

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 38/17 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680019897.6

[43] 公开日 2008 年 6 月 11 日

[11] 公开号 CN 101198347A

[22] 申请日 2006.4.5

[21] 申请号 200680019897.6

[30] 优先权

[32] 2005.4.6 [33] US [31] 60/668,774

[86] 国际申请 PCT/US2006/012648 2006.4.5

[87] 国际公布 WO2006/108035 英 2006.10.12

[85] 进入国家阶段日期 2007.12.5

[71] 申请人 布里斯托尔-迈尔斯斯奎布公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 D·哈格尔蒂 J·鲁斯纳克

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 权陆军 黄可峻

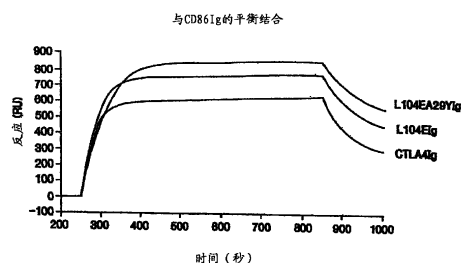
权利要求书 3 页 说明书 79 页 序列表 15 页
附图 13 页

[54] 发明名称

使用可溶性 CTLA4 突变型分子治疗与移植物
移植有关的免疫病症的方法

[57] 摘要

本发明提供了可溶性 CTLA4 突变型分子在与移植物移植有关的免疫病症治疗中的用途,所述可溶性 CTLA4 突变型分子与 CD80 和/或 CD86 抗原结合的抗体亲抗原性大于野生型 CTLA4 或非突变型 CTLA4Ig。



1. 一种用于治疗与移植物移植有关的免疫病症的方法，其包括给受试者施用有效剂量的 CTLA4 突变型分子，所述 CTLA4 突变型分子包括如 SEQ ID NO: 8 中所示、起始于第 26 位的丙氨酸或第 27 位的甲硫氨酸且终止于第 150 位的天冬氨酸的 CTLA4 细胞外结构域或其部分，其中在所述细胞外结构域或其部分中，第 55 位的丙氨酸由酪氨酸置换，并且第 130 位的亮氨酸由谷氨酸置换，并且其中所述施用方案包括早期方案，其中所述早期方案可以是移植后的前 3-6 个月且涉及最初比每月 1 次更频繁的施用。

2. 一种用于治疗与移植物移植有关的免疫病症的方法，其包括给受试者施用有效剂量的 CTLA4 突变型分子，所述 CTLA4 突变型分子包括：

(a) SEQ ID NO: 4 的起始于第 27 位的甲硫氨酸且终止于第 150 位的天冬氨酸的氨基酸序列，或

(b) SEQ ID NO: 4 的起始于第 26 位的丙氨酸且终止于第 150 位的天冬氨酸的氨基酸序列，并且

其中所述 CTLA4 突变型分子施用方案包括早期方案，其中所述早期方案可以是移植后的前 3-6 个月且涉及最初比每月 1 次更频繁的施用。

3. 根据权利要求 1 或 2 的方法，其中所述早期施用方案包括在第 1 天、第 2 周就诊、第 4 周就诊、第 8 周就诊和第 12 周就诊时施用 CTLA4 突变型分子。

4. 根据权利要求 3 的方法，其中所述早期施用方案包括在第 5 天时施用 CTLA4 突变型分子。

5. 根据权利要求 4 的方法，其中所述早期施用方案包括在第 6 周就诊、第 10 周就诊、第 4 个月就诊、第 5 个月就诊和第 6 个月就诊时施用 CTLA4 突变型分子。

6. 根据权利要求 3、4 或 5 的方法，其中所述施用方案进一步包括维持期方案，其中所述维持期方案在所述早期方案结束后开始并且其中 CTLA4 突变型分子的施用不比每月 1 次更频繁。

7. 根据权利要求 3、4 或 5 的方法，其中在所述早期过程中所述有效剂量的 CTLA4 突变型分子是约 10 mg/kg 所述受试者重量。

8. 根据权利要求 6 的方法, 其中在所述维持期过程中所述有效剂量的 CTLA4 突变型分子是约 5 mg/kg 重量。

9. 根据权利要求 1 或 2 的方法, 其中所述有效剂量的 CTLA4 突变型分子是约 10 mg/kg 所述受试者重量, 其施用方案包括在第 1、15、29、57、85 天时施用, 以及其后每月 1 次 5mg/kg。

10. 根据权利要求 1 或 2 的方法, 其中所述有效剂量的 CTLA4 突变型分子是约 10 mg/kg 所述受试者重量, 其施用方案包括在第 1、5、15、29、57、85 天时施用, 以及其后每月 1 次 5mg/kg。

11. 根据权利要求 1 或 2 的方法, 其中所述有效剂量的 CTLA4 突变型分子是约 10 mg/kg 所述受试者重量, 其施用方案包括在第 1、5、15、29、43、57、71、85、113、141、169 天时施用, 以及其后每月 1 次 5mg/kg。

12. 根据权利要求 1 或 2 的方法, 其中与移植物移植有关的所述免疫病症包括实体器官、组织和/或细胞移植排斥。

13. 根据权利要求 12 的方法, 其中与移植物移植有关的所述免疫病症包括肾移植排斥。

14. 根据权利要求 1 或 2 的方法, 其中所述 CTLA4 突变型分子进一步包括改变所述可溶性 CTLA4 突变型分子的溶解性、亲和力和/或效价的氨基酸序列。

15. 根据权利要求 14 的方法, 其中改变溶解性、亲和力和/或效价的所述氨基酸序列包括免疫球蛋白部分。

16. 根据权利要求 15 的方法, 其中所述免疫球蛋白部分是免疫球蛋白恒定区或其部分。

17. 根据权利要求 16 的方法, 其中所述免疫球蛋白恒定区或其部分被突变以减少效应子功能。

18. 根据权利要求 16 的方法, 其中所述免疫球蛋白恒定区或其部分包括人或猴免疫球蛋白分子的铰链、CH2 和 CH3 区。

19. 根据权利要求 17 的方法, 其中所述免疫球蛋白恒定区或其部分包括人或猴免疫球蛋白分子的铰链、CH2 和 CH3 区。

20. 根据权利要求 15 的方法, 其中所述免疫球蛋白包括如 SEQ ID NO: 4 中所示、起始于第+152 位的谷氨酸且终止于第+383 位的赖氨酸的氨基酸序列。

21. 根据权利要求 1 或 2 的方法, 其进一步包括接头氨基酸残基和免疫球蛋白, 其中所述接头氨基酸残基位于终止于第+150 位的天冬氨酸的所述氨基酸序列和所述免疫球蛋白之间。

22. 根据权利要求 1 或 2 的方法, 其中所述 CTLA4 突变型分子与选自下列的至少一种试剂共施用: 巴利昔单抗、达克珠单抗、抗胸腺细胞球蛋白、钙依赖磷酸酶抑制剂、环孢菌素、他克莫司、霉酚酸酯、霉酚酸、雷帕霉素、咪唑疏嘌呤、莫罗单抗、利妥昔单抗、西罗莫司、依维莫司、FTY720、FK778、Jak-3、centican、皮质类固醇、倍他米松、布地奈德、氢化可的松、可的松、地塞米松、hydrocortisone、甲基强的松龙、强的松龙、强的松和去炎松。

23. 根据权利要求 1 或 2 的方法, 其中选自 CAN、高脂血症、高血压、糖尿病、多毛症、秃头、牙龈增生、震颤、神经毒性和骨丢失的结果的发展和/或进展减少。

24. 根据权利要求 1 或 2 的方法, 其进一步包括约 3 μ g/ml - 约 30 μ g/ml 靶谷血清浓度的所述 CTLA4 突变型分子。

25. 一种用于治疗与移植物移植有关的免疫病症的方法, 其包括给受试者施用有效剂量的 CTLA4 突变型分子, 所述 CTLA4 突变型分子包括:

(a) 图 7 的起始于第 27 位的甲硫氨酸且终止于第+357 位的赖氨酸或第+356 的甘氨酸的氨基酸序列, 或

(b) 图 7 的起始于第 26 位的丙氨酸且终止于第+357 位的赖氨酸或第+356 的甘氨酸的氨基酸序列, 并且

其中所述 CTLA4 突变型分子施用方案包括早期方案, 其中所述早期方案可以是移植后的前 3-6 个月且涉及最初比每月 1 次更频繁的施用。

26. 根据权利要求 1、2 或 25 的方法, 其中所述 CTLA4 突变型分子与包括巴利昔单抗和 MMF 的试剂伴随或顺次地共施用。

27. 根据权利要求 1、2 或 25 的方法, 其中所述 CTLA4 突变型分子与包括达克珠单抗和西罗莫司的试剂伴随或顺次地共施用。

使用可溶性 CTLA4 突变型分子治疗 与移植物移植有关的免疫病症的方法

相关申请

本申请根据章节 35 § 119 (e) 要求于 2005 年 4 月 6 日提交的美国临时申请号 60/668,774 的优先权, 所述临时申请的内容引入本文作为参考。

本申请自始至终参考各种出版物。这些出版物的公开内容在此整体引入本申请作为参考以便更充分地描述本发明所属领域的技术发展水平。

发明领域

本发明涉及可溶性 CTLA4 突变型分子在与移植物移植有关的免疫病症治疗中的用途, 与野生型 CTLA4 比较所述可溶性 CTLA4 突变型分子与 CD80 (B7-1) 和 CD86 (B7-2) 的结合抗体亲抗原性增加。

发明背景

考虑到 T 细胞在移植排斥中的重要作用, 目前免疫抑制疗法中的一个共同目标是阻断 T 细胞激活和功能 (Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. N Engl J Med 1998; 338 (25):1813-21)。T 细胞需要抗原特异性 (信号 1) 和共刺激信号 (信号 2) 两者用于完全激活 (Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. Annu Rev Immunol 1996; 14:233-58)。最佳表征的共刺激途径之一涉及 CD28-CD80/86 (B7-1/2) 相互作用 (Linsley PS, Ledbetter JA. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. Annu Rev Immunol 1993; 11:191-212)。细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 4 (CTLA4) 以比 CD28 更高的抗体亲抗原性结合 CD80/86, 并且在激活后瞬时表达在 T 细胞上, 在其中它中断 CD28 和 CD80/86 之间的相互作用 (Oosterwegel MA, Greenwald RJ, Mandelbrot DA, Lorschach

RB, Sharpe AH. CTLA-4 and T cell activation. *Curr Opin Immunol* 1999; 11 (3):294-300)。这产生了对于 T 细胞激活的负反馈信号。

先前已使用 CTLA4Ig 寻求这个途径中的干涉。CTLA4Ig 已成功地用作治疗 T 细胞介导的自身免疫性疾病例如类风湿性关节炎 (Kremer JM, Westhovens R, Leon M, 等人, Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig. *N Engl J Med* 2003; 349 (20):1907-15) 和牛皮癣 (Abrams JR, Lebwohl MG, Guzzo CA, 等人, CTLA4Ig-mediated blockade of T-cell costimulation in patients with psoriasis vulgaris. *J Clin Invest* 1999; 103 (9):1243-52) 的策略。

LEA29Y 已在非人灵长类动物移植模型中单独以及与其他免疫抑制剂组合进行研究。Christian Larsen 等人 (C. Larsen, T. Pearson, A. Adams, P. Tso, N. Shirasugi, E. Strobert, D. Anderson, S. Cowan, K. Price, J. Naemura, J. Emswiler, J. Greene, L.A. Turk, J. Bajorath, R. Townsend, D. Hagerty, P. Linsley 和 R. Peach; Rational Development of LEA29Y (belatacept), a High-Affinity Variant of CTLA4-Ig with Potent Immunosuppressive Properties; *American Journal of Transplantation*; 第 5 卷, Issue 3, March 2005, 第 443 页) 已显示在用于研究肾同种异体移植排斥的非人灵长类动物模型中与 CTLA4-Ig 比较时, LEA29Y 的免疫抑制活性增强。LEA29Y 在手术中 (10 mg/kg, 静脉内)、在第 4 天时 (15 mg/kg) 以及在手术后第 14、28、42、56 和 70 天时 (20 mg/kg, 静脉内) 施用。CTLA4Ig (16mg/kg) 在手术中以及在手术后第 4、8、11 和 16 天时施用。治疗方案还包括 MMF (15 mg/kg, 在第 0-14 天时每天 2 次皮下, 在第 15-180 天时每日)、甲基强的松龙 (根据下列时间表皮下 (subcutaneous) 注射, 第 0 天: 20 mg, 第 1 天: 16 mg, 第 3 天: 8 mg, 第 4 天: 4 mg, 第 5-14 天: 3 mg, 第 15-180 天: 1 mg) 和巴利昔单抗 (basiliximab) (0.3 gm/kg, 在第 0 和 4 天时静脉内)。尽管血清浓度相当, 但用 LEA29Y 治疗的肾同种异体移植受体的存活明显优于用 CTLA4-Ig 治疗组的那种。用清蛋白治疗的对照受体显示与用 CTLA4-Ig 治疗组类似的中值存活时间。然而, 尽管正在进行使用 LEA29Y 的治疗, 但所有受体经历肾功能的显著衰退 (血清肌酸酐升高)。

Andrew Adams 等人 (A. Adams, N. Shirasugi, T. Jones, M. Durham, E. Strobert, S. Cowan, P. Rees, R. Hendrix, K. Price, N. Kenyon, D. Hagerty, R. Townsend, D. Hollenbaugh, T. Pearson 和 C. Larsen; Development of a Chimeric Anti - CD40 Monoclonal Antibody That Synergizes with LEA29Y to Prolong Islet Allograft Survival; The Journal of Immunology; Jan 2005; 174; 第 542 页) 已显示 LEA29Y 和 Chi220 (嵌合抗人 CD40 mab) 的组合在胰岛移植的非人灵长类动物模型中协同作用以延长同种异体移植物的存活。LEA29Y 在手术中 (20mg/kg); 在手术后第 4、7 和 14 天时; 随后每 2 周静脉内施用直至第 100 天。另外的剂量 (20mg/kg) 每月施用 1 次经过 6 个月。测试 4 种方案: 1) 单独的 LEA29Y, 2) Chi220 (抗 CD40), 3) LEA29Y 与 Chi220 组合, 和 4) LEA29Y 与抗 CD20 组合。

Andrew Adams 等人 (A. Adams, N. Shirasugi, M. Durham, E. Strobert, D. Anderson, P. Rees, S. Cowan, H. Xu, Y. Blinder, M. Cheung, D. Hollenbaugh, N. Kenyon, T. Pearson 和 C. Larsen; Calcineurin Inhibitor - Free CD28 Blockade - Based Protocol Protects Allogeneic Islets in Nonhuman Primates; Diabetes, 第 51(2)卷, February 2002, 第 265 页) 已显示在胰岛移植的非人灵长类动物模型中 LEA29Y、雷帕霉素和抗 - IL - 2R mAb 的组合显著延长胰岛同种异体移植物的存活。LEA29Y 在手术中 (10 mg/kg) 和在手术后第 4 天时 (15mg/kg) 静脉内施用。另外的 20 mg/kg 剂量在手术后第 14 天时和每 2 周给予直至手术后第 154 天。

在 2003 年期间, 在美国移植了超过 25,000 个器官。肾移植代表大约 60% 的实体器官移植, 随后为 21% 的肝移植, 8% 的心脏、4% 的肺, 并且剩余的 7% 代表其他器官移植例如胰和肠。(在 www.optn.org 上的 OPTN/SRTR Annual Report 2004)。

肾移植是关于终末期肾病的最有效治疗。它提供了改善的存活和生活质量 (QoL)。功能肾移植的维持要求终生免疫抑制疗法以防止移植物的免疫破坏。当前的免疫抑制方案产生对于尸体 89% 以及对于活供体移植物 94% 的 1 年存活率。然而, 随着时间过去, 存在受试者和移植物两者的渐进性丢失。对于尸体和活相关供体肾移植的 5 年存

活分别为 66% 和 79%。（在 www.unos.org 上的 United Network for Organ Sharing Renal Transplant Registry 2003）

长期受试者和移植物丢失的最常见原因分别是心血管疾病和慢性同种异体移植物肾病（CAN）。（L.C. Paul, Chronic allograft nephropathy – A model of impaired repair from injury? Nephrol Dial Transplant 2000; 15:149 – 151）荒谬的是，关于肾移植的主要疗法 – 钙依赖磷酸酶抑制剂（CNIs）、CsA 和他克莫司直接促成长期同种异体移植物丢失和受试者死亡，因为它们本来就是肾毒性的，并且还引起或加剧心血管危险，包括高血压、高胆固醇血症和糖尿病。虽然如此，但是这些试剂形成了关于肾移植的所有常规免疫抑制方案的基础。

目前，没有批准的试剂可以代替 CNIs 作为在广泛范围的受试者中维持免疫抑制剂疗法的基础。一种试剂西罗莫司（雷帕霉素，来自 Wyeth/Ayerst 的 Rapamune®）已被批准用于在 CNI – 节制方案中使用。然而，对于移植后至少 3 个月 CNIs 仍必须与西罗莫司一起使用。更重要的是，只在受试者处于移植物丢失的低至中等危险中的背景下西罗莫司已被批准作为 CNI – 节制剂。因此，对于处于移植物丢失较高危险中、其 CNIs 肾毒性作用的避免将具有最大利益的那些，没有关于 CNIs 的批准的替代物。

因此，存在对于免疫抑制剂的未满足的医学需要，其可以提供与实践治疗标准可比较的同种免疫体应答的可接受控制，而没有促成长期受试者死亡和移植物丢失的毒性。理想地，该试剂将不仅在低危险的受试者中有用，还在处于移植物丢失的较高危险中的受试者中有用。

