTLA4/CD28Ig-hybriden HS4-A kodet for CTLA4Ig-restene 96-113 i den C-terminalt forlengede CDR3-lignende region, tilsvarende 9 CTLA4 avledede rester færre enn HS4 (Figur 3 og Tabell I). HS4-A bandt B7-1 CHO-celler mindre godt enn HS4 (Figurene 3 og 5). Addisjon av den CTLA4 CDR1-lignende løkke (HS8-hybrid), øket B7-1-bindingen fra ca. 2% til nesten 60% av villtype-bindingen.

25 Derimot øket ikke addisjon av den CTLA4 CDR2-lignende løkke i HS4-A (HS12) bindingen i forhold til HS4-A, og det gjorde heller ikke addisjon av alle tre CTLA4 CDR-lignende regioner (HS13, Figur 3).

En annen hybrid betegnet HS4-B, kodet for den CD28 CDR3-lignende region som inkluderte MYPPPY-motivet, etterfulgt av CTLA4-restene 114-122 (Tabell I og Figur 3).

30 HS4-B og HS4-A oppviste likeverdig binding til B7-1. I motsetning til HS4-A forbedret imidlertid ikke inklusjonen av den CTLA4 CDR1-lignende løkke i HS4-B (HS9) bindingen (Figur 3), hvilket tyder på at de umiddelbart nabostilte rester til CTLA4Ig MYPPPY-motivet var vesentlige determinanter ved sterkt begjærlig binding.

Monoklonal antistoff-binding til CTLA4/CD28Ig-hybrid-fusjonsproteiner

Den strukturelle integritet av hvert hybrid-fusjonsprotein ble undersøkt ved å bestemme deres evne til å binde mAb spesifikt til CTLA4 eller CD28 i en enzym-immunoassay. De CTLA4-spesifikke monoklonale antistoffene 7F8, 11D4 og 10A8
 5 blokkerer ligandbinding (Linsley et al., (1992) supra).

Disse antistoffene bandt seg til hver av CTLA4Ig mutant-fusjonsproteinene unntatt 11D4 som ikke bandt seg til P100A og P102A (Tabell II). Siden 7F8 og 10A8 bandt seg til disse mutantene, kan den manglende binding av 11D4 sannsynligvis tilskrives mutagenese som forstyrrer den epitop som gjenkjennes av 11D4.

Derimot unnlot hvert av antistoffene å binde seg til noen av de homologe scan-hybrid-fusjonsproteinene bortsett fra at 7F8 bandt seg til HS6 og at 11D4 bandt seg svakt til HS8. Siden mange av disse homologe hybrid-fusjonsproteinene til en viss grad var i stand til å binde seg til B7-1, er det sannsynlig at manglende binding av disse antistoffene skyldtes opprivning av konformasjonsepitoper dannet
 10 ved romlig nabostilte, men ikke-lineære sekvenser.

Det CD28 spesifikke mAb9.3 (Linsley et al., 1992, supra) bandt seg ikke til noen av de CD28-seterettete mutant-fusjonsproteiner, men bandt seg til hybrid-fusjonsproteinene HS4, HS4-A, HS7 og HS8. Med HS2 ble det observert svakere binding. Ingen binding ble registrert med HS5- og HS6-konstruksjonene.

CTLA4-modell

Figur 6 viser en skjematisk fremstilling av CTLA4-modellen. Forskyvnings-tilpasningen av CTLA4-rester til CDR-lignende regioner er vist i Figur 1. CTLA4-modellen antyder nærvær av en ytterligere (ikke-Ig) disulfidbinding mellom restene
 25 Cys49 og Cys67, som understøtter likheten mellom CTLA4 og den Ig-variable folding.

De to mulige N-bundne glykosyleringssetene i CTLA4-kartet tilhører løsnings-middeleksponte posisjoner i Ig β -kjede rammeverkregionene. 3D-profilanalyse tydet på at CTLA4-sekvensen er fullstendig forenelig med en Ig V-folding, om enn
 30 noe fjernere relatert.

Resten Val115 representerer den siste resten i det CTLA4Ig-lignende domenet. Konformasjonen av regionene mellom Val115 og den membran-proksimale Cys121, som antas å danne CTLA4-homodimeren, er meget variabel i

CD28-familien. Bildet som fremstår er at medlemmer av CD28-familien gjør bruk av rester i to av tre CDR-lignende regioner for binding til B7-1.

MYPPPY-motivet representerer en konserverert bindingsplattform som synes å være forsterket gjennom dens C-terminale forlengelse og som er spesifikt modulert av den sterkt variable CDR1-lignende region. CDR3- og CDR1-lignende regioner henger romlig sammen i Ig-variable foldinger. Den CDR2-lignende region er romlig mer fjern og bidrar ikke vesentlig, når det gjelder CD28-familien, til bindingen til B7-1.

Eksempel 2

Gjennom setespesifikk mutagenese har vi påvist en aminosyrestilling i CTLA4Ig som spiller en avgjørende rolle i dette molekyls evne til å binde både CD80 og CD86. I tillegg har vi identifisert 2 aminosubstitusjoner i denne posisjon som danner mutant-CTLA4Ig-molekyler som har evne til å binde CD80 på lignende måte som villtype-molekylet, men som har mistet evnen til å binde CD86. Det etterfølgende er en beskrivelse av hvorledes løselige CTLA4-fusjonsproteiner som binder CD80, men ikke CD86, fremstilles.

Materialer og metoder

Monoklonale antistoffer (mAb). Murine monoklonale CD80- og CD86-spesifikke antistoffer er beskrevet tidligere (Kuchroo et al., Cell, Bd. 80, 707-718, (1995)).

Cellekultur

Fremstillingen av stabilt transfekterte B7-1- (CD80) positive CHO-celler har tidligere vært beskrevet (Linsley et al., i J. Exp. Med. 173:721-730 (1991); P.S. Linsley et al., J. Exp. Med. 174:561 (1991)). Fremstillingen av stabilt transfekterte B7-2-(CD86)celler er beskrevet tidligere (Freeman et al., J. Exp. Med. 178:2185 (1993); PCT WO95/06738). Fremstillingen av LCL-celler er beskrevet tidligere (Wyss-Coray et al., European Journal of Immunology, 23(12), 3350-3357 (1993)).

Celler ble opprettholdt i DMEM supplert med 10% føtalt bovint serum (FBS), 0,2 mM prolin og 1 µM metotrexat. COS-celler ble dyrket i DMEM supplert med 10% FBS. CTLA4Ig ble fremstillet i CHO-celler som tidligere beskrevet (se opphavelig søknad, USSN 08/228.208, Eksempel 2).

CTLA4Ig seterettete mutant-ekspresjonsplasmider

Seterettet mutagenese ble foretatt på en vektor som kodet for en løselig kimær form av CTLA4 (CTLA4Ig), hvor det ekstracellulære domenet av CTLA4 genetisk ble fusjonert til hengsel- og konstante regioner av en human IgG-tung kjede (Linsley et al., J. Exp. Med. 173:721-730 (1991)). CTLA4Ig-seterettete mutanter ble fremstillet ved å kode den ønskede mutasjon inn i overlappende oligonukleotid-primere og utvikle mutantene ved PCR (Ho et al., 1989, supra) under bruk av π LN-CTLA4Ig-plasmidkonstruksjonen som templat (se opphavelig søknad, USSN 08/228.208, Eksempel 1).