发明概述

本发明提供了通过施用 CTLA4 突变型分子治疗与移植物移植有关的免疫病症的方法，所述 CTLA4 突变型分子与 CD80 和/或 CD86 抗原结合的抗体亲抗原性大于野生型 CTLA4 或非突变型 CTLA4Ig。CTLA4 分子具有包括 CTLA4 细胞外结构域的第一种氨基酸序列，其中在 S25 – R33 区和 M97 – G107 区内的某些氨基酸残基是突变的。本

发明的突变型分子还可以包括增加突变型分子溶解性的第二种氨基酸序列。

CTLA4 突变型分子的一个例子是如本文描述的 L104EA29YIg(图 7, SEQ ID NOS: 3 和 4)。CTLA4 突变型分子的另一个例子是如本文描述的 L104EIg(图 8, SEQ ID NOS: 5 和 6)。L104EA29YIg 和 L104EIg 比 CTLA4Ig 以更高抗体亲抗原性结合 CD80 和 CD86。

本发明的 CTLA4 突变型分子的施用可以经过各种时间进行。一般地,施用方案包括其中在最大的免疫学危险期过程中剂量较高且施用频率增加的早期,随后为维持期。早期可以是移植后的前 3-6 个月。在早期过程中的施用方案可以依受体/移植物的状态而变。

在一个实施方案中,本发明提供了通过给受试者施用有效剂量的 CTLA4 突变型分子治疗与移植物移植有关的免疫病症的方法,所述 CTLA4 突变型分子具有如 SEQ ID NO: 8 中所示、起始于第 26 位的丙氨酸或第 27 位的甲硫氨酸且终止于第 150 位的天冬氨酸的 CTLA4 细胞外结构域或其部分。另外,在细胞外结构域或其部分中第 55 位的丙氨酸由酪氨酸置换,并且第 130 位的亮氨酸由谷氨酸置换。此外施用方案包括早期方案,其中早期方案可以是移植后的前 3-6 个月且涉及最初比每月 1 次更频繁的施用。

在另一实施方案中,本发明提供了通过给受试者施用有效剂量的 CTLA4 突变型分子治疗与移植物移植有关的免疫病症的方法,所述 CTLA4 突变型分子具有 SEQ ID NO: 4 的起始于第 27 位的甲硫氨酸且终止于第 150 位的天冬氨酸的氨基酸序列,或具有 SEQ ID NO: 4 的起始于第 26 位的丙氨酸且终止于第 150 位的天冬氨酸的氨基酸序列。此外 CTLA4 突变型分子施用方案包括早期方案,其中早期方案可以是移植后的前 3-6 个月且涉及最初比每月 1 次更频繁的施用。

附图简述

图 1 显示了 L104EA29YIg、L104EIg 和野生型 CTLA4Ig 与 CD86Ig 的平衡结合分析。

图 2A 和 2B 举例说明了来自 FACS 测定的数据,显示了如下文实施例 2 中所述 L104EA29YIg、L104EIg 和 CTLA4Ig 与人 CD80-或 CD86-转染的 CHO 细胞的结合。

图 3A 和 3B 描述了如下文实施例 2 中所述 CD80 - 阳性和 CD86 - 阳性 CHO 细胞的增殖抑制。

图 4A 和 4B 显示如下文实施例 2 中所述在抑制初级和次级同种刺激的 (allostimulated) T 细胞增殖方面, L104EA29YIg 比 CTLA4Ig 更有效。

图 5A - C 举例说明了如下文实施例 2 中所述在抑制同种刺激的人 T 细胞的 IL - 2 (图 5A)、IL - 4 (图 5B) 和 γ - 干扰素 (图 5C) 细胞因子生产方面, L104EA29YIg 比 CTLA4Ig 更有效。

图 6 证实了如下文实施例 2 中所述在抑制植物凝集素 (PHA) 刺激的猴 T 细胞增殖方面, L104EA29YIg 比 CTLA4Ig 更有效。

图 7 (SEQ ID NOS: 3 和 4) 描述了如下文实施例 1 中所述的 CTLA4 突变型分子 (“L104EA29YIg”) 的核苷酸和氨基酸序列, 其包括信号肽; 起始于第+1 位的甲硫氨酸且终止于第+124 位的天冬氨酸、或起始于第-1 位的丙氨酸且终止于第+124 位的天冬氨酸的 CTLA4 突变细胞外结构域; 和 Ig 区。SEQ ID NOS: 3 和 4 分别描述了 CTLA4 突变型分子 (“L104EA29YIg”) 的核苷酸和氨基酸序列, 其包括信号肽; 起始于第+27 位的甲硫氨酸且终止于第+150 位的天冬氨酸、或起始于第+26 位的丙氨酸且终止于第+150 位的天冬氨酸的 CTLA4 突变细胞外结构域; 和 Ig 区。

图 8 (SEQ ID NOS: 5 和 6) 描述了如下文实施例 1 中所述的 CTLA4 突变型分子 (“L104EIg”) 的核苷酸和氨基酸序列, 其包括信号肽; 起始于第+1 位的甲硫氨酸且终止于第+124 位的天冬氨酸、或起始于第-1 位的丙氨酸且终止于第+124 位的天冬氨酸的 CTLA4 突变细胞外结构域; 和 Ig 区。SEQ ID NOS: 5 和 6 分别描述了 CTLA4 突变型分子 (“L104EIg”) 的核苷酸和氨基酸序列, 其包括信号肽; 起始于第+27 位的甲硫氨酸且终止于第+150 位的天冬氨酸、或起始于第+26 位的丙氨酸且终止于第+150 位的天冬氨酸的 CTLA4 突变细胞外结构域; 和 Ig 区。

图 9 (SEQ ID NOS: 7 和 8) 描述了 CTLA4Ig 的核苷酸和氨基酸序列, 其具有信号肽; 起始于第+1 位的甲硫氨酸至第+124 位的天冬氨酸、或起始于第-1 位的丙氨酸至第+124 位的天冬氨酸的 CTLA4 细胞外结构域的野生型氨基酸序列; 和 Ig 区。SEQ ID NOS: 7 和 8 分

别描述了 CTLA4Ig 的核苷酸和氨基酸序列,其包括信号肽;起始于第+27 位的甲硫氨酸且终止于第+150 位的天冬氨酸、或起始于第+26 位的丙氨酸且终止于第+150 位的天冬氨酸的 CTLA4 细胞外结构域的野生型氨基酸序列;和 Ig 区。

图 10A - C 是关于 CTLA4Ig (泳道 1)、L104EIg (泳道 2) 和 L104EA29YIg (泳道 3A) 的 SDS 凝胶 (图 10A); 以及 CTLA4Ig (图 10B) 和 L104EA29YIg (图 10C) 的大小排阻层析。

图 11A 和 11B 举例说明了由通过 NMR 光谱学测定的溶液结构产生的 CTLA4 细胞外 Ig V-样折叠的带状图解。图 11B 显示 S25 - R33 区和 MYPPPY 区的放大图,显示了抗体亲抗原性增强突变 L104 和 A29 的定位和侧链方向。

图 12 描述了具有 L104EA29YIg 插入片段的载体 pILN - L104EA29Y 的示意图。

图 13 描述了 CTLA4 受体的核苷酸和氨基酸序列 (SEQ ID NOS: 9 和 10)。

发明详述

定义

除非另有说明,本申请中使用的所有科学和技术术语都具有本领域通常使用的含义。如本申请中使用的,下列单词或短语具有说明的含义。

如本文使用的,“配体”指特异性识别并结合另一分子的分子,例如关于 CTLA4 的配体是 B7 分子。

如本文使用的,“野生型 CTLA4”或“非突变型 CTLA4”具有如图 13 中所示 (SEQ ID NOS: 9 和 10; 还如美国专利号 5,434,131、5,844,095、5,851,795 中所述)天然存在的全长 CTLA4 的氨基酸序列,或其任何部分或衍生物,其识别并结合 B7 或干扰 B7,从而使得它阻断与 CD28 和/或 CTLA4 (例如内源性 CD28 和/或 CTLA4) 的结合。在具体实施方案中,野生型 CTLA4 的细胞外结构域起始于第+1 位的甲硫氨酸且终止于第+124 位的天冬氨酸,或野生型 CTLA4 的细胞外结构域起始于第-1 位的丙氨酸且终止于第+124 位的天冬氨酸。野生型 CTLA4 是细胞表面蛋白,具有 N 末端细胞外结构域、跨膜结构域

和 C 末端细胞质结构域。细胞外结构域结合靶分子，例如 B7 分子。在细胞中，天然存在的野生型 CTLA4 蛋白质翻译为未成熟的多肽，其包括在 N 末端的信号肽。未成熟的多肽经历翻译后加工，这包括切割并去除信号肽以产生 CTLA4 切割产物，其具有的新生成的 N 末端不同于未成熟形式的 N 末端。本领域技术人员将理解可以存在另外的翻译后加工，其从 CTLA4 切割产物的新生成的 N 末端去除一个或多个氨基酸。可替代地，信号肽可以不完全去除，从而产生在共同的起始氨基酸甲硫氨酸之前开始的分子。因此，成熟的 CTLA4 蛋白质可以起始于第+1 位的甲硫氨酸或第-1 位的丙氨酸。成熟形式的 CTLA4 分子包括细胞外结构域或其结合 B7 的任何部分。

“CTLA4Ig”是可溶性融合蛋白，其包括与 Ig 尾连接的野生型 CTLA4 的细胞外结构域，或其结合 B7 的部分。具体实施方案包括起始于第+1 位的甲硫氨酸且终止于第+124 位的天冬氨酸；或起始于第-1 位的丙氨酸至第+124 位的天冬氨酸的野生型 CTLA4(如图 9 中所示，SEQ ID NOS: 7 和 8)的细胞外结构域；在第+125 位的接头氨基酸残基谷氨酰胺；和包括第+126 位的谷氨酸到第+357 位的赖氨酸或第+356 位的甘氨酸的免疫球蛋白部分(编码 CTLA4Ig 的 DNA 根据布达佩斯条约 (Budapest Treaty) 的规定于 1991 年 5 月 31 日保藏于美国典型培养物保藏中心 (ATCC)，10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209，并且已给予 ATCC 登记号 ATCC 68629; Linsley, P., 等人, 1994 *Immunity* 1:793-80。表达 CTLA4Ig 的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系 CTLA4Ig-24 于 1991 年 5 月 31 日保藏，ATCC 识别号为 CRL-10762)。可溶性 CTLA4Ig 分子可以包括或不包括信号(前导)肽序列。

如本文使用的，“融合蛋白”定义为使用本领域众所周知的且如美国专利号 5,434,131 或 5,637,481 中描述的方法连接在一起的一种或多种氨基酸序列。连接的氨基酸序列从而形成一种融合蛋白。

如本文使用的，“可溶的”指任何分子，或其片段和衍生物不结合或附着至细胞，即流动的。例如，CTLA4、B7 或 CD28 可以通过将免疫球蛋白 (Ig) 部分分别附着至 CTLA4、B7 或 CD28 的细胞外结构域变得可溶。可替代地，分子例如 CTLA4 可以通过去除其跨膜结构域变得可溶。

如本文使用的,“CTLA4 的细胞外结构域”是识别并结合 CTLA4 配体例如 B7 分子的 CTLA4 部分。例如,CTLA4 的细胞外结构域包括第+1 位的甲硫氨酸至第+124 位的天冬氨酸(图 13, SEQ ID NOS: 9 和 10)。可替代地,CTLA4 的细胞外结构域包括第-1 位的丙氨酸至第+124 位的天冬氨酸(图 13, SEQ ID NOS: 9 和 10)。细胞外结构域包括结合 B7 分子的 CTLA4 片段或衍生物。如图 13 (SEQ ID NOS: 9 和 10) 中所示的 CTLA4 的细胞外结构域还可以包括改变 CTLA4 分子对 B7 分子的结合抗体亲抗原性的突变。

如本文使用的,“CTLA4 突变型分子”意指如 (SEQ ID NOS: 9 和 10) 中显示的野生型 CTLA4 或其任何部分或衍生物,其具有一个突变或多个突变(优选在野生型 CTLA4 的细胞外结构域中)。CTLA4 突变型分子具有的序列类似但不等同于野生型 CTLA4 分子的序列,但仍然结合 B7。突变可以包括由具有保守(例如用异亮氨酸置换亮氨酸)或非保守(例如用色氨酸置换甘氨酸)结构或化学性质的氨基酸置换的一个或多个氨基酸残基、氨基酸缺失、添加、移码或截短。CTLA4 突变型分子可以包括在其中或与其附着的非 CTLA4 分子。突变型分子可以是可溶的(即,流动的)或结合至细胞表面。另外的 CTLA4 突变型分子包括美国专利申请序列号 09/865,321、60/214,065 和 60/287,576; 美国专利号 6,090,914、5,844,095 和 5,773,253 中描述的那些; 以及如 Peach, R. J., 等人,在 *J Exp Med* 180:2049-2058 (1994)) 中描述的。CTLA4 突变型分子可以合成或重组制备。

“L104EA29YIg”是可溶性 CTLA4 突变型分子的融合蛋白,所述 CTLA4 突变型分子包括与 Ig 尾连接、具有氨基酸改变 A29Y (酪氨酸氨基酸残基置换第 29 位的丙氨酸)和 L104E (谷氨酸氨基酸残基置换第+104 位的亮氨酸)的野生型 CTLA4 的细胞外结构域,或其结合 B7 分子的部分(包括在图 7 中, SEQ ID NOS: 3 和 4; 编码 L104EA29YIg 的 DNA 于 2000 年 6 月 20 日保藏, ATCC 号为 PTA-2104; 在引入本文作为参考的美国专利申请序列号 09/579,927、60/287,576 和 60/214,065 中共同未决)。在本发明的方法和/或试剂盒中使用的可溶性 L104EA29YIg 分子可以包括或不包括信号(前导)肽序列。一般地,在本发明的方法和/或试剂盒中,该分子不包括信号肽序列。

如本文使用的，术语“突变”意指野生型分子的核苷酸或氨基酸序列中的变化，例如，野生型 CTLA4 细胞外结构域的 DNA 和/或氨基酸序列中的变化。DNA 中的突变可以改变密码子，从而导致氨基酸序列中的变化。DNA 变化可以包括置换、缺失、插入、可变剪接或截短。氨基酸变化可以包括置换、缺失、插入、添加、截短、或蛋白质的加工或切割错误。可替代地，核苷酸序列中的突变可以导致如本领域充分理解的氨基酸序列中的沉默突变。在那点上，某些核苷酸密码子编码相同的氨基酸。例子包括编码氨基酸精氨酸（R）的核苷酸密码子 CGU、CGG、CGC 和 CGA；或编码氨基酸天冬氨酸（D）的密码子 GAU 和 GAC。因此，蛋白质可以由在其具体核苷酸序列方面不同，但仍编码具有相同序列的蛋白质分子的一种或多种核酸分子编码。氨基酸编码序列如下：

氨基酸	符号	单字母符号	密码子
丙氨酸	Ala	A	GCU, GCC, GCA, GCG
半胱氨酸	Cys	C	UGU, UGC
天冬氨酸	Asp	D	GAU, GAC
谷氨酸	Glu	E	GAA, GAG
苯丙氨酸	Phe	F	UUU, UUC
甘氨酸	Gly	G	GGU, GGC, GGA, GGG
组氨酸	His	H	CAU, CAC
异亮氨酸	Ile	I	AUU, AUC, AUA
赖氨酸	Lys	K	AAA, AAG
亮氨酸	Leu	L	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG
甲硫氨酸	Met	M	AUG
天冬酰胺	Asn	N	AAU, AAC
脯氨酸	Pro	P	CCU, CCC, CCA, CCG
谷氨酰胺	Gln	Q	CAA, CAG
精氨酸	Arg	R	CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
丝氨酸	Ser	S	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
苏氨酸	Thr	T	ACU, ACC, ACA, ACG
缬氨酸	Val	V	GUU, GUC, GUA, GUG
色氨酸	Trp	W	UGG
酪氨酸	Tyr	Y	UAU, UAC

突变型分子可以具有一个或多个突变。

如本文使用的，“非 CTLA4 蛋白质序列”或“非 CTLA4 分子”意指不结合 B7 且不干扰 CTLA4 与其靶结合的任何蛋白质分子。例子包括但不限于，免疫球蛋白（Ig）恒定区或其部分。优选地，Ig 恒定

区是人或猴 Ig 恒定区，例如人 C(γ)1，包括铰链、CH2 和 CH3 区。Ig 恒定区可以被突变以减少其效应子功能（美国专利 5,637,481、5,844,095 和 5,434,131）。

如本文使用的，“片段”或“部分”是识别并结合其靶例如 B7 分子的 CTLA4 分子的任何部分或区段，优选 CTLA4 的细胞外结构域或其部分或区段。CTLA4 的细胞外结构域可以包括改变 CTLA4 分子对 B7 分子的结合抗体亲抗原性的突变。

如本文使用的，“B7”指可以识别并结合 CTLA4 和/或 CD28 的 B7 分子家族，包括但不限于，B7-1（CD80）、B7-2（CD86）和 B7-3。

如本文使用的，“B7 阳性细胞”是在细胞表面上表达一种或多种类型的 B7 分子的任何细胞。

如本文使用的，“衍生物”是共有其亲本分子的序列同源性和活性的分子。例如，CTLA4 的衍生物包括具有至少 70% 类似于野生型 CTLA4 的细胞外结构域的氨基酸序列并且识别并结合 B7 的可溶性 CTLA4 分子，例如 CTLA4Ig 或可溶性 CTLA4 突变型分子 L104EA29YIg。

如本文使用的，“调节”免疫应答是激活、刺激、上调、抑制、阻断、下调或修改免疫应答。本文描述的自身免疫性疾病可以通过调节免疫应答来治疗，例如通过调节功能性 CTLA4-和/或 CD28-阳性细胞与 B7 阳性细胞的相互作用。例如，用于调节免疫应答的方法包括使 B7 阳性细胞与本发明的可溶性 CTLA4 分子接触，从而形成可溶性 CTLA4/B7 复合物，可溶性 CTLA4 分子干扰内源性 CTLA4 和/或 CD28 分子与所述 B7 细胞的反应。

如本文使用的，“阻断”或“抑制”受体、信号或分子意指如通过领域公认的测试检测的，干扰受体、信号或分子的激活。阻断或抑制可以是部分或全部的。例如，细胞介导的免疫应答的阻断可以通过测定移植物的功能性来检测，例如肾移植后的血清肌酸酐浓度。

如本文使用的，“阻断 B7 相互作用”意指干扰 B7 与其配体例如 CD28 和/或 CTLA4 的结合，从而阻碍 T 细胞和 B7 阳性细胞的相互作用。阻断 B7 相互作用的试剂的例子包括但不限于，识别并结合任何 CTLA4、CD28 或 B7 分子（例如 B7-1、B7-2）的分子例如抗体（或

其部分或衍生物)；可溶形式的分子(或其部分或衍生物)例如可溶性 CTLA4；设计为通过 CTLA4/CD28/B7 介导的相互作用干扰细胞信号的肽片段或其他小分子。在优选实施方案中，阻断剂是可溶性 CTLA4 突变型分子，例如 L104EA29YIg (ATCC PTA-2104)。

如本文使用的，“治疗”病症或疾病意指通过医学或其他疗法处理疾病或病症。疾病或病症的治疗可以抑制与疾病有关的免疫介导事件，改善疾病或病症的症状，减少疾病或病症的严重性，改变疾病或病症进展的过程，和/或改善或治愈基本疾病或病症问题。例如，治疗与移植物移植有关的免疫病症可以通过调节免疫应答来完成，例如通过调节功能性 CTLA4-和/或 CD28-阳性细胞与 B7 阳性细胞的相互作用。可替代地，治疗免疫疾病或病症可以通过经由使用本文描述的组合物预防或抑制疾病或病症发生或进展来完成。例如，治疗肾移植排斥包括如通过肾小球滤过率 (GFR) 测量的肾移植排斥的抑制。例如，治疗与移植物移植有关的免疫病症包括通过施用 L104EA29YIg 预防器官排斥。此外，治疗与移植物移植有关的免疫病症可以延长宿主和移植器官的存活。

如本文使用的，“免疫系统疾病”包括由 T 细胞与 B7 阳性细胞相互作用介导的任何疾病，包括但不限于，自身免疫性疾病、免疫增生性疾病、以及与移植物移植有关的免疫病症。

如本文使用的，“与移植物移植有关的免疫病症”意指由 T 细胞与 B7 阳性细胞相互作用介导的任何移植相关疾病，包括但不限于，与移植物移植排斥有关的免疫病症，移植物相关病症，移植物抗宿主病 (GVHD) (例如，可以由骨髓移植引起，或在耐受性的诱导中)，移植物或移植体排斥包括移植物或移植体的急性排斥和移植物或移植体的慢性排斥。移植物可以是实体器官同种异体移植物或异种移植物、组织或细胞同种异体移植物或异种移植物、或外解剖学同种异体移植物或异种移植物，包括但不限于皮肤、胰岛细胞(也称为胰岛)、肌肉、肝细胞、神经元、心脏、肝、肾、肺、附肢、肢、鼻、耳或脸。

如本文使用的，免疫增生性疾病包括但不限于，T 细胞淋巴瘤；急性 T 细胞型淋巴母细胞白血病；睾丸血管中心 (testicular angiocentric) T 细胞淋巴瘤；和良性淋巴细胞性脉管炎。

如本文使用的,自身免疫性疾病包括但不限于,疾病例如狼疮(例如红斑狼疮、狼疮肾炎),牛皮癣; Hashimoto 氏甲状腺炎,原发性粘液性水肿, Grave 氏病,恶性贫血,自身免疫性萎缩性胃炎, Addison 氏病,糖尿病(例如胰岛素依赖性糖尿病、I 型糖尿病、II 型糖尿病), good pasture 氏综合征,重症肌无力,天疱疮, Crohn 氏病,炎症肠病(IBD), 交感性眼炎,自身免疫性葡萄膜炎,多发性硬化,自身免疫性溶血性贫血,特发性血小板减少症,原发性胆汁性肝硬变,慢性活动性肝炎,溃疡性结肠炎, Sjogren 氏综合征,风湿性疾病(例如类风湿性关节炎、牛皮癣性关节炎),多发性肌炎,硬皮病,和混合型结缔组织病。

为了本文描述的本发明可以被更充分地理解,阐述了下列描述。

本发明的组合物和方法

本发明提供了用于移植的一类新的免疫抑制疗法。其是结合抗原呈递细胞(APCs)表面上的 B7 分子的融合蛋白,抑制 T 细胞激活必需的共刺激。本发明的可溶性 CTLA4 突变型分子在其分子靶的限制性分布及其作用特异性方面不同于现有免疫抑制剂。本发明提供了识别并结合 CD80 和/或 CD86 的可溶性 CTLA4 突变型分子。在某些实施方案中,可溶性 CTLA4 突变体对于 CD80 和/或 CD86 的抗体亲抗原性比 CTLA4Ig 更高。例如, L104EA29YIg 与 CD80 的结合抗体亲抗原性为野生型 CTLA4Ig (以下称为 CTLA4Ig) 的大约 2 倍,并且与 CD86 的结合抗体亲抗原性为大约 4 倍。这种更强烈的结合导致 L104EA29YIg 在阻断免疫应答方面比 CTLA4Ig 更有效。

本发明的一个实施方案提供了用于治疗免疫系统疾病的方法。该方法包括给受试者施用包括本文公开的可溶性 CTLA4 突变型分子的治疗组合物,其量有效减轻与免疫系统疾病有关的至少一种症状。另外,本文公开的可溶性 CTLA4 突变型分子可以提供用于免疫系统疾病的长期治疗,这通过阻断 T 细胞/B7 阳性细胞的相互作用,从而阻断经由共刺激信号例如 B7 与 CD28 结合的 T 细胞激活/刺激,从而导致 T 细胞无反应性或耐受性的诱导来实现。免疫系统疾病包括但不限于,自身免疫性疾病、免疫增生性疾病以及上文讨论的与移植物移植有关的免疫病症。

另一实施方案提供了通过施用包括本文公开的可溶性 CTLA4 突变型分子的治疗组合物用于在患有与移植物移植有关的免疫病症的受试者中诱导耐受性的方法。

本文公开的可溶性 CTLA4 突变型分子显示出体内抑制特性。在其中 T 细胞/B7 阳性细胞相互作用，例如 T 细胞/B 细胞相互作用由于 T 细胞和 B7 阳性细胞之间的接触而发生的条件下，引入的 CTLA4 突变型分子与 B7 阳性细胞例如 B 细胞的结合可以干扰，即抑制 T 细胞/B7 阳性细胞相互作用，从而导致免疫应答的调节。

另一实施方案提供了用于调节免疫应答的方法。通过本文公开的可溶性 CTLA4 突变型分子下调（减少）的免疫应答可以经由抑制或阻断已经在进行中的免疫应答，或可以涉及预防免疫应答的诱导。本文公开的可溶性 CTLA4 突变型分子可以通过抑制 T 细胞应答或通过诱导 T 细胞中的特异性耐受，或两者来抑制活化 T 细胞的功能，例如 T 淋巴细胞增殖、细胞因子分泌和/或细胞因子生产。此外，本文公开的干扰 CTLA4/CD28/B7 途径的可溶性 CTLA4 突变型分子可以抑制 T 细胞增殖和/或细胞因子分泌，并因此导致组织破坏减少和 T 细胞无应答性或无反应性的诱导。

CTLA4 突变型分子包括 CTLA4 的至少细胞外结构域，或其结合 CD80 和/或 CD86 的部分。CTLA4 突变型分子的细胞外部分包括起始于第+1 位甲硫氨酸到第+124 位的天冬氨酸的氨基酸序列（图 7，SEQ ID NOS: 3 和 4；或图 8，SEQ ID NOS: 5 和 6）。可替代地，CTLA4 的细胞外部分可以包括起始于第 -1 位丙氨酸到第+124 位的天冬氨酸的氨基酸序列（图 7，SEQ ID NOS: 3 和 4；或图 8，SEQ ID NOS: 5 和 6）。

在一个实施方案中，可溶性 CTLA4 突变型分子是包括 CTLA4 的细胞外结构域的融合蛋白，其在起始于第+25 位的丝氨酸且终止于第+33 位的精氨酸的氨基酸序列（S25 - R33）区域中具有一个或多个突变。例如，野生型 CTLA4 的第+29 位的丙氨酸可以由酪氨酸（密码子：UAU、UAC）置换。可替代地，丙氨酸可以由亮氨酸（密码子：UUA、UUG、CUU、CUC、CUA、CUG）、苯丙氨酸（密码子：UUU、UUC）、色氨酸（密码子：UGG）或苏氨酸（密码子：ACU、ACC、ACA、

ACG)置换。如本领域技术人员容易理解的, RNA 序列中的尿嘧啶(U)核苷酸对应 DNA 序列中的胸腺嘧啶(T)核苷酸。

在另一实施方案中, 可溶性 CTLA4 突变型分子是包括 CTLA4 的细胞外结构域的融合蛋白, 其在起始于第+97 位的甲硫氨酸且终止于第+107 位的甘氨酸的氨基酸序列(M97-G107)区域中或附近具有一个或多个突变。例如, 野生型 CTLA4 的第+104 位的亮氨酸可以由谷氨酸(密码子: GAA、GAG)置换。具有这种置换的 CTLA4 突变型分子在本文中称为 L104EIg(图 8, SEQ ID NOS: 5 和 6)。

在再一实施方案中, 可溶性 CTLA4 突变型分子是包括 CTLA4 的细胞外结构域的融合蛋白, 其在 S25-R33 和 M97-G107 区域中具有一个或多个突变。例如, 在一个实施方案中, CTLA4 突变型分子包括第+29 位的酪氨酸代替丙氨酸; 和第+104 位的谷氨酸代替亮氨酸。具有这些置换的 CTLA4 突变型分子在本文中称为 L104EA29YIg(图 7, SEQ ID NOS: 3 和 4)。编码 L104EA29YIg 的核酸分子包含在 pD16 L104EA29YIg 中, 并且于 2000 年 6 月 20 日保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209(ATCC 号 PTA-2104)。pD16 L104EA29YIg 载体是 pcDNA3 载体(INVITROGEN)的衍生物。

本发明进一步提供了包括如图 7(SEQ ID NOS: 3 和 4)或图 8(SEQ ID NOS: 5 和 6)中所示的 CTLA4 突变体的细胞外结构域或其部分, 以及改变 CTLA4 突变型分子的溶解性、亲和力和/或效价的部的可溶性 CTLA4 突变型分子。

依照本发明的实践, 该部分可以是免疫球蛋白恒定区或其部分, 例如 CH1 结构域、铰链、CH2 结构域或 CH3 结构域中的一个或多个。对于体内使用, 优选免疫球蛋白恒定区不在受试者中引起有害的免疫应答。例如, 在临床方案中, 优选突变型分子包括人或猴免疫球蛋白恒定区或其部分。合适的免疫球蛋白结构域的例子包括但不限于, IgC γ 1(IgC γ 1)、IgC γ 2(IgC γ 2)、IgC γ 3(IgC γ 3)、IgC γ 4(IgC γ 4)、IgC μ (IgC μ)、IgC α 1(IgC α 1)、IgC α 2(IgC α 2)、IgC δ (IgC δ)或 IgC ϵ (IgC ϵ)。其他同种型也是可能的。此外, 其他免疫球蛋白恒定区或其部分也是可能的(优选其他弱或非免疫原性的免疫球蛋白恒定区或其部分)。

对于临床方案, 优选免疫球蛋白部分不在受试者中引起有害的免疫应答。优选的部分是免疫球蛋白恒定区或其部分, 包括人或猴免疫球蛋白分子恒定区或其部分。合适的免疫球蛋白区的一个例子是人 C γ 1, 包括铰链、CH2 和 CH3 区, 其可以介导效应子功能例如结合 Fc 受体、介导补体依赖性细胞毒性 (CDC)、或介导依赖抗体的细胞毒性 (ADCC)。免疫球蛋白部分可以在其中具有一个或多个突变 (例如在 CH2 结构域中, 以减少效应子功能, 例如 CDC 或 ADCC), 其中所述突变通过增加或减少免疫球蛋白与 Fc 受体的结合能力调节免疫球蛋白与其配体的结合能力。例如, 免疫球蛋白部分中的突变可以包括铰链结构域内的任何或所有其半胱氨酸残基中的变化, 例如第 +130、+136 和 +139 位的半胱氨酸由丝氨酸置换 (图 9, SEQ ID NO: 8)。免疫球蛋白部分还可以包括如图 9 (SEQ ID NO: 8) 中所示由丝氨酸置换的第 +148 位的脯氨酸。此外, 免疫球蛋白部分中的突变可以包括由苯丙氨酸置换第 +144 位的亮氨酸, 由谷氨酸置换第 +145 位的亮氨酸, 或由丙氨酸置换第 +147 位的甘氨酸。免疫球蛋白部分的例子包括美国专利公开号 2002/0114814 A1 和 2004/0151725 A1, 美国专利号 6,444,792 和 6,750,334, 以及 WO 97/28267 中描述和公开的那些。

其他部分包括多肽标记。合适标记的例子包括但不限于 p97 分子、env gp120 分子、E7 分子和 ova 分子 (Dash, B., 等人, (1994) *J. Gen. Virol.* 75:1389 - 97; Ikeda, T., 等人, (1994) *Gene* 138:193 - 6; Falk, K., 等人, (1993) *Cell. Immunol.* 150:447 - 52; Fujisaka, K. 等人, (1994) *Virology* 204:789 - 93)。用作标记的其他分子也是可能的 (Gerard, C. 等人, (1994) *Neuroscience* 62:721 - 739; Byrn, R. 等人, *J. Virol.* (1989) 63:4370 - 4375; Smith, D. 等人, (1987) *Science* 238:1704 - 1707; Lasky, L., (1996) *Science* 233:209 - 212)。

本发明进一步提供了可溶性突变型 CTLA4Ig 融合蛋白, 优选与野生型 CTLA4 比较与 CD80 和/或 CD86 抗原更有反应性。一个例子是如图 7 (SEQ ID NOS: 3 和 4) 中所示的 L104EA29YIg。

在另一实施方案中, 可溶性 CTLA4 突变型分子包括接头氨基酸残基, 其位于 CTLA4 部分和免疫球蛋白部分之间。接头氨基酸可以

是任何氨基酸，包括谷氨酰胺。接头氨基酸可以通过本领域已知的分子或化学合成方法引入。

在另一实施方案中，可溶性 CTLA4 突变型分子包括免疫球蛋白部分（例如，铰链、CH2 和 CH3 结构域），其中免疫球蛋白部分的铰链结构域内的任何或所有半胱氨酸残基由丝氨酸置换，例如第 +130、+136 或 +139 位的半胱氨酸（图 7，SEQ ID NOS: 3 和 4；或图 8，SEQ ID NOS: 5 和 6）。突变型分子还可以包括如图 7（SEQ ID NOS: 3 和 4）或图 8（SEQ ID NOS: 5 和 6）中所示由丝氨酸置换的第 +148 位的脯氨酸。

可溶性 CTLA4 突变型分子可以包括与突变型分子 CTLA4 部分的细胞外结构域的 N 末端连接的信号肽序列。信号肽可以是允许突变型分子分泌的任何序列，包括来自制瘤素 M（Malik, 等人, (1989) *Molec. Cell. Biol.* 9: 2847-2853）或 CD5（Jones, N. H. 等人, (1986) *Nature* 323:346-349）的信号肽，或来自任何细胞外蛋白质的信号肽。

突变型分子可以包括在 CTLA4 的细胞外结构域的 N 末端连接的制瘤素 M 信号肽，以及与 CTLA4 的细胞外结构域的 C 末端连接的人免疫球蛋白分子（例如，铰链、CH2 和 CH3）。这种分子包括包含第 -26 位的甲硫氨酸到第 -1 位的丙氨酸的氨基酸序列的制瘤素 M 信号肽，包含第 +1 位的甲硫氨酸到第 +124 位的天冬氨酸的氨基酸序列的 CTLA4 部分，第 +125 位的接头氨基酸残基谷氨酰胺，以及包含第 +126 位的谷氨酸到第 +357 位的赖氨酸或第 +356 位的甘氨酸的氨基酸序列的免疫球蛋白部分。

本发明的可溶性 CTLA4 突变型分子可以通过分子或化学合成方法获得。分子方法可以包括下列步骤：将表达且编码可溶性 CTLA4 突变型分子的核酸分子引入合适的宿主细胞；在允许宿主细胞表达突变型分子的条件培养这样引入的宿主细胞；并分离表达的突变型分子。突变型分子的信号肽部分允许蛋白质分子表达在细胞表面上并由宿主细胞分泌。翻译的突变型分子可以经历翻译后修饰，涉及切割信号肽以产生具有 CTLA4 和免疫球蛋白部分的成熟蛋白。切割可以在第 -1 位的丙氨酸后发生，从而导致具有第 +1 位的甲硫氨酸作为第一个氨基酸的成熟的突变型分子（图 7，SEQ ID NOS: 3 和 4；或图 8，SEQ ID NOS: 5 和 6）。可替代地，切割可以在第 -2 位的甲硫氨酸