Det ble fremstillet 18 mutanter som kodet for aminosyresubstitusjoner i den første tyrosinposisjon i det høyt konserverte MYPPPY-motivet av CTLA4 (Figur 1) (Ho et al., 1989, supra). Denne rekken av mutanter ble fremstillet ved å manipulere kodonet i denne posisjon for å frembringe nye kodoner som koder for hver enkelt av de 20 aminosyrene utenom cystein.

Primere som var nødvendige for PCR-reaksjoner, men ikke for å innføre mutasjoner, inkluderte (1) en π LN-foroverrettet primer (π LNlgFP) som koder for en komplementær sekvens oppstrøms for SacI-restriksjonssetet i 5'-enden av CTLA4Ig π LN-sekvensen, og (2) en revers primer (π LNlgRP) som koder for en komplementær sekvens nedstrøms for XbaI-setet i 3'-enden av den immunglobulin-kodende region.

Disse primerne kodet for følgende sekvenser:

π LNlgFP: 5'-TGCAAGGTGGAGCTCATGTTCCCACCGCCATAC

(SEKV. ID. Nr.:12)

π LNlgRP: 5'-GCGCTCGACTCTAGAAGCATCCTCGTG

(SEKV. ID. Nr.:13)

PCR-betingelsene var 6 min. ved 94°C, etterfulgt av 30 runder på 1 min. ved 94°C, 2 min. ved 55°C og 3 min. ved 72°C. Taq-polymerase og de anvendte reaksjonsbetingelsene var som foreslått av leverandøren (Perkin Elmer Cetus, Emeryville, CA). PCR-produkter ble kuttet med SacI og XbaI og ligert til SacI/XbaI-kuttet π LN-CTLA4Ig-ekspresjonsvektor.

For å bekrefte at de ønskede mutasjoner var skutt inn og for å fastslå at sekundærmutasjoner ikke forekom, ble hvert CTLA4Ig-mutant-fusjonsprotein (et eksempel på et løselig CTLA4-mutant-fusjonsprotein) sekvensert ved hjelp av

dideoxy-kjede-terminerings/ekstensjonsreaksjonen med Sequenase-reagenser benyttet i henhold til produsentens anbefalinger (United States Biochemical Corp., Cleveland, OH).

Plasmider som kodet for hver enkelt mutant, ble transfektert inn i COS-celler
5 (Aruffo et al., Cell, 61:1303 (1990)) og det kondisjonerte medium benyttet som kilde for de resulterende Ig-mutant-fusjonsproteinene.

Kvantifisering av de resulterende Ig-fusjonsproteiner i kulturmedier

Løselige mutant-fusjonsproteiner ble kvantifisert gjennom FACS-analyse som
10 tidligere beskrevet (se opphavelig søknad, USSN 08/228.208, Eksempel 1).

Binding av CTLA4Ig-fusjonsproteiner i nærvær av anti-CD80 eller anti-CD86 mAb

Bindingsstudier som involverte CTLA4Ig-proteiner og konkurrerende molekyler
15 gjorde bruk av tidligere beskrevne prosedyrer (se opphavelig søknad, USSN 08/228.208, Eksempel 4).

Rensing av Ig-fusjonsproteiner

Ig-fusjonsproteiner ble rensset som tidligere beskrevet (se opphavelig søknad,
20 USSN 08/228.208, Eksempel 1).

RESULTATER

Bindingsaktivitet av CTLA4Ig-mutant-fusjonsproteiner

Seterettede mutante Ig-fusjonsproteiner ble fremstillet i transient transfekterte
25 COS-celler, kvantifisert og undersøkt med henblikk på deres evne til å binde CD80 eller CD86.

Hvert CTLA4Ig-mutant-fusjonsproteins evne til å binde CD80 eller CD86 uttrykt på stabilt transfekterte CHO-celler, ble bestemt ved å inkubere disse cellene med de ulike CTLA4Ig-mutant-fusjonsproteiner, merke mutantproteinene med anti-
30 human FITC og bestemme dem ved hjelp av FACSCAN som beskrevet ovenfor.

Titreringsfarging av CHO-celler som uttrykker enten CD80 eller CD86, viser at mutagenese av den første tyrosinrest i CTLA4Ig MYPPPY-motivet har en sterk virkning på bindingen både til CD80 og til CD86. Figur 7 viser at hver aminosyre-substitusjon i denne posisjon fører til en unik bindingsprofil. Dessuten viser denne

figur at substitusjoner med fenylalanin og tryptofan i denne posisjon, fører til mutanter som er i stand til å binde CD80 på analog måte som villtypemolekylet, men som ikke kan binde seg til CD86.

Figur 8 illustrerer ytterligere de unike egenskapene til de to mutant-
5 molekylerne, hvor det første tyrosin i MYPPPY-motivet er erstattet med fenylalanin eller med tryptofan. FACS-analyse over et område av forskjellige konsentrasjoner viser at disse to mutantene binder CD80 på analog måte som villtypemolekylet, men er fullstendig ute av stand til å binde seg til CD86.

Disse observasjonene stemmer overens med undersøkelse hvor det inngår
10 cellelinjer som naturlig uttrykker CD80- og CD86-antigenene. Figur 9 viser at fenylalaninmutanten binder seg til endogent CD80 som uttrykkes på overflaten av cellelinjen LCL 816. Denne mutantens spesifisitet for CD80-molekylet er demonstrert i kompetitive undersøkelser hvor dens binding inhiberes av monoklonale antistoffer som er spesifikke for CD80. Dessuten har antistoffer som er spesifikke for CD86,
15 ingen effekt på dette molekyls evne til å binde seg til denne cellelinjen.

Disse dataene viser klart at det første tyrosin i MYPPPY-motivet i CTLA4Ig spiller en avgjørende rolle i molekylets evne til å binde både CD80 og CD86. I tillegg viser disse resultatene at substitusjoner som endrer resten i denne posisjon til fenylalanin eller til tryptofan, fører til mutanter som bibeholder evnen til å binde
20 CD80, men mister evnen til å binde CD86.

Tabell I. Nabostilte sekvenser av CTLA4/CD28lg homologer.

Mutant				
HS1	-22CKYasp27-	-93ckvEVM99-	-123CPSDQE-	
HS2	-20fvcKYS25-	-94CKlelm98-	-121cpdDQE-	
HS3		-93ckvEVM99-	-123CPSDQE-	
HS4		-94CKlelm98-	-121cpdDQE-	
HS5	-22CKYasp27- -30ateFRA35-		-123CPSDQE-	
HS6	-22ceySYN27- -30SREvv35-		-121cpdDQE-	
HS4-A		-94CKlelm98- -111tqiHVK118-	-123CPSDQE-	
HS4-B		-113Tllywi116-	-121cpdDQE-	
HS7	-22CKYasp27- -30ateFRA35-	-94CKlelm98-	-121cpdDQE-	
HS8	-22CKYasp27- -30ateFRA35-	-94CKlelm98- -111tqiHVK118-	-123CPSDQE-	
HS9	-22CKYasp27- -30ateFRA35-	-113Tllywi116-	-121cpdDQE-	
HS10		-47VCVaty53- -56gneLQV60- -94CKlelm98-	-121cpdDQE-	
HS11	-22CKYasp27- -30ateFRA35-	-47VCVaty53- -56gneLQV60- -94CKlelm98-	-121cpdDQE-	
HS12		-47VCVaty53- -56gneLQV60- -94CKlelm98- -111tqiHVK118-	-123CPSDQE-	
HS13	-22CKYasp27- -30ateFRA35-	-47VCVaty53- -56gneLQV60- -94CKlelm98- -111tqiHVK118-	-123CPSDQE-	
HS14		-47VCVaty53- -56gneLQV60-	-123CPSDQE-	

Nabostilte sekvenser av CTLA4/CD28-Ig-hybridfusionsproteiner. Aminosyrer er angitt med deres enkelt-bokstavskode, hvor de med kapiteler utgjør CD28-rester, mens de med små bokstaver er CTLA4-rester, og de med fete kapiteler er humane IgG1-rester. Nummerringen i tabellen er foretatt fra det N-terminale metionin i de respektive proteiner og refererer seg til de nabostilte aminosyrene.