后发生,从而导致具有第-1位的丙氨酸作为第一个氨基酸的成熟的突变型分子。

本领域技术人员将知道在哺乳动物细胞中表达 L104EA29YIg 可以导致 N 和 C 末端变体的产生,从而使得产生的蛋白质可以具有氨基酸残基序列: (i) +1 至+357, (ii) -1 至+357; (iii) +1 至+356 或 (iv) -1 至 356 (图 7, SEQ ID NOS: 3 和 4; 或图 8, SEQ ID NOS: 5 和 6)。

优选实施方案是具有与人免疫球蛋白分子(例如,铰链、CH2 和 CH3)的全部或部分连接的人 CTLA4 的细胞外结构域的可溶性 CTLA4 突变型分子。这种优选分子包括包含第+1 位的甲硫氨酸到第+124 位的天冬氨酸的氨基酸序列的可溶性分子 CTLA4 部分,第+125 位的接头氨基酸残基谷氨酰胺,以及包含第+126 位的谷氨酸到第+357 位的赖氨酸或第+356 位的甘氨酸的免疫球蛋白部分。具有 CTLA4 的细胞外结构域的部分被突变,从而使得第+29 位的丙氨酸由酪氨酸置换,并且第+104 位的亮氨酸由谷氨酸置换。突变型分子的免疫球蛋白部分可以被突变,从而使得第+130、+136 和+139 位的半胱氨酸由丝氨酸置换,并且+148 位的脯氨酸由丝氨酸置换。这种突变型分子在本文中被称作 L104EA29YIg (图 7, SEQ ID NOS: 3 和 4)。

L104EA29YIg 的另一实施方案是具有第-1位的丙氨酸到第+124 位的天冬氨酸的氨基酸序列,第+125 位的接头氨基酸残基谷氨酰胺,以及包含第+126 位的谷氨酸(例如+126 到第+357 位的赖氨酸或第+356 位的甘氨酸)的免疫球蛋白部分的突变型分子。具有 CTLA4 的细胞外结构域的部分被突变,从而使得第+29 位的丙氨酸由酪氨酸置换;并且第+104 位的亮氨酸由谷氨酸置换。突变型分子的免疫球蛋白部分可以被突变,从而使得第+130、+136 和+139 位的半胱氨酸由丝氨酸置换,并且+148 位的脯氨酸由丝氨酸置换。这种突变型分子在本文中被称作 L104EA29YIg (图 7, SEQ ID NOS: 3 和 4)。在信号序列已切割后, L104EA29YIg 可以起始于第+1 位的甲硫氨酸,或起始于第-1 位的丙氨酸。

本发明的另一种突变型分子是具有与人免疫球蛋白分子(例如铰链、CH2 和 CH3)连接的人 CTLA4 的细胞外结构域的可溶性 CTLA4 突变型分子。这种分子包括编码起始于第+1 位的甲硫氨酸到第+124

位的天冬氨酸的 CTLA4 的氨基酸序列部分, 第+125 位的接头氨基酸残基谷氨酰胺, 以及包含第+126 位的谷氨酸到第+357 位的赖氨酸或第+356 位的甘氨酸的氨基酸序列的免疫球蛋白部分。具有 CTLA4 的细胞外结构域的部分被突变, 从而使得第+104 位的亮氨酸由谷氨酸置换。突变型分子的铰链部分可以被突变, 从而使得第+130、+136 和 +139 位的半胱氨酸由丝氨酸置换, 并且+148 位的脯氨酸由丝氨酸置换。这种突变型分子在本文中称为 L104EIg (图 8, SEQ ID NOS: 5 和 6)。

可替代地, L104EIg 的一个实施方案是具有与人免疫球蛋白分子 (例如铰链、CH2 和 CH3) 连接的人 CTLA4 的细胞外结构域的可溶性 CTLA4 突变型分子。这种优选的分子包括包含起始于第 -1 位的丙氨酸到第+124 位的天冬氨酸的氨基酸序列的 CTLA4 部分, 第+125 位的接头氨基酸残基谷氨酰胺, 以及包含第+126 位的谷氨酸到第+357 位的赖氨酸或第+356 位的甘氨酸的免疫球蛋白部分。具有 CTLA4 的细胞外结构域的部分被突变, 从而使得第+104 位的亮氨酸由谷氨酸置换。突变型分子的铰链部分可以被突变, 从而使得第+130、+136 和 +139 位的半胱氨酸由丝氨酸置换, 并且+148 位的脯氨酸由丝氨酸置换。这种突变型分子在本文中称为 L104EIg (图 8, SEQ ID NOS: 5 和 6)。

此外, 本发明提供了可溶性 CTLA4 突变型分子, 其具有: (a) 与第二种氨基酸序列融合的, 膜糖蛋白例如 CD28、CD86、CD80、CD40 和 gp39 的第一种氨基酸序列, 其阻断 T 细胞增殖; (b) 是突变型 CTLA4 的细胞外结构域片段的第二种氨基酸序列, 其阻断 T 细胞增殖, 例如包括第+1 位的甲硫氨酸到第+124 位的天冬氨酸的氨基酸分子 (图 7, SEQ ID NOS: 3 和 4; 或图 8, SEQ ID NOS: 5 和 6); 和 (c) 第三种氨基酸序列, 其充当鉴别标记或增强分子的溶解度。例如, 第三种氨基酸序列可以基本上由非免疫原性的免疫球蛋白分子的铰链、CH2 和 CH3 区的氨基酸残基组成。合适的免疫球蛋白分子的例子包括但不限于, 人或猴免疫球蛋白, 例如 IgCγ1。其他同种型也是可能的。

本发明还提供了通过给受试者施用有效剂量的 CTLA4 突变型分子治疗与移植物移植有关的免疫病症的方法, 所述 CTLA4 突变型分

子具有如 SEQ ID NO: 8 中所示、起始于第 26 位的丙氨酸或第 27 位的甲硫氨酸且终止于第 150 位的天冬氨酸的 CTLA4 细胞外结构域或其部分。另外，在细胞外结构域或其部分中第 55 位的丙氨酸由酪氨酸置换，并且第 130 位的亮氨酸由谷氨酸置换。此外，施用方案包括早期方案，其中早期方案可以是移植后的前 3-6 个月且涉及最初比每月 1 次更频繁的施用。

另外，本发明提供了通过给受试者施用有效剂量的 CTLA4 突变型分子治疗与移植物移植有关的免疫病症的方法，所述 CTLA4 突变型分子具有 SEQ ID NO: 4 的起始于第 27 位的甲硫氨酸且终止于第 150 位的天冬氨酸的氨基酸序列，或 SEQ ID NO: 4 的起始于第 26 位的丙氨酸且终止于第 150 位的天冬氨酸的氨基酸序列。此外 CTLA4 突变型分子施用方案包括早期方案，其中早期方案可以是移植后的前 3-6 个月且涉及最初比每月 1 次更频繁的施用。

本发明进一步提供了包括编码氨基酸序列的核苷酸序列的核酸分子，所述氨基酸序列对应于本发明的可溶性 CTLA4 突变型分子。在一个实施方案中，核酸分子是 DNA（例如 cDNA）或其杂交体。可替代地，核酸分子是 RNA 或其杂交体。

另外，本发明提供了包括本发明的核苷酸序列的载体。还提供了宿主载体系统。宿主载体系统包括在合适的宿主细胞中的本发明载体。合适的宿主细胞的例子包括但不限于，原核和真核细胞。

本发明包括用于在与移植物移植有关的免疫病症治疗中使用的药物组合物，其包括药学有效剂量的可溶性 CTLA4 突变型分子。在某些实施方案中，与移植物移植有关的免疫病症由 CD28- 和/或 CTLA4- 阳性细胞与 CD80 和/或 CD86 阳性细胞的相互作用介导。可溶性 CTLA4 突变型分子优选是在 CTLA4 的细胞外结构域中具有一个或多个突变的 CTLA4 分子。药物组合物可以包括可溶性 CTLA4 突变型蛋白质分子和/或核酸分子，和/或编码所述分子的载体。在优选实施方案中，可溶性 CTLA4 突变型分子具有如图 7（SEQ ID NOS: 3 和 4）或 8（SEQ ID NOS: 5 和 6）中所示的 CTLA4 细胞外结构域的氨基酸序列，分别为 L104EA29Y 或 L104E。再更优选地，可溶性 CTLA4 突变型分子是如本文公开的 L104EA29YIg。组合物可以另外包括其他治疗剂，包括但不限于，药物 毒素、酶、抗体或缀合物。

药物组合物还优选包括合适的载体和佐剂，其包括当与本发明的分子（例如可溶性 CTLA4 突变型分子，例如 L104EA29Y 或 L104E）组合时保留分子的活性且与受试者的免疫系统不反应的任何材料。合适的载体和佐剂的例子包括但不限于，人血清清蛋白；离子交换剂；氧化铝；卵磷脂；缓冲物质，例如磷酸盐；甘氨酸；山梨酸；山梨酸钾；以及盐或电解质，例如硫酸鱼精蛋白。其他例子包括任何标准药理学载体例如磷酸缓冲盐水溶液；水；乳状液，例如油/水乳状液；以及各种类型的湿润剂。其他载体还可以包括无菌溶液；片剂，包括糖衣片剂和胶囊。一般地此类载体包含赋形剂，例如淀粉、乳、糖、某些类型的粘土、明胶、硬脂酸或其盐、硬脂酸镁或钙、滑石、植物脂肪或油、树胶、乙二醇、或其他已知的赋形剂。此类载体还可以包括食用香料或色料添加剂或其他成分。包括此类载体的组合物通过众所周知的常规方法进行配制。此类组合物还可以在各种脂质组合物例如脂质体以及各种聚合物组合物例如聚合物微球体内进行配制。

本发明的药物组合物可以使用常规施用方式给受试者施用，包括但不限于，静脉内（i.v.）施用，腹膜内（i.p.）施用，肌肉（i.m.）施用，皮下施用，经口施用，作为栓剂、或作为局部接触、或缓释装置例如微型渗透泵（miniosmotic pump）的植入施用。

本发明的药物组合物可以是各种剂型，其包括但不限于，液体溶液或悬浮液、片剂、丸剂、粉末、栓剂、聚合微型胶囊剂或微泡、脂质体、以及可注射或可输注的溶液。优选的形式取决于施用方式和治疗应用。

用于静脉内（i.v.）施用的本发明的一般药物组合物在下文列出。

冻干的 L104EA29YIg100mg/小瓶药物产品的组成

组分	量/小瓶（mg） ^a
L104EA29YIg	110 ^a
蔗糖	220
一代磷酸钠一水合物	15.18
氯化钠	2.55
1N 氢氧化钠	调整至 pH 7.5
1N 盐酸	调整至 pH 7.5

^a 每个小瓶包含对于重构溶液的小瓶、针及注射器容纳量的 10% 过满。

冻干的药物产品可以用水载体构建。本文的目的水载体是药学可接受的（对于给人的施用是安全且无毒的）且在冻干后对于液体制剂制备有用的水载体。一般地，冻干的药物产品用 10 ml 无菌注射用水，USP（SWFI）或 0.9% 氯化钠注射液，USP 构建为约 25 mg/ml。构建的溶液用 0.9% 氯化钠注射液，USP 进一步稀释至 1 - 10 mg/ml 的药物产品浓度。用于注射的稀释药物产品是等渗的且适合于通过静脉内输注施用。

表面活性剂可以加入制剂中，其量足以减少或预防构建的药物产品与硅化处理注射器的相互作用。

关于本发明组合物的最有效的施用方式和剂量方案取决于疾病的严重性和病程、患者的健康状态和对治疗的应答以及治疗医生的判断。因此，组合物的用量（也称为剂量）应当滴定给个别患者。

可溶性 CTLA4 突变型分子可以给受试者施用，其量、在时间段内的频率（例如，时间的长短和/或多次）足以阻断受试者中的内源性 B7（例如 CD80 和/或 CD86）分子结合其各自的配体。内源性 B7/配体结合的阻断从而抑制了 B7 阳性细胞（例如 CD80 - 和/或 CD86 - 阳性细胞）与 CD28 - 和/或 CTLA4 - 阳性细胞之间的相互作用。治疗剂的剂量取决于许多因素，包括但不限于，受影响的组织类型、治疗的与移植物移植有关的免疫病症的类型、疾病的严重性、受试者的健康状态以及受试者对试剂治疗的应答。

本发明的分子或药物组合物的剂量基于体重，并且施用方案可以由靶血清谷特征指定。一般地，在移植后的前 3 - 6 个月内约 3 µg/mL - 约 30 µg/mL 的本发明 CTLA4 突变型分子的靶谷血清浓度将足以维持同种异体移植物的功能，优选约 5 µg/mL - 约 20 µg/mL。一般地，在维持期过程中的本发明 CTLA4 突变型分子的靶谷血清浓度为约 0.2 µg/mL - 约 3 µg/mL，优选约 0.25 µg/mL - 约 2.5 µg/mL。

本发明的 CTLA4 突变型分子可以以约 0.1 - 约 20.0 mg/kg 患者重量的量施用，一般为约 1.0 - 约 15.0 mg/kg。例如，L104EA29Y 在早期 - 移植后的高危险期可以以 10 mg/kg 患者重量施用，并且对于维持剂量减少至 5 mg/kg 患者重量。

本发明的分子或药物组合物的施用可以经过各种时期进行。一般地，施用方案包括其中在最大的免疫学危险期过程中剂量较高且施用频率增加的早期，随后为维持期。早期方案可以是移植后的前 3-6 个月且涉及最初比每月 1 次更频繁的施用，取决于免疫学危险和/或靶谷血清浓度优选频繁至每天 1 次、每周 1 次或每 2 周 1 次。维持期在早期结束时开始且涉及不比每月 1 次更频繁的施用，并且持续所需的时间长度，一般为患者保留移植物的时间长度。如本文使用的，第 1 天定义为移植当天或用本发明的分子或药物组合物治疗的第一天。

早期中本发明的 CTLA4 突变型分子的剂量为约 8-约 12 mg/kg 患者重量，优选约 10 mg/kg。维持期中本发明的 CTLA4 突变型分子的剂量为约 3-约 7 mg/kg 患者重量，优选约 5 mg/kg。

早期可以是移植后的前 3-6 个月。在早期过程中的施用方案可以依受体和/或移植物的状态而变。例如，较加强的早期方案将在第 1 天、第 5 天、第 2 周就诊时（例如第 13-17 天）、随后对于前 3 个月每 2 周 1 次（例如，在第 4 周就诊、第 6 周就诊、第 8 周就诊、第 10 周就诊和第 12 周就诊时），随后为每月 1 次的施用到第 6 个月就诊（例如，在第 4 个月就诊、第 5 个月就诊和第 6 个月就诊时）施用较高剂量的本发明的分子或药物组合物。一般较加强的早期方案的例子是在第 1、5、15、29、43、57、71、85、113、141 和 169 天时施用 10mg/kg 患者重量的 L104EA29YIg。较不加强的方案，例如，将在第 1 天、第 2 周就诊、第 4 周就诊、随后为每月 1 次到第 3 个月就诊时施用本发明的分子或药物组合物。一般较不加强的早期方案的例子是在第 1、15、29、57 和 85 天时施用 10 mg/kg 患者重量的 L104EA29YIg。

一般地，早期随后为维持期，其中较低剂量的本发明的分子或药物组合物以 1-2 个月的时间间隔施用所需时间长度，一般为患者保留移植物的时间长度。关于上文描述的较加强方案的维持期例子包括起始于第 7 个月就诊每月施用 1 次 5 mg/kg 患者重量的 L104EA29YIg。同时关于较不加强方案的维持期例子将包括起始于第 4 个月就诊每月施用 1 次 5 mg/kg 患者重量的 L104EA29YIg。

可替代地，本领域技术人员将能够响应于患者的危险状态和/或响应于移植后的治疗修改施用方案。例如，上文描述的早期较不加强方

案可以修改为给方案添加第 5 天的施用，从而增加最大的免疫学危险期过程中的施用频率。

如本文使用的，“4 周”、“月”或“每月”指 28 ± 5 天的时间段。如本文使用的，“2 周”指 14 ± 3 天的时间段。

施用方案中的灵活性是促进移植受体生活中的施用时间安排所必需的，同时维持本发明的 CTLA4 突变型分子的靶谷特征。关于施用剂量的允许窗口如下：

就诊	就诊窗口
第 1 天和第 5 天	隔开 96 小时 $\pm$ 6 小时
第 2 周	靶日期 $\pm$ 2 天
第 4 周 - 第 6 个月	靶日期 $\pm$ 3 天
从第 7 个月后	靶日期 $\pm$ 5 天

靶日期是先前实际就诊日期加所需持续时间的结果。对于第 2 周就诊的所需持续时间是 10 天。对于计划离先前就诊为 2 周的就诊，所需持续时间是 14 天，例如第 6 周就诊在第 4 周就诊之后。对于计划离先前就诊为 1 个月或 4 周的就诊，所需持续时间是 28 天，例如第 4 个月的就诊在第 3 个月的就诊之后。对于计划离先前就诊为 2 个月的就诊，所需持续时间是 56 天，例如第 8 个月就诊在第 6 个月就诊之后。例如，第 15 天的实际就诊日期加 14 天产生第 29 天的第 4 周靶日期。基于上文的就诊窗口，施用可以在第 29 天 $\pm$ 3 天发生。如果施用发生在第 26 天，那么那天变成用于计算下一个靶日期的实际就诊日期。

低危险的急性排斥受体一般包括接受来自活相关供体的移植以及匹配良好的受体/供体的那些。高危险的急性排斥受体一般包括接受来自边缘供体的移植或再次移植，具有高系列反应性抗体或者是非裔美国人的那些。

除了中等危险的急性移植排斥之外，维持药物例如钙依赖磷酸酶抑制剂和类固醇经过长期的使用导致负面影响长期结果和患者生活质量的毒性。例如，维持药物的副作用包括导致肾功能衰退和/或移植物丢失的肾毒性（CAN），以及心血管和代谢疾病例如高血压、高脂

血症和糖尿病，其导致心血管疾病和死亡。另外的副作用包括多毛症（hirsutism）、秃头（alpecia）、牙龈增生、震颤、神经毒性和骨丢失，其导致不顺从和生活质量降低。本发明的分子或药物组合物在治疗与移植物移植有关的免疫病症，或治疗处于这些结果危险中的受试者中与移植物移植有关的免疫病症时，可以用于避免这些结果，减少这些结果的发生率、发展和/或进展。本发明的分子或药物组合物可以用于改善例如经由 GFR 测量的肾功能。

本发明的分子或药物组合物的施用可以经由 30 分钟至 1 个或更多小时的静脉内输注。可替代地，单至多次皮下注射可以递送所需剂量。一般地，当患者在医院和/或进行用于监控的健康护理专业人员的预定就诊时，30 分钟的静脉内输注是在治疗早期过程中使用的施用途径。皮下注射是在维持期过程中使用的一般施用方式，从而允许患者通过减少用于静脉内输注的健康护理专业人员的就诊回到其正常时间表。

本发明的可替代实施方案提供了用于治疗已接受移植后的可替代免疫抑制疗法的受试者中与移植物移植有关的免疫病症的方法。接受可替代药物免疫抑制疗法的受试者可以改变或转换或转变至包括本发明的分子或药物组合物的疗法，从而除去替代药物。一般地被除去的药物基于开处的那种特定药物的指导经过合适的时间段斜降（ramp down），同时本发明的分子或药物组合物比每月 1 次更频繁地施用。一旦受试者已完全脱离替代药物，受试者就可以回到使用本发明的分子或药物组合物的标准维持方案。例如，接受 CsA/MMF ± 皮质类固醇方案的受试者可以用 L104EA29YIg 转换 CsA 成为 L104EA29YIg/MMF±皮质类固醇方案。转变的施用时间表可以包括经过 2 个月斜降 CsA 的剂量，并在那 2 个月过程中每 2 周施用 5mg/kg L104EA29YIg。一旦 CsA 已除去，受试者随后就可以进入维持期并继续每 4 或 8 周接受 5mg/kg 用于在 CsA 不存在下治疗的持续。

一个实施方案提供了关于本文公开的可溶性 CTLA4 突变型分子的合适剂量，其有效用于阻断 B7 与其配体的相互作用和/或治疗免疫系统疾病。例如，剂量可以基于体重，并且施用方案可以由靶血清谷特征指定。例如，本文公开的可溶性 CTLA4 突变型分子治疗免疫系统疾病有效的靶谷血清浓度可以为约 0.2μg/mL - 约 30μg/mL。可替代

地,本文公开的可溶性CTLA4突变型分子可以以约0.1 - 约20.0 mg/kg患者体重的量施用以治疗免疫系统疾病。

本发明进一步提供了用于治疗与移植物移植有关的免疫病症的方法。在具体实施方案中,与移植物移植有关的免疫病症由CD28 - 和/或CTLA4 - 阳性细胞与CD80/CD86 - 阳性细胞的相互作用介导。在进一步的实施方案中,T细胞相互作用被抑制。这些方法包括给受试者施用本发明的可溶性CTLA4突变型分子,以调节T细胞与CD80 - 和/或CD86 - 阳性细胞的相互作用。与移植物移植有关的免疫病症的例子在上文讨论。

本发明进一步提供了用于预防或抑制或防止经受试者的实体器官、组织、细胞和/或外解剖学移植排斥,该受试者是实体器官、组织、细胞和/或外解剖学的移植受体。一般地,在移植中,移植物的排斥通过其被T细胞识别为异物开始,随后为破坏移植物的免疫应答。本发明的可溶性CTLA4突变型分子通过抑制T淋巴细胞增殖和/或细胞因子分泌可以导致组织破坏减少和抗原特异性T细胞无应答性的诱导,这可以导致长期移植物接受。

实施例3中描述的研究比较了在肾移植受体中用作由巴利昔单抗(Simulect[®]; Novartis)诱导、霉酚酸酯(MMF; CellCept[®]; Roche)和皮质类固醇组成的无CNI组合方案的部分时,L104EA29YIg作为维持免疫抑制剂与环孢菌素A(CsA)在12个月内的功效和安全性。目的包括在6个月和1年时评估急性排斥的发生率(活组织检查证实的或推测的);在1、6和12个月时经由碘海醇清除率测量的肾小球滤过率(GFR);高血压参数包括血清胆固醇和甘油三酯;和总体安全性。其他预先指定的分析包括在1年时患者死亡或移植物丢失;急性排斥的严重性;移植后糖尿病的发生率[定义为在以前不知道是糖尿病的患者中,高血糖症 ≥ 4 周,或血红蛋白A1C(HbA1c) $> 7\%$ 所需的任何治疗];使用肾病饮食调整(MDRD, Levey AS, Bosch JP, Lewis JP, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. Ann Intern Med 1999; 130:461 - 470), Jelliffe(RW. Creatinine clearance: Bedside estimate. Ann Intern Med. 1973; 79:604 - 605), Cockcroft - Gault

(Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 1976; 16:31 – 41) , 和 Nankivell (Nankivell BJ, Gruenewald SM, Allen RD, Chapman JR. Predicting glomerular filtration rate after kidney transplantation. *Transplantation*. 1995; 59 (12) :1683 – 1689) 公式计算的 GFR; 药物代谢动力学和免疫原性。急性排斥 (AR) 的诊断和治疗基于 Banff 97 标准和等级 (Racusen LC, Solez K, Colvin RB, 等人, The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; 55 (2) :713 – 23.) 。由此进行慢性同种异体移植物肾病 (CAN) 发生率的分析。

这项 12 个月的研究证实与 CsA 比较, 基于 L104EA29YIg 的维持疗法在防止 AR 以及类似的患者和移植物存活方面赋予等价的功效。此外, 与基于 CsA 的维持免疫抑制比较, L104EA29YIg 证实肾功能的显著改善和 CAN 的减少。L104EA29YIg 是安全和良好耐受的并且不伴随一般的 CNI 相关毒性。

在移植后第一年过程中改善的肾功能已显示与更佳的长期结果关联 (Hariharan S, McBride MA, Cherikh WS, Tolleris CB, Bresnahan BA, Johnson CP. Post – transplant renal function in the first year predicts long – term kidney transplant survival. *Kidney Int* 2002; 62 (1) :311 – 8) , 这是因为 CNIs 的长期使用受到其肾毒性的限制 (Danovitch GM. Immunosuppressive medications for renal transplantation: a multiple choice question. *Kidney Int* 2001; 59 (1) : 388 – 402) , 这导致具有所有其伴随问题的移植物功能减少和肾机能不全。因此, 用 L104EA29YIg 治疗观察到的最显著发现可能是与 CsA 比较与 12 个月的肾组织学偶联的较佳 GFRs, 其显示 CAN 发展和/或进展的减少。这是个令人惊讶的结果并且是这类发现首次已在免疫抑制疗法的随机化 II 期试验中显示。因为通过防止免疫学、心血管和/或代谢损伤保存肾单位量促成对患者和移植物存活的有利作用, 所以 L104EA29YIg 可能与较佳的长期结果有关。

这些问题对于来自扩大标准供体或受体的器官使用增加是特别重要的, 因为这些对 CNI 相关毒性特别易感。已经历肾移植的患者中 CV 和代谢事件的发生率减少对于改善长期结果也是关键的。

本发明的分子或药物组合物可以用于治疗受试者中与移植物移植有关的免疫病症,所述受试者是扩大标准受体和/或接受来自扩大标准供体的移植物的受体。这些标准部分基于由器官共享联合网(United Network of Organ Sharing)(UNOS)提出的标准,可以包括下列中的一个或多个:供体年龄小于10岁或大于或等于60岁;心源性死亡后的供体;供体器官的预期冷缺血时间大于或等于24小时;经历第1次移植当前PRA $\geq 50\%$,或经历再次移植PRA $\geq 30\%$ 的患者;在移植后的前6个月过程中由于急性排斥先前移植物丢失的受试者;使用供体淋巴细胞和受体血清的T细胞淋巴细胞毒性交叉配型阳性的受试者;具有HIV感染的受试者;在前3年内具有需要治疗的活动性结核的受试者;或由器官共享联合网(UNOS)提出的其他标准。关于供体和/或供体肾的可能扩大标准的例子包括关于器官捐赠的下列扩大标准中的至少一个:a)供体年龄 ≥ 60 岁或b)供体年龄50-59岁以及下列之一:(i)脑血管意外(CVA)+高血压+SCr > 1.5 mg/dL或(ii)CVA+高血压或(iii)CVA+SCr > 1.5 mg/dL或(iv)高血压+SCr > 1.5 mg/dL或c)CIT ≥ 24 小时,供体年龄 > 10 岁或d)心源性死亡的供体(无心跳供体)。

本发明还提供了用于抑制受试者中的移植物抗宿主病的方法。这种方法包括伴随或顺次地给受试者单独或连同与IL-2、IL-2R、IL-4或 γ 干扰素反应的进一步另外配体施用本发明可溶性CTLA4突变型分子。例如,本发明的可溶性CTLA4突变型分子可以施用于骨髓移植受体以抑制供体T细胞的同种反应性。可替代地,骨髓移植物内的供体T细胞可以在移植前对受体的同种异体抗原先体外后体内耐受化。

本发明的可溶性CTLA4突变型分子,例如L104EA29Y,可以作为唯一的活性成分或与免疫调谐方案中的一种或多种其他药物、免疫抑制剂和/或其他抗炎剂一起伴随或顺次施用,例如用于治疗、防止或抑制或预防同种异体移植物或异种移植物的急性或慢性排斥或诱导耐受性。例如,它可以与下列试剂组合使用:钙依赖磷酸酶抑制剂(例如环孢菌素A或FK506);免疫抑制性大环内酯(例如他克莫司、雷帕霉素、西罗莫司)或其衍生物(例如40-O-(2-羟基)乙基-雷帕霉素、西罗莫司、centican);淋巴细胞归巢剂(例如FTY720)

或其类似物 (FK778, Jak - 3), 皮质类固醇; 环磷酰胺; azathioprene; 氮甲蝶呤; 来氟洛米或其类似物; 咪唑立宾; 霉酚酸; 霉酚酸酯; 15 - deoxyspergualine 或其类似物; 针对白细胞受体 (例如, MHC、CD2、CD3、CD4、CD 11a/CD18、CD7、CD25、CD 27、B7、CD40、CD45、CD58、CD 137、ICOS、CD150 (SLAM)、OX40、4 - 1BB 或其配体) 的免疫抑制性单克隆抗体 (例如, 巴利昔单抗、达克珠单抗 (daclizumab))、配体、单克隆抗体或其抗体片段; 或其他免疫调谐化合物 (例如 CTLA4/CD28 - Ig), 或其他粘附分子抑制剂 (例如 mAbs) 或低分子量抑制剂包括 LFA - 1 拮抗剂、选择素拮抗剂和 VLA - 4 拮抗剂。该化合物与干扰 CD40 及其配体 (例如, 针对 CD40 的抗体或针对 CD40 - L 的抗体) 的化合物例如 Chi220 (美国专利 6,051,228) 组合, 例如在上述适应症例如耐受性的诱导中特别有用。

当本发明的可溶性 CTLA4 突变型分子与其他免疫抑制/免疫调谐疗法例如如本文说明的一起伴随或顺次施用, 共施用的免疫抑制剂或免疫调谐化合物的剂量当然将依采用的共同药物 (co - drug) 的类型例如它是类固醇还是环孢菌素、采用的具体药物、待治疗的状况等而变。

依照前述, 本发明进一步提供了例如用于在如上限定的任何方法中使用的治疗组合例如试剂盒, 其包括游离形式或药学可接受盐形式的 L104EA29YIg, 以用于与包括免疫抑制剂、免疫调谐剂或消炎药的至少一种药物组合物伴随或顺次使用。试剂盒可以包括关于其施用的说明书。

依照前述, 本发明在再进一步的方面提供了如上限定的方法, 其包括例如伴随或顺次共施用治疗有效剂量的本发明的可溶性 CTLA4 突变型分子与免疫抑制剂。免疫抑制剂包括可溶性 gp39 (也称为 CD40 配体 (CD40L)、CD154、T - BAM、TRAP), 可溶性 CD29, 可溶性 CD40, 可溶性 CD80 (例如 ATCC 68627), 可溶性 CD86, 可溶性 CD28 (例如 68628), 可溶性 CD56, 可溶性 Thy - 1, 可溶性 CD3, 可溶性 TCR, 可溶性 VLA - 4, 可溶性 VCAM - 1, 可溶性 LECAM - 1, 可溶性 ELAM - 1, 可溶性 CD44, 与 gp39 反应的配体、抗体或抗体片段 (例如 ATCC HB - 10916、ATCC HB - 12055 和 ATCC HB - 12056), 与 CD40 反应的配体、抗体或抗体片段 (例如 ATCC HB -

9110), 与 B7 反应的配体、抗体或抗体片段(例如 ATCC HB-253、ATCC CRL-2223、ATCC CRL-2226、ATCC HB-301、ATCC HB-11341 等), 与 CD28 反应的配体、抗体或抗体片段(例如 ATCC HB-11944 或如 Martin 等人(J. Clin. Immun. 4(1):18-22, 1980 描述的 mAb 9.3), 与 LFA-1 反应的配体、抗体或抗体片段(例如 ATCC HB-9579 和 ATCC TIB-213), 与 LFA-2 反应的配体、抗体或抗体片段, 与 IL-2 或 IL-2R 反应的配体、抗体或抗体片段, 与 IL-12 反应的配体、抗体或抗体片段, 与 IFN- γ 反应的配体、抗体或抗体片段, 与 CD2 反应的配体、抗体或抗体片段, 与 CD48 反应的抗体配体、抗体或抗体片段, 与任何 ICAM(例如 ICAM-1(ATCC CRL-2252), ICAM-2 和 ICAM-3)反应的配体、抗体或抗体片段, 与 CTLA4 反应的配体、抗体或抗体片段(例如, ATCC HB-304), 与 Thy-1 反应的配体、抗体或抗体片段, 与 CD56 反应的配体、抗体或抗体片段, 与 CD3 反应的配体、抗体或抗体片段, 与 CD29 反应的配体、抗体或抗体片段, 与 TCR 反应的配体、抗体或抗体片段, 与 VLA-4 反应的配体、抗体或抗体片段, 与 VCAM-1 反应的配体、抗体或抗体片段, 与 LECAM-1 反应的配体、抗体或抗体片段, 与 ELAM-1 反应的配体、抗体或抗体片段, 与 CD44 反应的配体、抗体或抗体片段。在某些实施方案中, 单克隆抗体是优选的。在其他实施方案中, 抗体片段是优选的。抗体片段包括但不限于 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv 和结构域抗体(dAbs), 包括但不限于 WO2006/030220 中描述的那些。如本领域技术人员容易理解的, 组合可以包括本发明的可溶性 CTLA4 突变型分子和 1 种其他免疫抑制剂, 可溶性 CTLA4 突变型分子和 2 种其他免疫抑制剂, 可溶性 CTLA4 突变型分子和 3 种其他免疫抑制剂等。最佳组合和剂量的确定可以使用本领域众所周知的方法确定和最优化。

一种特别有用的组合是 L104EA29YIg 或其药物组合物与干扰 IL-2 及其配体的化合物, 特别是针对在活化 T 淋巴细胞表面上选择性表达的 IL-2R(α)的拮抗剂。结合 IL-2R(α)的化合物竞争性抑制 IL-2 介导的淋巴细胞激活, 这是同种异体移植物排斥中涉及的细胞免疫应答的关键途径。

某些具体组合包括下列：L104EA29YIg 和 CD80 单克隆抗体 (mAbs)；L104EA29YIg 和 CD86 mAbs；L104EA29YIg、CD80 mAbs 和 CD86 mAbs；L104EA29YIg 和 gp39 mAbs；L104EA29YIg 和 CD40 mAbs；L104EA29YIg 和 CD28 mAbs；L104EA29YIg、CD80 和 CD86 mAbs 以及 gp39 mAbs；L104EA29YIg、CD80 和 CD86 mAbs 和 CD40 mAbs；和 L104EA29YIg、抗 - LFA1 mAb 和抗 - gp39 mAb。gp39 mAb 的具体例子是 MR1。其他组合也是本领域技术人员容易了解和理解的。

依照前述，本发明在再进一步的方面提供了如上限定的方法，其包括例如伴随或顺次共施用治疗有效剂量的本发明的可溶性 CTLA4 突变型分子与附加剂和/或皮质类固醇。目的是用本发明的 CTLA4 突变型分子代替毒性钙依赖磷酸酶抑制剂。然而，本发明的 CTLA4 突变型分子还可以与 CNIs 例如环孢菌素 (Neoral[®]，来自 Novartis 的 Sandimmune[®]) 和他克莫司 (FK506，来自 Fujisawa 的 Prograf[®]) 伴随或顺次共施用。

附加剂的例子包括但不限于肌苷一磷酸脱氢酶 (IMPDH) 的抑制剂，例如霉酚酸酯 (MMF；来自 Roche Laboratories 的 Cellcept[®]) 和霉酚酸 (来自 Novartis 的 Myfortic[®])；雷帕霉素 (西罗莫司，来自 Wyeth/Ayerst 的 Rapamune[®])；咪唑疏嘌呤 (来自 Salix 的 Azarsan[®]，Imuran[®]，一般的)；淋巴细胞归巢剂，例如 FTY720 (来自 Novartis)；FK778 (来自 Fujisawa)；Jak - 3 (来自 Pfizer)；和 Certican[®] (来自 Novartis 的依维莫司 (everolimus))。