TABELL II

Binding av CTLA4 og CD28 monoklonale antistoffer til CTLA4Ig og CD28Ig mutant-fusjonsproteiner og til CTLA4/CD28Ig-hybrid-fusjonsproteiner

	<u>anti-CTLA4 mAb</u>			<u>anti-CD28 mAb</u>
	7F8	11D4	10A8	9.3
CTLA4Ig-MUTANT-FUSJONSPROTEIN				
AYPPPY	+++	+++	+++	-
MAPPPY	++	+	++	-
MYAPPY	+	-	+	-
MYPAPY	+++	+++	+++	-
MYPPAY	+++	-	+	-
MYPPPA	+++	++	+++	-
AAPPPY	+	++	+++	-
CD28Ig MUTANT-FUSJONSPROTEIN				
MYPPAY	-	-	-	-
MYPPPA	-	-	-	+
CTLA4/CD28Ig HYBRID-FUSJONSPROTEINER				
HS1	-	-	-	-
HS2	-	-	-	+
HS3	-	-	-	-
HS4	-	-	-	+++
HS5	-	-	-	-
HS6	+	-	-	-
HS4-A	-	-	-	++
HS4-B	-	-	-	++
HS7	-	-	-	+++
HS8	-	+	-	+++
HS9	-	+	-	-
HS10	-	-	-	-
HS11	-	-	-	+
HS12	-	-	-	-
HS13	-	-	-	-
HS14	-	-	-	-
CTLA4Ig	+++	+++	+++	-
CD28Ig	-	-	-	+++

Antistoff-binding ble vurdert ut fra hva som sees for villtype-protein (+++) til høyere enn bakgrunn (+), og ingen påvisbar binding (-).

SEKVENSLISTER

(2) INFORMASJON OM SEKVENSLISTENUMMER: 1:

(i) SEKVENSENS EGENSKAPER:

(A) LENGDE: 234 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (C) BESKAFFENHET:
 (D) TOPOLOGI: lineær
 (ii) MOLEKYLTYP: protein

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKVENSLISTENUMMER: 1:

```

Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala
1          5          10          15

Ala Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
          20          25          30

Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
          35          40          45

Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly
          50          55          60

Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln
65          70          75          80

Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Thr Gly Asn Glu Leu Thr
          85          90          95

Phe Leu Asp Asp Ser Xaa Xaa Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn
          100          105          110

Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu
          115          120          125

Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Xaa
          130          135          140

Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys
145          150          155          160

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala
          165          170          175

Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Xaa Ala
          180          185          190

Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly
          195          200          205

Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu Pro Glu Cys Glu Xaa Xaa Lys
          210          215          220

Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn
225          230

```

(2) INFORMASJON OM SEKVENSI-IDENTIFIKASJONSNUMMER: 2:

(i) SEKVENSENS EGENSKAPER:

(A) LENGDE: 234 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (C) BESKAFFENHET:
 (D) TOPOLOGI: lineær
 (ii) MOLEKYLTTYPE: protein

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKVENSI ID-NR.: 2:

```

Met Ala Cys Leu Gly Leu Arg Arg Tyr Lys Ala Gln Leu Gln Leu Pro
1      5      10      15
Ser Arg Thr Trp Pro Phe Val Ala Leu Leu Thr Leu Leu Phe Ile Pro
      20      25      30
Val Phe Ser Glu Ala Ile Gln Val Thr Gln Pro Ser Val Tyr Leu Ala
      35      40      45
Ser Ser His Gly Tyr Ala Ser Phe Pro Cys Glu Tyr Ser Pro Ser His
      50      55      60
Asn Thr Asp Glu Tyr Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Thr Asn Asp Gln
      65      70      75      80
Met Thr Glu Val Cys Ala Thr Thr Phe Thr Glu Lys Asn Thr Val Gly
      85      90      95
Phe Leu Asp Tyr Pro Xaa Xaa Phe Cys Ser Gly Thr Phe Asn Glu Ser
      100      105      110
Arg Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Val Asp Thr Gly Leu
      115      120      125
Tyr Leu Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Phe Val Xaa
      130      135      140
Gly Met Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Tyr Ile Asp Pro Glu Pro Cys
      145      150      155      160
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Tyr
      165      170      175
Ala Val Ser Leu Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Val Ser Xaa Ala
      180      185      190
Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly
      195      200      205
Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu Pro Glu Cys Glu Xaa Xaa Lys
      210      215      220
Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn
      225      230

```

(2) INFORMASJON OM SEKVENSI-IDENTIFIKASJONSNUMMER: 3:

(i) SEKVENSENS EGENSKAPER:

(A) LENGDE: 225 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(C) BESKAFFENHET:

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: protein

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKVENSI ID-NR.: 3:

```

Met Thr Leu Arg Leu Leu Phe Leu Ala Leu Asn Phe Phe Xaa Ser Val
 1          5          10          15
Gln Val Thr Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Leu Leu Tyr
 20          25          30
Val Asp Ser Asn Glu Val Xaa Ser Leu Ser Cys Arg Tyr Ser Tyr Asn
 35          40          45
Leu Leu Ala Lys Glu Phe Arg Ala Ser Leu Tyr Lys Gly Val Asn Ser
 50          55          60
Asp Val Xaa Glu Val Cys Val Gly Asn Gly Asn Phe Thr Tyr Gln Pro
 65          70          75          80
Gln Phe Arg Ser Asn Ala Glu Phe Asn Cys Asp Gly Asp Phe Asp Asn
 85          90          95
Glu Thr Val Thr Phe Arg Leu Trp Asn Leu His Val Asn His Thr Asp
100          105          110
Ile Tyr Phe Cys Lys Ile Glu Phe Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp
115          120          125
Asn Glu Arg Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Ile Lys Glu Lys His Leu
130          135          140
Cys His Thr Xaa Xaa Xaa Gln Ser Ser Pro Lys Leu Phe Trp Ala Leu
145          150          155          160
Tyr Val Val Ala Gly Val Leu Phe Cys Tyr Gly Leu Leu Val Thr Val
165          170          175
Ala Leu Cys Val Ile Trp Thr Asn Ser Arg Arg Asn Arg Leu Leu Gln
180          185          190
Val Thr Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Leu Thr Arg Xaa
195          200          205
Lys Pro Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Ala Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg
210          215          220
Pro
225

```

(2) INFORMASJON OM SEKVENSI-IDENTIFIKASJONSNUMMER: 4:

(i) SEKVENSENS EGENSKAPER:

(A) LENGDE: 225 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(C) BESKAFFENHET:

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYP: protein

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKVENSI ID-NR.: 4:

```

Met Thr Leu Arg Leu Leu Phe Leu Ala Leu Ser Phe Phe Xaa Ser Val
1      5      10      15
Gln Val Thr Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Leu Leu Val
20      25      30
Tyr Asp Asn Asn Glu Val Xaa Ser Leu Ser Cys Arg Tyr Ser Tyr Asn
35      40      45
Leu Leu Ala Lys Glu Phe Arg Ala Ser Leu Tyr Lys Gly Val Asn Ser
50      55      60
Asp Val Xaa Glu Val Cys Val Gly Asn Gly Asn Phe Thr Tyr Gln Pro
65      70      75      80
Gln Phe Arg Pro Asn Val Gly Phe Asn Cys Asp Gly Asn Phe Asp Asn
85      90      95
Glu Thr Val Thr Phe Arg Leu Trp Asn Leu Asp Val Asn His Thr Asp
100     105     110
Ile Tyr Phe Cys Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp
115     120     125
Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Ile Lys Glu Lys His Leu
130     135     140
Cys His Ala Xaa Xaa Xaa Gln Thr Ser Pro Lys Leu Phe Trp Pro Leu
145     150     155     160
Val Val Val Ala Gly Val Leu Leu Cys Tyr Gly Leu Leu Tyr Thr Val
165     170     175
Thr Leu Cys Ile Ile Trp Thr Asn Ser Arg Arg Asn Arg Leu Leu Gln
180     185     190
Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Leu Gly Pro Thr Arg Xaa
195     200     205
Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Ala Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg
210     215     220
Pro
225

```

(2) INFORMASJON OM SEKVENSI-IDENTIFIKASJONSNUMMER: 5:

(i) SEKVENSENS EGENSKAPER:

(A) LENGDE: 223 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(C) BESKAFFENHET:

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: protein

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKVENSI ID-NR.: 5:

```

Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val
1      5      10      15
Thr Gly Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr
20      25      30
Asp Asn Ala Tyr Xaa Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe
35      40      45
Ser Arg Glu Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val
50      55      60
Xaa Glu Val Cys Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val
65      70      75      80
Tyr Ser Lys Thr Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser
85      90      95
Val Thr Phe Tyr Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr
100     105     110
Phe Cys Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu
115     120     125
Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro
130     135     140
Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val
145     150     155     160
Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Tyr Thr Val Ala Phe
165     170     175
Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp
180     185     190
Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Xaa Lys His
195     200     205
Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
210     215     220

```

(2) INFORMASJON OM SEKVENSI-IDENTIFIKASJONSNUMMER: 6:

(i) SEKVENSENS EGENSKAPER:

(A) LENGDE: 226 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (C) BESKAFFENHET:
 (D) TOPOLOGI: lineær
 (ii) MOLEKYLTYP: protein

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKVENSI ID-NR.: 6:

```

Met Leu Gly Ile Leu Val Val Leu Cys Leu Ile Pro Ala Ala Asp Val
1           5           10           15
Thr Glu Asn Lys Ile Leu Val Ala Gln Arg Pro Leu Leu Ile Val Ala
20          25          30
Asn Arg Thr Ala Xaa Thr Leu Val Cys Asn Tyr Thr Tyr Asn Gly Thr
35          40          45
Gly Lys Glu Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Thr Asp Ser Ala Val
50          55          60
Xaa Glu Val Cys Phe Ile Ser Trp Asn Met Thr Xaa Lys Ile Asn Ser
65          70          75          80
Asn Ser Asn Lys Glu Phe Asn Cys Arg Gly Ile His Asp Lys Asp Lys
85          90          95
Val Ile Phe Asn Leu Trp Asn Met Ser Ala Ser Gln Thr Asp Ile Tyr
100         105         110
Phe Cys Lys Ile Glu Ala Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Val Tyr Asn Glu
115         120         125
Lys Ser Asn Gly Thr Val Ile His Tyr Arg Glu Thr Pro Ile Xaa Xaa
130         135         140
Gln Thr Gln Glu Pro Glu Ser Ala Thr Ser Tyr Trp Val Met Tyr Ala
145         150         155         160
Val Thr Gly Leu Leu Gly Phe Tyr Ser Met Leu Ile Thr Ala Val Phe
165         170         175
Ile Ile Tyr Arg Gln Lys Ser Lys Arg Asn Arg Tyr Arg Gln Ser Asp
180         185         190
Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg His Pro Pro His Gln Lys Asn Lys Gly
195         200         205
Tyr Pro Ser Tyr Ala Pro Thr Arg Asp Tyr Thr Ala Tyr Arg Ser Trp
210         215         220
Gln Pro
225

```

(2) INFORMASJON OM SEKVENS-IDENTIFIKASJONSNUMMER: 7:

(i) SEKVENSENS EGENSKAPER:

- (A) LENGDE: 6 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyrer
 (C) BESKAFFENHET: enkeltstreng
 (D) TOPOLOGI: lineær
 (ii) MOLEKYLTYP: protein

(xi) SEKVENSBEKRIVELSE: SEKVENS ID-NR.: 7:

Met Tyr Pro Pro Ala Tyr
 1 5

(2) INFORMASJON OM SEKVENS-IDENTIFIKASJONSNUMMER: 8:

(i) SEKVENSENS EGENSKAPER:

- (A) LENGDE: 6 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyrer
 (C) BESKAFFENHET: enkeltstreng
 (D) TOPOLOGI: lineær
 (ii) MOLEKYLTYP: protein

(xi) SEKVENSBEKRIVELSE: SEKVENS ID-NR.: 8:

Met Tyr Pro Pro Pro Ala
 1 5

(2) INFORMASJON OM SEKVENS-IDENTIFIKASJONSNUMMER: 9:

(i) SEKVENSENS EGENSKAPER:

- (A) LENGDE: 18 basepar
 (B) TYPE: nukleinsyre
 (C) BESKAFFENHET: enkeltstreng
 (D) TOPOLOGI: lineær
 (ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(xi) SEKVENSBEKRIVELSE: SEKVENS ID-NR.: 9:

AATACGACTC ACTATAGG

(2) INFORMASJON OM SEKVENS-IDENTIFIKASJONSNUMMER: 10:

(i) SEKVENSENS EGENSKAPER:

- (A) LENGDE: 18 basepar
 (B) TYPE: nukleinsyre
 (C) BESKAFFENHET: enkeltstreng
 (D) TOPOLOGI: lineær
 (ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(xi) SEKVENSBEKRIVELSE: SEKVENS ID-NR.: 10:

CACCACACTG TATTAACC

18

(2) INFORMASJON OM SEKVENS-IDENTIFIKASJONSNUMMER: 11:

(i) SEKVENSENS EGENSKAPER:

- (A) LENGDE: 6 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyrer
 (C) BESKAFFENHET: enkeltstreng
 (D) TOPOLOGI: lineær
 (ii) MOLEKYLTYP: protein

(xi) SEKVENSBEKRIVELSE: SEKVENS ID-NR.: 11:

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr

1

5

(2) INFORMASJON OM SEKVENS-IDENTIFIKASJONSNUMMER: 12:

(i) SEKVENSENS EGENSKAPER:

- (A) LENGDE: 33 basepar
 (B) TYPE: nukleinsyre
 (C) BESKAFFENHET: enkeltstreng
 (D) TOPOLOGI: lineær
 (ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(xi) SEKVENSBEKRIVELSE: SEKVENS ID-NR.: 12:

TGCAAGGTGG AGCTCATGTT CCCACCGCCA TAC

33

(2) INFORMASJON OM SEKVENSI-IDENTIFIKASJONSNUMMER: 13:**(i) SEKVENSENS EGENSKAPER:**

(A) LENGDE: 27 basepar
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) BESKAFFENHET: enkeltstreng
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: cDNA