皮质类固醇的例子包括但不限于，倍他米松、布地奈德、氢化可的松、可的松、地塞米松、hydrocortisone、甲基强的松龙、强的松龙、强的松和去炎松。

一般的共施用组合包括但不限于 L104EA29YIg 和选自上文列出的组的至少一种附加剂；L104EA29YIg 和选自上文列出的组的至少一种皮质类固醇；L104EA29YIg、MMF (来自 Roche 的 Cellcept) 和选自上文列出的组的一种皮质类固醇；L104EA29YIg、雷帕霉素 (西罗莫司，来自 Wyeth/Ayerst 的 Rapamune[®]) 含或不含选自上文列出的组的皮质类固醇。

上文描述的共施用组合可以与诱导剂例如免疫抑制性单克隆抗体一起使用，例如巴利昔单抗（来自 Novartis 的 Simulect[®]）、莫罗单抗（muromonab）（来自 Ortho Biotech 的 Orthoclone OKT3[®]）、利妥昔单抗（来自 Genentech 的 Rituxan[®]）和达克珠单抗（来自 Roche Labs 的 Zenapax[®]）；或抗胸腺细胞球蛋白（来自 SangStat 的 Thymoglobulin[®]）。例如，合适的组合包括但不限于巴利昔单抗（来自 Novartis 的 Simulect[®]）与 L104EA29YIg，MMF（来自 Roche 的 Cellcept）和强的松龙；或达克珠单抗（来自 Roche Labs 的 Zenapax[®]）、L104EA29YIg 和雷帕霉素（西罗莫司，来自 Wyeth/Ayerst 的 Rapamune[®]）。

一般地，上文描述的共施用药物的标准剂量和施用方案不受向治疗方案中加入本发明 CTLA4 突变型分子的影响。然而，由于向治疗方案中掺入较低毒性的本发明 CTLA4 突变型分子，本领域技术人员可以开处较低剂量的共施用药物，例如附加剂和/或皮质类固醇。

处方信息可以基于关于每种共施用药物的包装插页。皮质类固醇可以与本发明的分子或药物组合物共施用。例如，受试者可以用皮质类固醇每天治疗 1 次。一种类固醇维持和逐渐减少的策略可以包括在到达手术室（OR）时 500 mg 静脉内甲基强的松龙，在第 2 天时 250mg 静脉内甲基强的松龙，随后为在第 3 天时经口 100 mg 强的松（或强的松龙），随后为到第 2 周结束时逐渐减少至 20 - 30 mg/天的强的松（或强的松龙），随后为到第 6 个月逐渐减少至不低于 2.5 mg/天的强的松（或强的松龙）。受试者可以在其治疗过程中自始至终保持在至少 2.5 mg/天。

另外的共施用药物可以包括霉酚酸酯（MMF）。一般地 MMF 根据与时刻和膳食有关的一致时间表以 2 次分开的剂次施用。关于 MMF 的施用方案的例子包括每天 2g。第 1 剂可以在手术前施用。后续剂可以在受试者一能够耐受经口药物时就经口（p.o.）施用。剂次和时间表可以基于实验室值（例如减少的 WBCs）和受试者可容许性来调整。包装插页提供了完整的处方信息。

另一种共施用药物可以包括巴利昔单抗。重构的巴利昔单抗（溶于 5 mL 中的 20 mg）可以用生理盐水或葡萄糖 5% 稀释至 50 mL 的体积并且作为静脉内输注在 20 - 30 分钟内施用。第 1 次 20 mg 剂量可

以在第1天时（移植当天）施用。第2次20 mg剂量可以在第5天时给予。包装插页提供了完整的处方信息。

另外提供的是例如用于在如上限定的任何方法中使用的治疗组合例如试剂盒，其包括游离形式或药学可接受盐形式的L104EA29YIg，以用于与包括附加剂和皮质类固醇的至少一种药物组合物伴随或顺次使用。试剂盒可以包括关于其施用的说明书。

标签和/或说明书可以指出药物组合物可以单独或与第二种试剂组合伴随或顺次使用，以治疗选择的状况，例如如上所述的免疫系统疾病、自身免疫性疾病、免疫增生性疾病、与移植物移植有关的免疫病症。

标签可以指出关于本文公开的分子合适剂量。例如，标签可以指出对于阻断B7与其配体相互作用和/或治疗免疫系统疾病有效的分子剂量可以基于体重，并且施用方案可以由靶血清谷特征指出。例如，标签可以指出本文公开的CLTA4突变型分子治疗免疫系统疾病的有效靶谷血清浓度可以为约0.2 μ g/mL - 约30 μ g/mL。可替代地，标签可以指出本文公开的CLTA4突变型分子可以以约0.1 - 约20.0 mg/kg患者重量的量施用以治疗免疫系统疾病。

用于生产本发明分子的方法

CLTA4突变型分子的表达可以是在原核细胞中。最常见的原核生物由各种细菌菌株代表。细菌可以是革兰氏阳性或革兰氏阴性的。一般地，革兰氏阴性菌例如大肠杆菌（E.coli）是优选的。其他微生物菌株也可以使用。

编码CLTA4突变型分子的序列可以插入到设计用于在原核细胞例如大肠杆菌中表达外来序列的载体内。这些载体可以包括常用的原核控制序列，其在本文中定义为包括用于转录起始的启动子，任选含有操纵基因，连同核糖体结合位点序列，包括此类常用启动子如 β 内酰胺酶（青霉素酶）和乳糖（lac）启动子系统（Chang, 等人, (1977) *Nature* 198:1056），色氨酸（trp）启动子系统（Goeddel, 等人, (1980) *Nucleic Acids Res.* 8:4057）和 λ 衍生的P_L启动子和N基因核糖体结合位点（Shimatake, 等人, (1981) *Nature* 292:128）。

此类表达载体还将包括复制起点和选择标记,例如赋予抗生素抗性的 β 内酰胺酶或新霉素磷酸转移酶基因,从而使得载体可以在携带质粒的细菌和细胞中复制,当在抗生素例如氨苄青霉素或卡那霉素的存在下生长时可以选择。

表达质粒可以经由各种标准方法引入原核细胞内,包括但不限于 CaCl_2 休克(Cohen, (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2110,和 Sambrook 等人, (eds.), “*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*”, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, (1989))和电穿孔。

依照本发明的实践,真核细胞也是合适的宿主细胞。真核细胞的例子包括无论是原代还是无限增殖化的任何动物细胞,酵母(例如啤酒糖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖糖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)和巴斯德毕赤氏酵母(*Pichia pastoris*)),和植物细胞。骨髓瘤、COS和CHO细胞是可以用作宿主的动物细胞的例子。具体的CHO细胞包括但不限于,DG44(Chasin, 等人, 1986 *Som. Cell. Molec. Genet.* 12:555-556; Kolkekar 1997 *Biochemistry* 36: 10901-10909), CHO-K1(ATCC No. CCL-61), CHO-K1 Tet-On 细胞系(Clontech), 称为 ECACC 85050302 的 CHO(CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), CHO 克隆 13(GEIMG, Genova, IT), CHO 克隆 B(GEIMG, Genova, IT), 称为 ECACC 93061607 的 CHO-K1/SF(CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), 以及称为 ECACC 92052129 的 RR-CHOK1(CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK)。示例性植物细胞包括烟草(完整植物、细胞培养物或愈伤组织)、玉米、大豆和稻细胞。玉米、大豆和稻种子也是可接受的。

编码 CTLA4 突变型分子的核酸序列也可以插入到设计用于在真核宿主中表达外来序列的载体内。载体的调节元件可以根据具体的真核宿主而变。

用于在表达载体中使用的常用真核控制序列包括与哺乳动物细胞相容的启动子和控制序列,例如,CMV 启动子(CDM8 载体)和鸟类肉瘤病毒(ASV)(π LN 载体)。其他常用的启动子包括来自猿猴病毒 40(SV40)的早期和晚期启动子(Fiers, 等人, (1973) *Nature* 273: 113), 或其他病毒启动子例如来源于多瘤、腺病毒 2 和牛乳头

瘤病毒的那些。诱导型启动子例如 hMTII(Karin, 等人, (1982) *Nature* 299: 797 - 802) 也可以使用。

用于在真核生物中表达 CTLA4 突变型分子的载体也可以携带称为增强子区的序列。这些在基因表达最优化中是重要的并且在启动子区的上游或下游找到。

用于真核宿主细胞的表达载体的例子包括但不限于用于哺乳动物宿主细胞的载体 (例如 BPV - 1, pHyg, pRSV, pSV2, pTK2 (Maniatis); pIRES (Clontech); pRc/CMV2, pRc/RSV, pSFV1 (Life Technologies); pVPack 载体, pCMV 载体, pSG5 载体 (Stratagene)), 逆转录病毒载体 (例如 pFB 载体 (Stratagene)), pCDNA - 3 (Invitrogen) 或其修饰形式, 腺病毒载体; 腺伴随病毒载体, 杆状病毒载体, 酵母载体 (例如 pESC 载体 (Stratagene)) 。

编码 CTLA4 突变型分子的核酸序列可以整合到真核宿主细胞的基因组内并且当宿主基因组复制时进行复制。可替代地, 携带 CTLA4 突变型分子的载体可以包含允许染色体外复制的复制起点。

对于在啤酒糖酵母中表达核酸序列, 可以使用来自内源性酵母质粒的复制起点 - 2 μ 环。 (Broach, (1983) *Meth. Enz.* 101:307) 。可替代地, 可以使用能够促进自主复制的来自酵母基因组的序列 (参见, 例如, Stinchcomb 等人, (1979) *Nature* 282:39); Tschemper 等人, (1980) *Gene* 10:157; 以及 Clarke 等人, (1983) *Meth. Enz.* 101:300) 。

关于酵母载体的转录控制序列包括用于合成糖酵解酶的启动子 (Hess 等人, (1968) *J. Adv. Enzyme Reg.* 7:149; Holland 等人, (1978) *Biochemistry* 17:4900) 。本领域已知的另外启动子包括 CDM8 载体中提供的 CMV 启动子 (Toyama 和 Okayama, (1990) *FEBS* 268:217 - 221) ; 用于 3 - 磷酸甘油酸激酶的启动子 (Hitzeman 等人, (1980) *J. Biol. Chem.* 255:2073) , 以及用于其他糖酵解酶的那些。

其他启动子是诱导型的因为它们可以通过细胞的环境刺激或生长培养基来调节。这些诱导型启动子包括来自关于热激蛋白、醇脱氢酶 2、异细胞色素 (isocytochrome) C、酸性磷酸酶、与氮分解代谢有关的酶、以及负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的基因的那些。

调节序列还可以被置于编码序列的 3' 末端。这些序列可以用于稳定信使 RNA。此类终止子在几种酵母来源的和哺乳动物基因中编码序列后的 3' 非翻译区内找到。

关于植物和植物细胞的示例性载体包括但不限于，土壤杆菌属 (*Agrobacterium*) T_i 质粒、花椰菜花叶病毒 (CaMV) 和番茄金黄花叶病毒 (TGMV)。

哺乳动物细胞宿主系统转化的一般方面已由 Axel 描述 (1983 年 8 月 16 日授权的美国专利号 4,399,216)。哺乳动物细胞可以通过下列方法转化，包括但不限于在磷酸钙的存在下转染、显微注射、电穿孔或经由使用病毒载体的转导。

用于将外来 DNA 序列引入植物和酵母基因组内的方法包括 (1) 机械法，例如将 DNA 显微注射到单细胞或原生质体内，在 DNA 的存在下使细胞与玻璃珠一起涡旋，或将 DNA 包被的钨或金球体射入细胞或原生质体；(2) 通过经由聚乙二醇处理或实施高压电脉冲 (电穿孔) 使细胞膜对大分子可渗透而引入 DNA；或 (3) 使用与细胞膜融合的脂质体 (包含 cDNA)。

CTLA4 突变型分子的表达可以通过本领域已知的方法来检测。例如，突变型分子可以通过考马斯染色 SDS-PAGE 凝胶和使用结合 CTLA4 的抗体的免疫印迹来检测。蛋白质回收可以使用标准蛋白质纯化方法例如亲和层析或离子交换层析进行，以产生基本上纯的产物 (R. Scopes: "*Protein Purification, Principles and Practice*", Third Edition, Springer-Verlag (1994))。

美国专利申请美国公开号 2005/0019859、2005/0084933 和 WO 04/058944 教导了通过动物或哺乳动物细胞培养用于生产本发明的蛋白质，特别是重组糖蛋白产物的方法，并引入本文作为参考。

本发明进一步提供了本文上文生产的可溶性 CTLA4 突变型分子。

基于 CTLA4Ig 密码子的诱变

在一个实施方案中，使用定点诱变和新型筛选操作来鉴别 CTLA4 细胞外结构域中改善对于 CD86 的结合抗体亲抗原性的几种突变。在这个实施方案中，突变在丝氨酸 25 至精氨酸 33 的 CTLA4 细胞外结构域区内、C' 链 (丙氨酸 49 和苏氨酸 51)、F 链 (赖氨酸 93、谷氨

酸 95 和亮氨酸 96)，以及甲硫氨酸 97 到酪氨酸 102、酪氨酸 103 到甘氨酸 107 区内，以及 G 链中谷氨酰胺 111、酪氨酸 113 和异亮氨酸 115 位上的残基中进行。这些位点基于嵌合 CD28/CTLA4 融合蛋白的研究（Peach 等人，*J. Exp. Med.*，1994，180:2049 - 2058），以及预测哪个氨基酸残基侧链将是溶剂暴露的模型且在 CD28 和 CTLA4 之间的某些位置上缺乏氨基酸残基同一性或同源性选择。同样地，在空间上紧密接近于（5 - 20 埃单位）被鉴别残基的任何残基都视为本发明的部分。

为了合成并筛选对于 CD80 和/或 CD86 亲和力改变的可溶性 CTLA4 突变型分子，采用 2 步策略。实验需要首先产生在 CTLA4 细胞外部分的特定密码子上的突变文库，并随后通过 BIAcore 分析筛选这些，以鉴别对于 CD80 或 CD86 反应性改变的突变。Biacore 测定系统（Pharmacia, Piscataway, N.J.）使用表面等离子共振检测器系统，其基本上涉及 CD80Ig 或 CD86Ig 与位于检测器内的葡聚糖包被的传感器芯片的共价结合。测试分子随后可以注射到包含传感器芯片的室内并且结合的互补蛋白质的量可以基于分子量中的变化进行评估，所述分子量与传感器芯片的葡聚糖包被侧物理关联；分子量中的变化可以通过检测器系统进行测量。

本发明的优点

因为 CTLA4 与 CD80 和 CD86 结合的特征在于快速“结合（on）”速率和快速解离（“解离（off）”）速率，并且因为 CTLA4Ig - CD86 复合物的解离为 CTLA4Ig - CD80 复合物的大约 5 - 8 倍，所以推断 CTLA4Ig 从 CD80 和/或 CD86 解离的速率减慢将导致具有更有效的免疫抑制特性的分子。因此，与野生型 CTLA4 或非突变形式的 CTLA4Ig 比较，对于 CD80 - 或 CD86 - 阳性细胞抗体亲抗原性更高的可溶性 CTLA4 突变型分子预期比野生型 CTLA4 或非突变形式的 CTLA4Ig 更有效地阻断抗原特异性活化细胞的启动。

实施例

呈现下列实施例以举例说明本发明并帮助本领域技术人员制备并使用其。实施例不希望以任何方式在其他方面限制本发明的范围。

实施例 1

这个实施例提供了用于产生编码本发明可溶性 CTLA4 突变型分子的核苷酸序列的方法描述。产生单位点突变体 L104EIg 并测试对于 CD80 和/或 CD86 的结合动力学。将 L104EIg 核苷酸序列用作模板以产生双位点突变体 CTLA4 序列 L104EA29YIg, 测试其对于 CD80 和/或 CD86 的结合动力学。

基于 CTLA4Ig 密码子的诱变

开发一种诱变和筛选策略以鉴别从 CD80 和/或 CD86 分子解离的速率 (“解离”速率) 较慢的突变型 CTLA4Ig 分子。使用 CTLA4Ig (美国专利号: 5,844,095; 5,851,795; 和 5,885,796; ATCC 登记号 68629) 作为模板产生单位点突变体的核苷酸序列。诱变寡核苷酸 PCR 引物被设计为通过允许密码子的第 1 和 2 位上是任何碱基, 但第 3 位只是鸟嘌呤或胸腺嘧啶 (XXG/T; 也称为 NNG/T) 用于特定 cDNA 密码子的随机诱变。以这种方式, 编码氨基酸的特定密码子可以被随机突变以编码 20 种氨基酸中的每一种。在那点上, XXG/T 诱变产生编码 20 种氨基酸中的每一种的 32 种可能密码子。编码紧密接近于 CTLA4Ig 的 -M97-G107 的突变的 PCR 产物 (参见图 7, SEQ ID NOS: 3 和 4; 或图 8, SEQ ID NOS: 5 和 6) 用 SacI/XbaI 消化并亚克隆到类似切割的 CTLA4Ig π LN (也称为 piLN) 表达载体内。这种方法用于产生单位点 CTLA4 突变型分子 L104EIg (图 8, SEQ ID NOS: 5 和 6)。

对于接近于 CTLA4Ig 的 S25-R33 的诱变, 首先通过 PCR 引物指导的诱变向这个环的 5' 引入沉默 NheI 限制位点。将 PCR 产物用 NheI/XbaI 消化并亚克隆到类似切割的 CTLA4Ig 或 L104EIg 表达载体内。这种方法用于产生双位点 CTLA4 突变型分子 L104EA29YIg (图 7, SEQ ID NOS: 3 和 4)。具体地, 编码单位点 CTLA4 突变型分子 L104EIg 的核酸分子用作模板以产生双位点 CTLA4 突变型分子 L104EA29YIg。具有 L104EA29YIg 的 piLN 载体在图 12 中显示。