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKVENSI ID-NR.: 13:**GCGCTCGACT CTAGAAGCAT CCTCGTG****27**

PATENTKRAV

1. CTLA4-mutantmolekyl som er reaktivt med et CD80-antigen, karakterisert ved at det første tyrosin i aminosyremotivet MYPPPY i et ekstracellulært CTLA4-domene er erstattet med fenylalanin, eller tryptofan.
2. CTLA4-mutantmolekyl ifølge krav 1, karakterisert ved at det er løselig.
3. CTLA4-mutantmolekyl ifølge krav 1, karakterisert ved at det binder CD80-antigenet, men ikke CD86-antigenet.
4. CTLA4-mutantmolekyl ifølge krav 1, karakterisert ved at det er sammenkoblet med et non-CTLA4-molekyl.
5. CTLA4-mutantmolekyl ifølge krav 4, karakterisert ved at non-CTLA4-molekylet omfatter et immunglobulinmolekyl.
6. CTLA4-mutantmolekyl ifølge krav 1, karakterisert ved at det omfatter en første aminosyresekvens tilsvarende det ekstracellulære domenet av et CTLA4-mutantmolekyl, og en andre aminosyresekvens som tilsvarer hengsel-, CH2- og CH3-regioner i immunglobulin Cy1.
7. CTLA-mutantmolekyl ifølge krav 4, karakterisert ved at non-CTLA4-molekylet er et polypeptidmerke, ovalbumin, melanoma-assosiert antigen p97, papillomavirus E7, HIV-antigen env gp120 eller HIV-antigen HTLV3.
8. Protein ifølge krav 1, karakterisert ved at det er renset.
9. Nukleinsyremolekyl, karakterisert ved at det koder for CTLA4-mutantmolekylet ifølge krav 1.
10. Nukleinsyremolekyl ifølge krav 9, karakterisert ved at det er et DNA-molekyl.

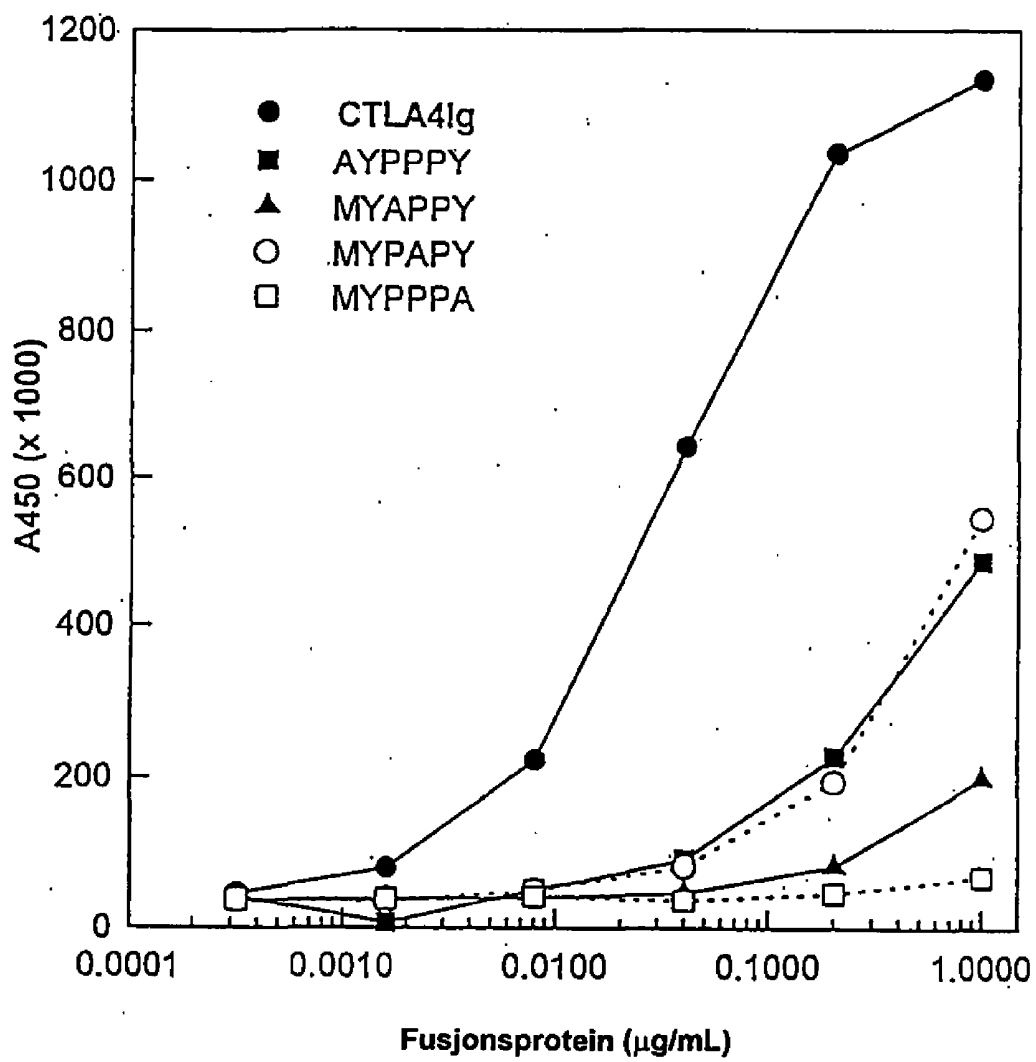
11. Nukleinsyremolekyl ifølge krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d at det er et cDNA-molekyl.
12. Plasmid, k a r a k t e r t i s e r t v e d at det omfatter nukleinsyremolekylet ifølge krav 9.
13. Vertsvektor-system, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter plasmidet ifølge krav 12, transfektert inn i en kompatibel eukaryot vertscelle.
14. Vertsvektor-system ifølge krav 13, k a r a k t e r i s e r t v e d at de kompatible eukaryote vertsceller er CHO-celler (Chinese Hamster Ovary).
15. Fremgangsmåte for fremstilling av et CTLA4-mutantmolekyl som omfatter dyrkning av vertsvektorsystemet ifølge krav 13, slik at CTLA4-mutantmolekylet dannes og gjenvinning av det således dannede CTLA4-mutantmolekyl.
16. Farmasøytisk blanding, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter CTLA4-mutantmolekylet ifølge et hvilket som helst av kravene 1-7, og en farmasøytisk akseptabel bærer.
17. Anvendelse av CTLA4-mutantmolekylet ifølge et hvilket som helst av kravene 1-7, for fremstilling av en farmasøytisk blanding for terapeutisk anvendelse.
18. Anvendelse av CTLA4-mutantmolekylet ifølge et hvilket som helst av kravene 1-7, for fremstilling av en farmasøytisk blanding for behandling av immunsystem-sykdom mediert av T-celleinteraksjon med en CD80-positiv celle, blokkering av T-celleinteraksjon, inhibering av T-celleproliferasjon, regulering av immunresponser eller regulering av *in vivo*-cytokinnivåer.
19. Anvendelse av CTLA4-mutantmolekylet ifølge et hvilket som helst av kravene 1-7, for fremstilling av en farmasøytisk blanding for inhibering av transplantatavvisning eller inhibering av transplantat-mot-vert-sykdom.

20. Anvendelse ifølge krav 17 eller 18, hvor cytokinet er interleukin eller vekstfaktor.
21. Anvendelse ifølge krav 20, hvor vekstfaktoren er en tumorvekstfaktor (TGF), en kolonistimulerende faktor (CSF), et interferon (IFN) eller en tumornekrosefaktor (TNF).
22. Farmasøytisk blanding ifølge krav 16, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den ytterligere omfatter et cytokin, immunosuppressant eller cyclosporin.