实施例 2

下文提供了用于鉴别由实施例 1 中所述构建体表达的单和双位点突变型 CTLA4 多肽的筛选方法描述, 与非突变的 CTLA4Ig 分子比较其显示出对于 CD80 和 CD86 抗原更高的结合抗体亲抗原性。

目前的体外和体内研究指出 CTLA4Ig 自身不能完全阻断抗原特异性活化 T 细胞的启动。使用 CTLA4Ig 以及对 CD80 或 CD86 特异的单克隆抗体测量 T 细胞增殖抑制的体外研究指出抗 CD80 单克隆抗体不增加 CTLA4Ig 抑制。然而, 抗 CD86 单克隆抗体的确增加抑制, 从而表明 CTLA4Ig 在阻断 CD86 相互作用方面不够有效。这些数据支持 Linsley 等人, (*Immunity*, (1994), 1:793 - 801) 的早期发现, 其显示 CD80 介导的细胞应答的抑制需要为对于 CD86 介导的应答的大约 1/100 的 CTLA4Ig 浓度。基于这些发现, 推测具有对于 CD86 的抗体亲抗原性比野生型 CTLA4 更高的可溶性 CTLA4 突变型分子应当能够比 CTLA4Ig 更好地阻断抗原特异性活化细胞的启动。

为此, 使用新型筛选方法筛选上文实施例 1 中描述的可溶性 CTLA4 突变型分子, 以鉴别 CTLA4 细胞外结构域中改善对于 CD80 和 CD86 的结合抗体亲抗原性的几种突变。这种筛选策略提供了无需蛋白质纯化或定量而直接鉴别具有明显较慢的“解离”速率的突变体的有效方法, 因为“解离”速率测定是浓度依赖性的 (O'Shannessy 等人, (1993) *Anal. Biochem.*, 212:457 - 468)。

COS 细胞用单个小量制备纯化的质粒 DNA 转染并繁殖几日。将 3 天条件培养基施加于由可溶性 CD80Ig 或 CD86Ig 包被的 BIAcore 生物传感器芯片 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, 瑞典)。突变蛋白的特异性结合和解离通过表面等离子共振测量 (O'Shannessy, D. J., 等人, (1993) *Anal. Biochem.* 212:457 - 468)。所有实验都于 25 °C 在 BIAcore™ 或 BIAcore™ 2000 生物传感器上进行。配体使用标准 N - 乙基 - N' (二甲氨基丙基) 碳二亚胺 - N - 羧基琥珀酰亚胺偶联固定在研究级 NCM5 传感器芯片 (Pharmacia) 上 (Johnsson, B., 等人, (1991) *Anal. Biochem.* 198: 268 - 277; Khilko, S.N., 等人 (1993) *J. Biol. Chem.* 268:5425 - 15434)。

筛选方法

在 24 孔组织培养板中生长的 COS 细胞用编码突变型 CTLA4Ig 的 DNA 瞬时转染。3 天后收集包含分泌的可溶性突变型 CTLA4Ig 的培养基。

允许 COS 细胞的条件培养基流经用 CD86Ig 或 CD80Ig 衍生化的 BIAcore 生物传感器芯片（如 Greene 等人，1996 *J. Biol. Chem.* 271:26762 - 26771 中描述的），并且鉴别具有比对于野生型 CTLA4Ig 观察到的那种更慢的“解离”速率的突变型分子。测序对应于所选培养基样品的 cDNAs 并且制备 DNA 以进行大规模的 COS 细胞瞬时转染，在培养基的 A 蛋白纯化后由其制备突变型 CTLA4Ig 蛋白质。

如 J. Greene 等人，1996 *J. Biol. Chem.* 271:26762 - 26771 中所述，并如本文所述进行 BIAcore 分析条件和平衡结合数据分析。

BIAcore 数据分析

传感图（Sensogram）基线在分析前对零应答单位（RU）进行标准化。样品经过模拟衍生化的流动室以测定由于溶液之间的体积折光指数差异的背景应答单位（RU）值。平衡解离常数（ K_d ）由 R_{eq} 对 C 的图计算，其中 R_{eq} 是稳定状态的应答减去对模拟衍生化的芯片的应答，并且 C 是分析物的摩尔浓度。结合曲线使用商业非线性曲线拟合软件（Prism, GraphPAD Software）分析。

实验数据首先对单配体结合单受体的模型拟合（1 位点模型，即简单朗格缪尔系统， $A+B \leftrightarrow AB$ ），并且平衡解离常数（ $K_d = [A] \cdot [B] / [AB]$ ）由等式 $R = R_{max} \cdot C / (K_d + C)$ 计算。随后，数据对最简单的 2 位点配体结合模型拟合（即，如等式 $R = R_{max1} \cdot C / (K_{d1} + C) + R_{max2} \cdot C / (K_{d2} + C)$ 描述的具有 2 个非相互作用的独立结合位点的受体）。

这 2 个模型的拟合优度通过比较实验数据在视觉上以及通过平方和的 F 检验在统计学上分析。选择较简单的单位点模型作为最佳拟合，除非 2 位点模型拟合明显更佳（ $p < 0.1$ ）。

使用 BIA 评估 2.1 Software (Pharmacia) 进行结合和解离分析。结合速率常数 k_{on} 以 2 种方式计算，假定同质单位点相互作用和平行的 2 位点相互作用。对于单位点相互作用， k_{on} 值根据等式 $R_t = R_{eq} (1 - \exp^{-k_s(t-t_0)})$ 计算，其中 R_t 是在给定时间 t 的应答； R_{eq} 是稳定状态

的应答； t_0 是注射开始时的时间；以及 $k_s = dR/dt = k_{on} \cdot C k_{off}$ ，并且其中 C 是分析物的浓度，根据单体结合位点计算。对于 2 位点相互作用， k_{on} 值根据等式 $R_t = R_{eq1} (1 - \exp^{-k_{s1}(t-t_0)}) + R_{eq2} (1 - \exp^{-k_{s2}(t-t_0)})$ 计算。对于每种模型， k_{on} 值由 k_s 对 C 的图计算的斜率（至约 70% 的最大结合）测定。

解离数据根据单位点 ($AB=A+B$) 或 2 位点 ($A_iB_j=A_i+B_j$) 模型分析，并且速率常数 (k_{off}) 由最佳拟合曲线计算。使用结合位点模型，除了残留比机器背景 (2–10 RU，根据机器) 更高时，在这种情况下使用 2 结合位点模型。受体占有的半衰期使用关系 $t_{1/2} = 0.693/k_{off}$ 计算。

流式细胞术

鼠类 mAb L307.4 (抗 CD80) 购自 Becton Dickinson (San Jose, California) 并且 IT2.2 (抗 B7-0 [也称为 CD86]) 购自 Pharmingen (San Diego, California)。对于免疫染色，CD80 阳性和/或 CD86 阳性的 CHO 细胞通过在包含 10mM EDTA 的磷酸缓冲盐水 (PBS) 中温育从其培养瓶中取出。CHO 细胞 ($1-10 \times 10^5$) 首先在包含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 中与 mAbs 或免疫球蛋白融合蛋白温育，随后洗涤并与异硫氰酸荧光素缀合的山羊抗小鼠或抗人免疫球蛋白第二步试剂 (Tago, Burlingame, California) 温育。对细胞给予最终洗涤并在 FACSscan (Becton Dickinson) 上分析。

SDS-PAGE 和大小排阻层析

SDS-PAGE 在 Tris/甘氨酸 4–20% 丙烯酰胺凝胶 (Novex, San Diego, CA) 上进行。分析型凝胶用考马斯蓝染色，并通过数字扫描获得湿凝胶的图像。CTLA4Ig (25 μ g) 和 L104EA29YIg (25 μ g) 通过大小排阻层析使用在包含 0.02% NaN_3 的磷酸缓冲盐水中平衡的 TSK-GEL G300 SW_{XL} 柱 (7.8 x 300mm, Tosohaas, Montgomeryville, PA) 以 1.0 ml/分钟的流速进行分析。

CTLA4X_{C120S} 和 L104EA29YX_{C120S}

单链 CTLA4X_{C120S} 如先前所述进行制备 (Linsley 等人, (1995) J. Biol. Chem., 270:15417 - 15424)。简言之, 制瘤素 M CTLA4 (OMCTLA4) 表达质粒用作模板, 选择正向引物

GAGGTGATAAAGCTTCACCAATGGGTGTACTGCTCACACAG

以匹配载体中的序列; 并且反向引物

GTGGTGTATTGGTCTAGATCAATCAGAATCTGGGCACGGTTC

对应于 CTLA4 的细胞外结构域中的最后 7 个氨基酸 (即氨基酸 118 - 124), 并且包含限制酶位点和终止密码子 (TGA)。反向引物限定 C120S (第 120 位的半胱氨酸至丝氨酸) 突变。具体地, 上文所示反向引物的核苷酸序列 GCA (核苷酸 34 - 36) 由下列核苷酸序列之一代替: AGA、GGA、TGA、CGA、ACT 或 GCT。如本领域技术人员将理解的, 核苷酸序列 GCA 是关于半胱氨酸的密码子 TGC 的反向互补序列。类似地, 核苷酸序列 AGA、GGA、TGA、CGA、ACT 或 GCT 是关于丝氨酸的密码子的反向互补序列。聚合酶链反应产物用 *HindIII/XbaI* 消化并直接亚克隆到表达载体 π LN (Bristol - Myers Squibb Company, Princeton, NJ) 内。以相同方式制备 L104EA29YX_{C120S}。每种构建体通过 DNA 测序验证。

高抗体亲抗原性突变体的鉴别和生物化学表征

选择 24 个氨基酸用于诱变并通过表面等离子共振 (SPR; 如上所述) 分析所得到的 ~2300 种突变蛋白的 CD86Ig 结合。每个位点上的诱变的占优势作用概括于表 II 中。S25 - R33 中某些氨基酸的随机诱变显然不改变配体结合。E31 和 R33 以及残基 M97 - Y102 的诱变显然导致配体结合减少。残基 S25、A29 和 T30、K93、L96、Y103、L104 和 G105 的诱变导致具有缓慢“结合”和/或缓慢“解离”速率的蛋白质。这些结果证实先前发现: S25 - R33 区内的残基, 以及 M97 - Y102 中或附近的残基影响配体结合 (Peach 等人, (1994) J. Exp. Med., 180:2049 - 2058)。

位点 S25、T30、K93、L96、Y103 和 G105 的诱变导致鉴别从 CD86Ig “解离”速率较慢的某些突变蛋白。然而，在这些情况下，缓慢的“解离”速率被缓慢的“结合”速率折衷，这导致具有对于 CD86Ig 的总体抗体亲抗原性的突变蛋白，这显然类似于由野生型 CTLA4Ig 观察到的那种。此外，K93 的诱变导致显著聚集，这可能已负责观察到的动力学变化。

L104 的随机诱变随后为 COS 细胞转染，并且培养基样品经过固定化的 CD86Ig 的 SPR 筛选产生包含突变蛋白的 6 种培养基样品，所述突变蛋白具有为野生型 CTLA4Ig 的大约 1/2 的“解离”速率。当对这些突变体的相应 cDNA 进行测序时，发现每种都编码亮氨酸至谷氨酸的突变（L104E）。显然亮氨酸 104 至天冬氨酸的置换（L104D）不影响 CD86Ig 结合。

随后如上所述在表 II 中列出的每个位点上重复诱变，这次使用 L104E 代替野生型 CTLA4Ig 作为 PCR 模板。再次使用固定化的 CD86Ig 的 SPR 分析鉴别来自丙氨酸 29 诱变的 6 个培养基样品，其具有为野生型 CTLA4Ig 的大约 1/4 的“解离”速率的蛋白质。最慢的 2 种是酪氨酸置换（L104EA29Y），2 种是亮氨酸（L104EA29L），1 种是色氨酸（L104EA29W），并且 1 种是苏氨酸（L104EA29T）。显然当丙氨酸 29 在野生型 CTLA4Ig 中单独随机突变时，没有鉴别出缓慢“解离”速率的突变体。

纯化的 L104E 和 L104EA29YIg 的相对分子量和聚集状态通过 SDS - PAGE 和大小排阻层析评估。L104EA29YIg（~1 μg；泳道 3）和 L104EIg（~1 μg；泳道 2）在还原（~50kDa；+βME；加 2-巯基乙醇）和非还原（~100kDa；-βME）条件下显然具有与 CTLA4Ig（~1 μg；泳道 1）相同的电泳迁移率（图 10A）。大小排阻层析证实 L104EA29YIg（图 10C）显然具有与二聚 CTLA4Ig（图 10B）相同的迁移率。主峰代表蛋白质二聚物，而图 10B 中较快洗脱的次峰代表较高分子量的聚集物。大约 5.0% 的 CTLA4Ig 呈现为较高分子量的聚集物，但没有 L104EA29YIg 或 L104EIg 聚集的证据。因此，对于 L104EIg 和 L104EA29YIg 观察到的与 CD86Ig 的较强结合不能归因于由诱变诱导的聚集。

平衡和动态结合分析

使用表面等离子共振(SPR)对 A 蛋白纯化的 CTLA4Ig、L104EIg 和 L104EA29YIg 进行平衡和动态结合分析。结果显示于表 I 中。

表 I
平衡和表观动力学常数

固定化的蛋白质	分析物	$k_{on} (\times 10^5) M^{-1} S^{-1}$	$k_{off} (\times 10^{-3}) S^{-1}$	K_d nM
CD80Ig	CTLA4Ig	3.44 ± 0.29	2.21 ± 0.18	6.51 ± 1.08
CD80Ig	L104EIg	3.02 ± 0.05	1.35 ± 0.08	4.47 ± 0.36
CD80Ig	L104EA29YIg	2.96 ± 0.20	1.08 ± 0.05	3.66 ± 0.41
CD80Ig	CTLA4X _{C120S}	12.0 ± 1.0	230 ± 10	195 ± 25
CD80Ig	L104EA29YX _{C120S}	8.3 ± 0.26	71 ± 5	85.0 ± 2.5
CD86Ig	CTLA4Ig	5.95 ± 0.57	8.16 ± 0.52	13.9 ± 2.27
CD86Ig	L104EIg	7.03 ± 0.22	4.26 ± 0.11	6.06 ± 0.05
CD86Ig	L104EA29YIg	6.42 ± 0.40	2.06 ± 0.03	3.21 ± 0.23
CD86Ig	CTLA4X _{C120S}	16.5 ± 0.5	840 ± 55	511 ± 17
CD86Ig	L104EA29YX _{C120S}	11.4 ± 1.6	300 ± 10	267 ± 29

(值是来自 3 次不同实验的平均值 $\pm$ 标准差)

观察到的平衡解离常数 (K_d ; 表 I) 由经过一定浓度范围 (5.0 – 200 nM) 产生的结合曲线来计算。L104EA29YIg 比 L104EIg 或 CTLA4Ig 更强烈地结合 CD86Ig。L104EA29YIg (3.21 nM) 比 L104EIg (6.06 nM) 或 CTLA4Ig (13.9 nM) 更低的 K_d 表明 L104EA29YIg 与 CD86Ig 更高的结合抗体亲抗原性。L104EA29YIg (3.66 nM) 比 L104EIg (4.47 nM) 或 CTLA4Ig (6.51 nM) 更低的 K_d 表明 L104EA29YIg 与 CD80Ig 更高的结合抗体亲抗原性。

动态结合分析揭示关于 CTLA4Ig、L104EIg 和 L104EA29YIg 结合 CD80 的比较“结合”速率是类似的, 关于 CD86Ig 的“结合”速率(表 I) 也一样。然而, 关于这些分子的“解离”速率并不相等(表 I)。与 CTLA4Ig 比较, L104EA29YIg 从 CD80Ig “解离”的速率为大约 1/2, 并且从 CD86Ig “解离”的速率为大约 1/4。L104E 具有在 L104EA29YIg 和 CTLA4Ig 中间的“解离”速率。因为这些突变的引入没有明显地影响“结合”速率, 所以由 L104EA29YIg 观察到的对于 CD80Ig 和 CD86Ig 的抗体亲抗原性增加很可能主要是由于“解离”速率减少。

为了确定 L104EA29YIg 对于 CD86Ig 和 CD80Ig 的抗体亲抗原性增加是由于突变影响每种单体结合为二聚物的方式, 还是有抗体亲抗

原性增强性结构变化引入每种单体中，如上文以及 Linsley 等人，（1995）J. Biol. Chem., 270:15417 - 15424 所述，将半胱氨酸 120 诱变至丝氨酸后制备 CTLA4 和 L104EA29Y 细胞外结构域的单链构建体。在其配体结合特性通过 SPR 分析前，纯化蛋白质 CTLA4X_{C120S} 和 L104EA29YX_{C120S} 通过凝胶渗透层析显示是单体的（Linsley 等人，（1995），同上）。结果显示 2 种单体蛋白质对于 CD86Ig 的结合亲和力为对于其分别的二聚物观察到的大约 1/80 - 1/35（表 I）。这支持先前公布的数据，其确定 CTLA4 的二聚作用对于高抗体亲抗原性配体结合是必需的（Greene 等人，（1996）J. Biol. Chem., 271:26762 - 26771）。

L104EA29YX_{C120S} 以为 CTLA4X_{C120S} 的大约 2 倍的亲和力结合 CD80Ig 和 CD86Ig。增加的亲和力是由于从两种配体解离的大约 1/3 的速率。因此，经由 L104EA29Y 的较强配体结合最可能是由于已引入每种单体链内的抗体亲抗原性增强性结构变化而不是其中分子二聚化的改变。