FIGUR 1

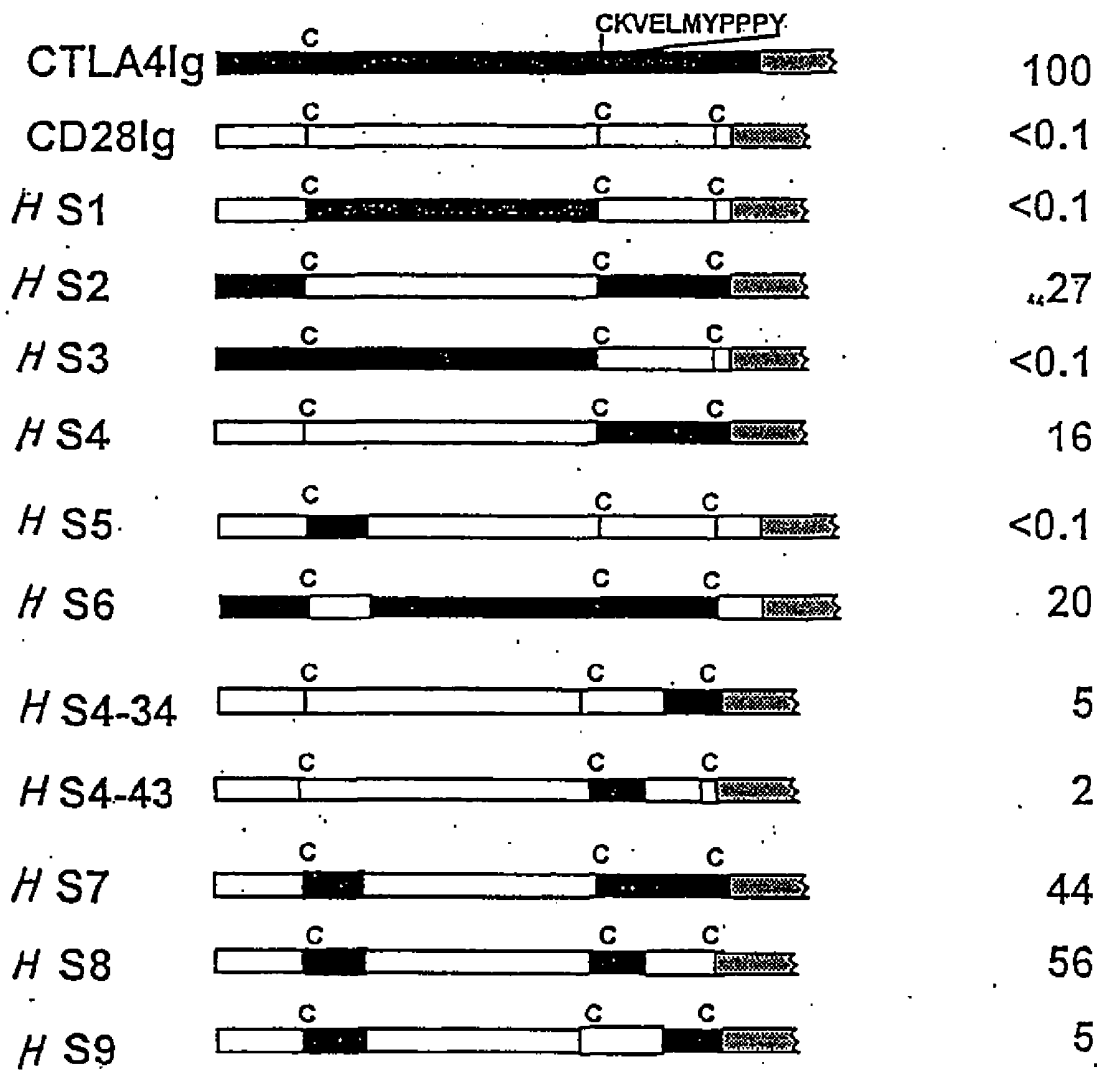
[illegible]

FIGUR 2

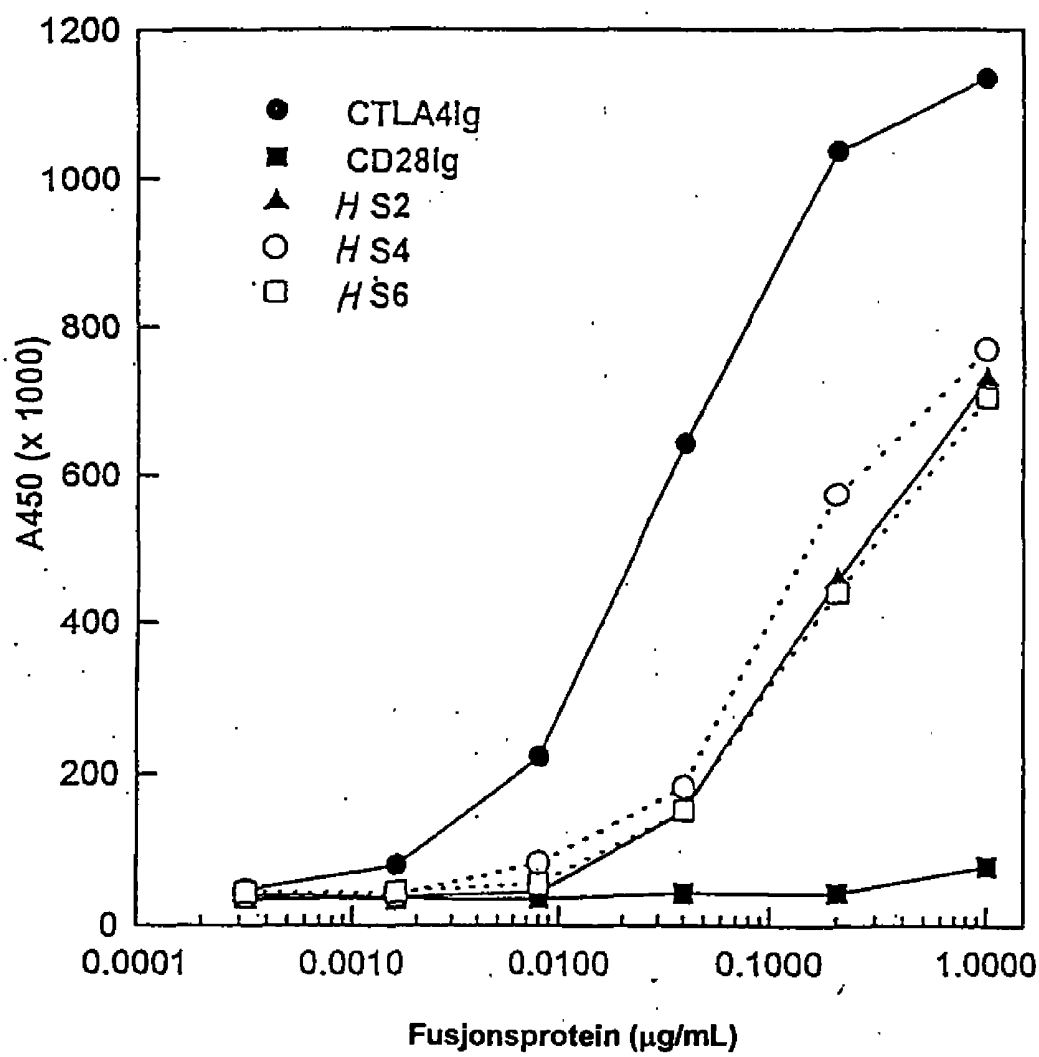


FIGUR 3

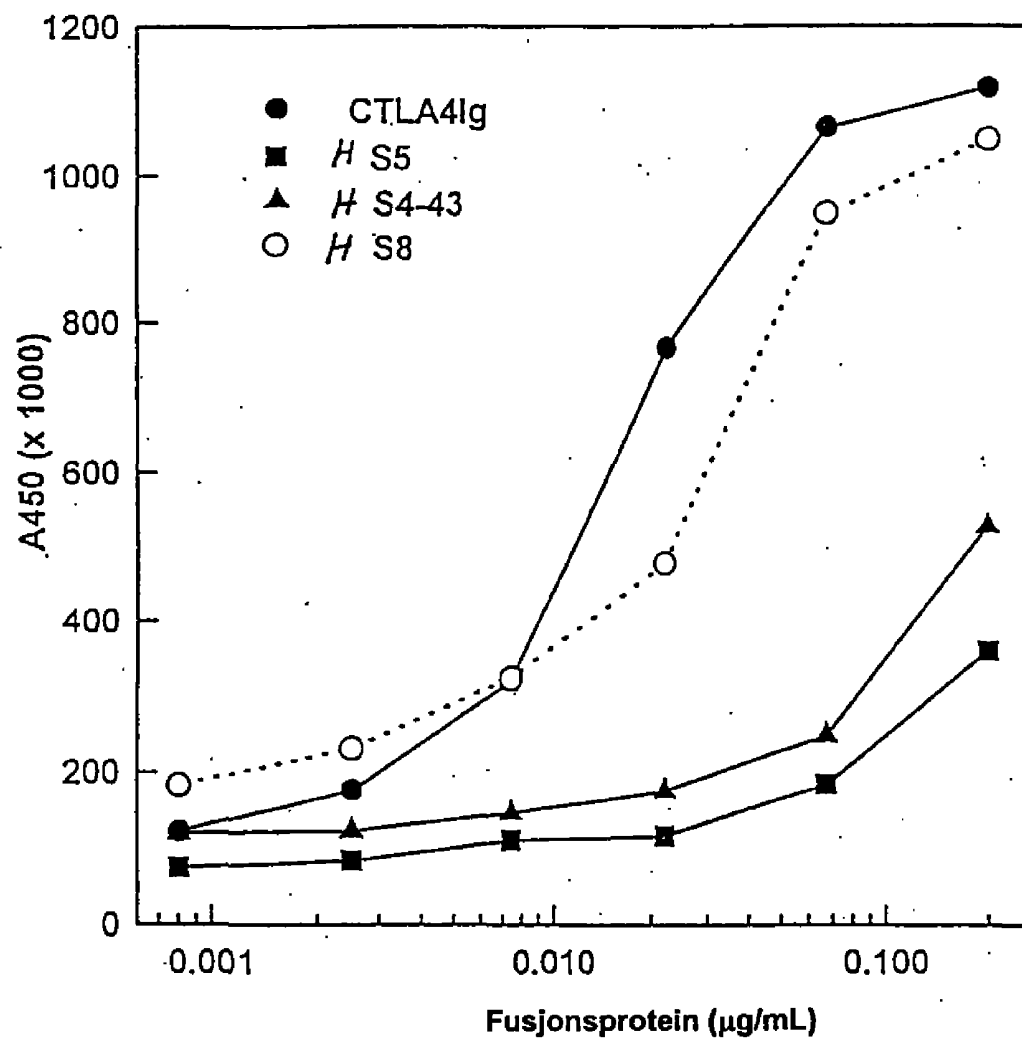
% B7-
bindingsaktivitet



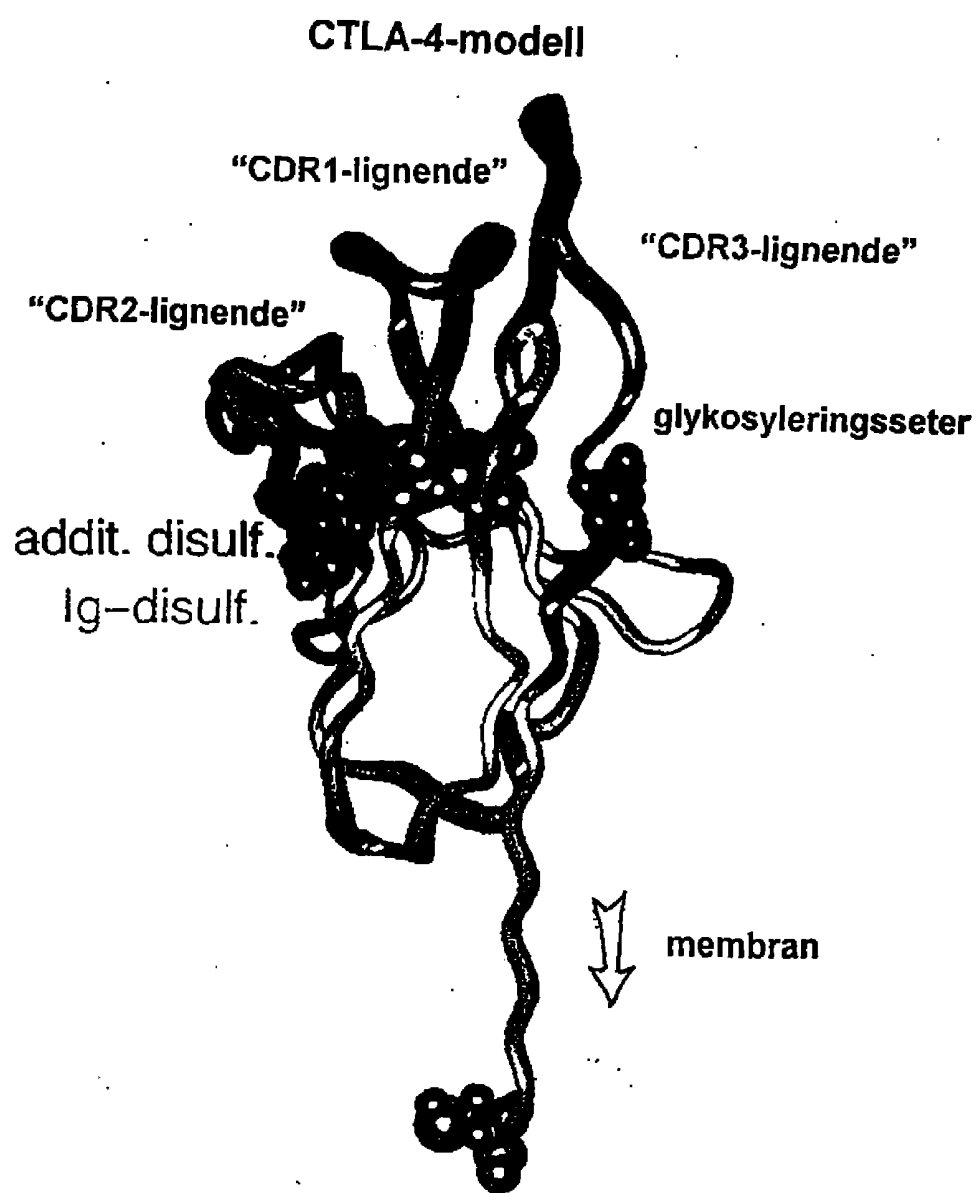
FIGUR 4



FIGUR 5

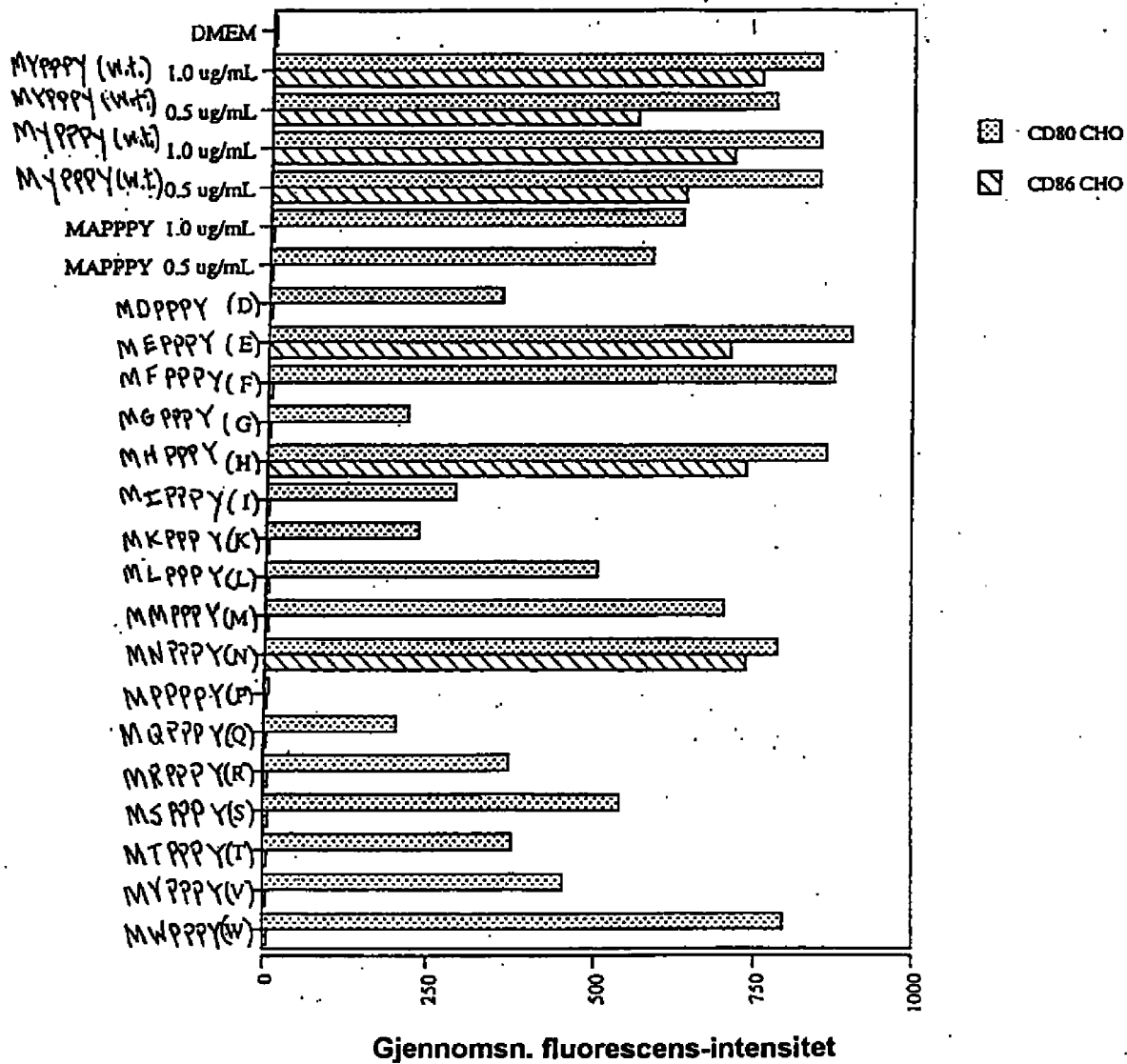


FIGUR 6



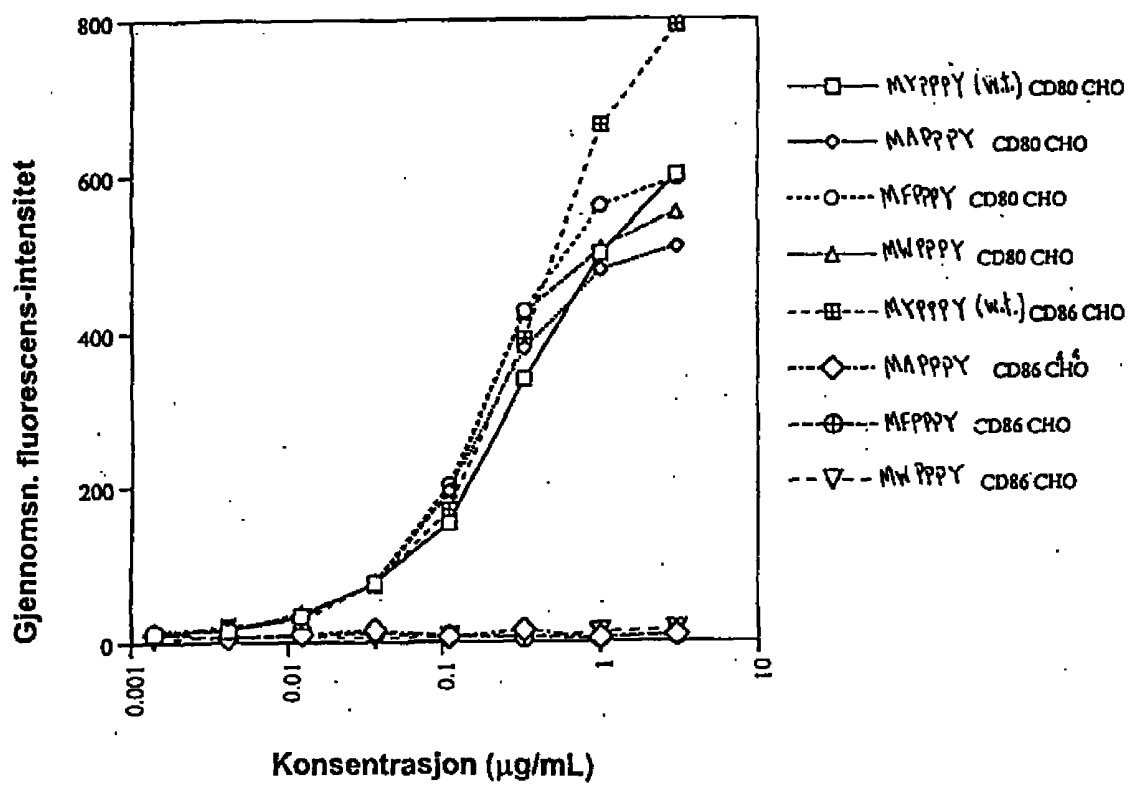
FIGUR 7

Villtype- (w.t.) og mutantbinding til CD80 CHO og CD86 CHO
ifølge FACS-bestemmelse



FIGUR 8

MYPPPY- (Villtype) og mutantbinding til B7-1 CHO og B7-2 CHO
ifølge FACS-bestemmelse



FIGUR 9

MYPPPY- (w.t.) og MFPPPY -(1 $\mu\text{g/mL}$) binding til LCL-816-celler
i nærvær av anti CD80 eller anti-CD86
ifølge FACS-bestemmelse