抗体亲抗原性增强性突变的定位和结构分析

CTLA4 的细胞外 IgV 样结构域的溶液结构最近已通过 NMR 光谱学测定（Metzler 等人，（1997）Nature Struct. Biol., 4:527 - 531。这允许亮氨酸 104 和丙氨酸 29 在三维折叠中的精确定位（图 11A - B）。亮氨酸 104 位于高度保守的 MYPPPY 氨基酸序列附近。丙氨酸 29 位于 S25 - R33 区的 C 末端附近，其在空间上邻近于 MYPPPY 区。虽然这 2 个区底部的残基之间有明显的相互作用，但显然 L104 和 A29 之间没有直接的相互作用，尽管它们都构成蛋白质中的邻接疏水核的部分。2 个抗体亲抗原性增强性突变的结构结果通过建模来评估。A29Y 突变可以容易地容纳在 S25 - R33 区和 MYPPPY 区之间的裂缝中，并且可以用于稳定 MYPPPY 区的构象。在野生型 CTLA4 中，L104 与 MYPPPY 区附近的 L96 和 V94 形成广泛的疏水相互作用。由于 2 个原因，谷氨酸突变采用类似于 L104 的那种的构象是非常不可能的。首先，如果不显著干扰 S25 - R33 区就没有足够的空间容纳结构中更长的谷氨酸侧链。其次，在疏水区内隐藏谷氨酸侧链的负电荷的能量成本将是大的。相反，建模研究预测谷氨酸侧链向外翻转至表面上，在那里它的电荷可以通过溶剂化来稳定。此类构

象变化可以容易地被 G105 适应，而区内的其他残基具有最低限度的变形。

高抗体亲抗原性突变体与表达 CD80 或 CD86 的 CHO 细胞的结合

CTLA4Ig 和突变型分子与稳定转染的 CD80⁺和 CD86⁺CHO 细胞结合的 FACS 分析（图 2）如本文所述进行。CD80 阳性和 CD86 阳性 CHO 细胞与浓度增加的 CTLA4Ig、L104EA29YIg 或 L104EIg 温育，并随后洗涤。结合的免疫球蛋白融合蛋白使用异硫氰酸荧光素缀合的山羊抗人免疫球蛋白检测。

如图 2 中所示，CD80 阳性或 CD86 阳性 CHO 细胞（ 1.5×10^5 ）与指示浓度的 CTLA4Ig（闭合方块）、L104EA29YIg（圆圈）或 L104EIg（三角形）于 23℃ 温育 2 小时，洗涤，并与异硫氰酸荧光素缀合的山羊抗人免疫球蛋白抗体温育。在 FACScan 上分析关于总共 5,000 个存活细胞的结合（单个测定），并使用 PC-LYSYS 由数据直方图测定平均荧光强度（MFI）。数据对于只与第二步试剂温育的细胞测量的背景荧光（MFI = 7）进行校正。对照 L6 mAb（80 μg/ml）产生 MFI < 30。这些结果代表 4 次独立实验。

L104EA29YIg、L104EIg 和 CTLA4Ig 与人 CD80 转染的 CHO 细胞的结合大约相等（图 2A）。L104EA29YIg 和 L104EIg 比 CTLA4Ig 更强烈地结合由人 CD86 稳定转染的 CHO 细胞（图 2B）。

功能测定

人 CD4 阳性 T 细胞通过免疫磁性负选择分离（Linsley 等人，（1992）J. Exp. Med. 176:1595 – 1604）。分离的 CD4 阳性 T 细胞在滴定浓度的抑制剂的存在下用乙酸肉豆蔻佛波醇（PMA）加 CD80 阳性或 CD86 阳性 CHO 细胞刺激。CD4 阳性 T 细胞（ $8 - 10 \times 10^4$ /孔）在 1 nM PMA 的存在下与或不与被照射的 CHO 细胞刺激剂一起培养。增殖应答通过在 72 小时培养的最后 7 小时过程中添加 1 μCi/孔 [3H] 胸苷测量。进行经由 L104EA29YIg 和 CTLA4Ig 的 PMA 加 CD80 阳性 CHO 或 CD86 阳性 CHO、刺激的 T 细胞的抑制。结果显示于图 3 中。L104EA29YIg 抑制 CD80 阳性 PMA 处理的 CHO 细胞增殖超过 CTLA4Ig（图 3A）。L104EA29YIg 在抑制 CD86 阳性 PMA 处理的

CHO 细胞增殖方面同样比 CTLA4Ig 有效(图 3B)。因此, L104EA29YIg 是 CD80 和 CD86 介导的 T 细胞共刺激的更有效的抑制剂。

图 4 显示通过 L104EA29YIg 和 CTLA4Ig 抑制上文制备的同种刺激的人 T 细胞, 以及用表达 CD80 和 CD86、称为 PM 的人 B 类淋巴瘤细胞系 (LCL) 进一步同种刺激的 (T 细胞为 3.0×10^4 /孔, 并且 PM 为 8.0×10^3 /孔)。初级同种刺激发生 6 天, 随后细胞用 ^3H 胸苷脉冲 7 小时, 之后测定掺入的放射性标记。

次级同种刺激如下进行。7 天初级同种刺激的 T 细胞经由淋巴细胞分离培养基 (LSM) (ICN, Aurora, OH) 收获并静置 24 小时。T 细胞随后在滴定量的 CTLA4Ig 或 L104EA29YIg 的存在下通过加入与上文相同比率的 PM 再刺激 (次级)。刺激发生 3 天, 随后细胞如上用放射性标记脉冲并收获。L104EA29YIg 对初级同种刺激的 T 细胞的作用显示于图 4A 中。L104EA29YIg 对次级同种刺激的 T 细胞的作用显示于图 4B 中。L104EA29YIg 比 CTLA4Ig 更好地抑制初级和次级 T 细胞增殖应答。

为了测量细胞因子生产 (图 5), 建立一式两份的次级同种刺激板。3 天后, 使用 ELISA 试剂盒 (Biosource, Camarillo, CA) 使用由制造商推荐的条件测定培养基。发现在阻断次级同种异体刺激后 T 细胞的 IL-2、IL-4 和 γ -IFN 细胞因子生产方面 L104EA29YIg 比 CTLA4Ig 更有效 (图 5A-C)。

L104EA29YIg 和 CTLA4Ig 对猴的混合淋巴细胞应答 (MLR) 的作用显示于图 6 中。来自 2 只猴的外周血单核细胞 (PBMC'S; 来自每只猴的 3.5×10^4 细胞/孔) 经由淋巴细胞分离培养基 (LSM) 纯化并与 $2\mu\text{g/ml}$ 植物凝集素 (PHA) 混合。细胞被刺激 3 天随后在收获前用放射性标记脉冲 16 小时。L104EA29YIg 抑制猴 T 细胞增殖比 CTLA4Ig 更佳。

表 II

通过所列位点上的 CTLA4Ig 诱变对 CD86Ig 结合的作用

诱变位点	无明显作用	诱变作用	
		缓慢的“结合”速率/ 缓慢的“解离”速率	配体结合减少
S25		+	
P26	+		
G27	+		
K28	+		
A29		+	
T30		+	
E31			+
R33			+
K93		+	
L96		+	
M97			+
Y98			+
P99			+
P100			+
P101			+
Y102			+
Y103		+	
L104		+	
G105		+	
I106	+		
G107	+		
Q111	+		
Y113	+		
I115	+		

(占优势的作用由符号“+”指示)

实施例 3

这项研究比较了在肾移植受体中用作由巴利昔单抗 (Simulect®; Novartis) 诱导、霉酚酸酯 (MMF; CellCept®; Roche) 和皮质类固醇组成的无 CNi 组合方案的部分时, 上文描述的 L104EA29YIg 作为维持免疫抑制剂与 CsA 在 12 个月内的功效和安全性。

来自活或已故供体、非 HLA 相同 (non-HLA-identical) 的肾同种异体移植物的成人受体是合格的。具有先前肾移植、系列反应性抗体史>20% 的受试者, 或由研究者视为处于急性排斥的较高危险中的那些限制为≤10% 的研究人群。排除标准包括局灶性和节段性肾小球硬化症、I 或 II 型膜性增生性肾小球肾炎或溶血性尿毒性综合征/血栓形成性血小板减少性紫癜的潜在肾病; 活动性乙型或丙型肝炎,

或 HIV；以及供体年龄>60 或<6，心源性死亡的供体，或供体肾冷缺血时间>36 小时。

这是在美国、欧洲和加拿大进行的开放（open-label）、随机化、活性对照、多剂、多中心研究。经历肾移植的各性别年龄≥18 岁的合格患者（已故或活供体，除了当供体和受体 HLA 相同时）被随机化以以 1:1:1 的比率使用 L104EA29YIg 较加强（MI）的治疗方案、L104EA29YIg 较不加强（LI）的治疗方案、或环孢菌素 A（CsA）治疗；全都与使用巴利昔单抗（Simulect®；Novartis）的诱导疗法、使用霉酚酸酯（MMF；CellCept®；Roche）的辅助维持疗法和皮质类固醇组合。2 种 L104EA29YIg 方案包括其中 L104EA29YIg 以 10 mg/kg 施用的早期，以及其中 L104EA29YIg 以 5 mg/kg、每 4（q4）周或每 8（q8）周的时间间隔施用的维持期。关于每种方案的剂量基于体重。这些剂量通过在非人灵长类动物研究过程中显示有效的靶谷特征指示。这些特征使在最大的免疫学危险期（第 0-90 天）过程中最初较高的剂量成为必要。早期在 MI 方案中更长（6 对 3 个月），并且包括更频繁的给药。

L104EA29YIg 较加强（MI）的治疗方案由第 1、5、15、29、43、57、71、85、113、141 和 169 天 10mg/kg，随后每 4 或 8 周 5mg/kg 的施用组成。L104EA29YIg 较不加强（LI）的治疗方案由第 1、15、29、57 和 85 天 10mg/kg，随后每 4 或 8 周 5mg/kg 组成。L104EA29YIg 以 30 分钟的静脉内输注施用。随机化至 CsA 的患者接受每天 2 次的剂量（ 7 ± 3 mg/kg），以达到预先指定的第 1 个月期间 150-400 ng/ml 以及第 2-12 个月期间 150-300ng/ml 的靶血清浓度范围，这与目前的医疗实践一致。所有患者都接受每天 2g MMF 和每 4 天 20 mg 巴利昔单抗。还给予皮质类固醇逐渐减少方案，其由第 1 天时甲基强的松龙静脉内快速灌注（bolus）500 mg 以及第 2 天时 250 mg，随后为第 3 天时经口强的松 100 mg，第 4 天时 50 mg，第 5-30 天时 25 mg，第 31-44 天时 22.5 mg，第 45-58 天时 20 mg，第 59-72 天时 17.5 mg，第 73-86 天时 15 mg，第 87-100 天时 12.5 mg，以及第 101-114 天时 10 mg 组成。第 114 天后，强的松剂量可以每隔一月减少 2.5 mg，但不低于 5 mg/天。

初级目的是证实在6个月时在预防急性排斥中L104EA29YIg不劣于CsA。次级目的包括在6个月和1年时评估急性排斥的发生率（活组织检查证实的或推测的）；在1、6和12个月时经由碘海醇清除率测量的肾小球滤过率（GFR）；高血压参数；血清胆固醇和甘油三酯；和总体安全性。其他预先指定的分析包括在1年时患者死亡或移植物丢失；急性排斥的严重性；移植后糖尿病的发生率[定义为在以前不知道是糖尿病的患者中，高血糖症 ≥ 4 周，或血红蛋白A1C（HbA1c） $> 7\%$ 所需的任何治疗]；使用肾病饮食调整（MDRD，Levey AS，Bosch JP，Lewis JP，Greene T，Rogers N，Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. Ann Intern Med 1999; 130:461 – 470），Jelliffe（RW. Creatinine clearance: Bedside estimate. Ann Intern Med. 1973; 79:604 – 605），Cockcroft – Gault（Cockcroft DW，Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. Nephron 1976; 16:31 – 41），和Nankivell（Nankivell BJ，Gruenewald SM，Allen RD，Chapman JR. Predicting glomerular filtration rate after kidney transplantation. Transplantation. 1995; 59（12）:1683 – 1689）公式计算的GFR；药物代谢动力学和免疫原性。急性排斥（AR）的诊断和治疗基于Banff 97标准和等级（Racusen LC，Solez K，Colvin RB，等人，The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. Kidney Int 1999; 55（2）:713 – 23.）。由此进行慢性同种异体移植物肾病（CAN）发生率的分析。

急性排斥（AR）的诊断和治疗基于Banff 97标准和等级（Racusen LC，Solez K，Colvin RB，等人，The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. Kidney Int 1999; 55（2）:713 – 23.）。进行手术中的肾同种异体移植物活组织检查以评估基线组织学。活组织检查的组织根据Banff 97肾移植病理学工作分类进行染色和分级。活组织检查由对治疗不知情的独立病理学家评估以确认在AR治疗前所有发作的临床上可疑的AR。

另外的终末点包括：在12个月时临床上可疑和活组织检查证明的急性排斥（CSBP AR）；在1年时死亡或移植物丢失；AR发作的严重性（使用Banff 97刻度表测量）；治疗失败（定义为研究者的意见；

≥IIB 级排斥；复发或抗类固醇排斥）；在 1、6 和 12 个月时的肾功能（经由碘海醇清除率评估的肾小球滤过率[GFRs]）以及慢性同种异体移植物肾病（CAN）的证据（间质纤维化和肾小管萎缩）；高血压参数（舒张血压[BP]≥90 mm Hg 和/或收缩压 BP≥140 mm Hg）；血清脂质；与 CsA 治疗的患者比较，在用 L104EA29YIg 治疗的患者中的安全性、可容许性和不利事件（AEs）。

对于安全性和可容许性评估，在常规预定的临床就诊期间记录 AEs、实验室测量值（血液学、生物化学和尿分析）和生命体征。

结果

总共 218 名患者经历肾移植，并且随机化至 MI 组（N=74）、LI 组（N=71）或 CsA（N=73）。基线人口统计学和临床特征在 3 个治疗组之间是相似的。总共 164 名患者完成了 1 年的治疗。在 1 年之前中断的患者中（N=16 对 16 对 20；MI 方案对 LI 方案对 CsA），最常见的原因是 AEs（N=5 对 8 对 9）和治疗失败（N=7 对 5 对 3）。

CSBPARG 的发生率在所有 3 个治疗组中很少出现，并且在 CSBPARG 或活组织检查证明的急性排斥（BPARG）的发生率中在治疗组之间没有统计学显著差异。在 6 和 12 个月时，CSBPARG 的发生率对于 MI、LI 和 CsA 治疗分别为 6.8%、5.6% 和 8.2%。

BPARG 的发生率在 6 和 12 个月时在组之间也是相似的，尽管 BPARG 在 LI 组中略微高于其他 2 个组中（对于 MI、LI 和 CsA 治疗分别为 18.9%、29.6% 和 17.8%）。活组织检查证明的急性排斥在所有治疗组中都比 CSBPARG 更频繁，并且在 LI 组中最普遍。然而，发现这些事件中的许多发生在 L104EA29YIg 低于所需谷血清浓度的患者中。

在 AR 严重性中没有看到治疗组之间的统计学显著差异；然而，数目小并且不导致移植物丢失。

这项研究对研究药物不是不知情的以允许关于 CsA 的护理标准，这可能促成与 CsA 组（N=144）比较，L104EA29YIg 组（N=345）中获取的活组织检查的数目增加。尽管这对于以这种方式设计的研究并不意外，但它可能已增加 L104EA29YIg 治疗组中肾组织学异常的诊断率。

死亡和/或移植物丢失在所有治疗组中很少发生，在 MI 组中报告了 1 例死亡，CsA 组中 4 例并且在 LI 组中没有。大多数移植物丢失不是由免疫学事件引起的，并且与 LI 组中的 1 个比较在 MI 和 CsA 组中只有 3 个移植物丢失。

与基于 CsA 的免疫抑制比较，使用基于 L104EA29YIg 的治疗观察到肾功能的显著改善。在所有时间点上使用 L104EA29YIg 治疗的碘海醇清除率更大，在 12 个月时与 CsA 比较平均改善为 11 ml/分钟/ 1.73m^2 (~ 20 %) 。

在 12 个月时，相对而言，慢性同种异体移植物肾病 (CAN) 在 L104EA29YIg 治疗患者中比 CsA 治疗患者中低 30 - 50% 地更不常见。在 12 个月时新或恶化的 CAN 比率对于 MI、LI 和 CsA 组分别为 29 %、19 % 和 44 % 。

在 1 年时，与 MI (130 mmHg) 和 LI (129 mmHg) 治疗组中的患者比较，在用 CsA 治疗的患者 (133 mmHg) 中平均收缩血压高 3-4 mmHg。尽管在 L104EA29YIg 组中较少使用抗高血压药物 (MI: 87.5 %; LI 84.1 %; CsA 92.2 %) 也如此。与 CsA (212 mg/dL) 治疗的患者比较，使用 L104EA29YIg (MI: 198 mg/dL; LI: 201 mg/dL) 的总血清胆固醇略微更低，尽管对于 L104EA29YIg 降脂质药物的使用同样较少 (MI: 36.1 %; LI: 31.9 %; CsA : 53.1 %) 。

与 L104EA29YIg 治疗组中的 1 名比较，在 CsA 组中 4 名 (5.5 %) 患者死亡。不利事件 (AEs) 的比率在治疗组之间是可比较的；然而，相关 AEs 在 L104EA29YIg 治疗后比 CsA 治疗明显更低。L104EA29YIg 的静脉内施用是良好耐受的，没有输注反应。L104EA29YIg 治疗的患者没有显示出一般的 CsA 相关的不利事件，例如贫血、白细胞减少症、多毛症、震颤和牙龈增生。与基于 CsA 的治疗比较，基于 L104EA29YIg 的治疗与任何感染或恶性肿瘤的危险增加无关。

结论

这项 12 个月的研究证实与 CsA 比较，基于 L104EA29YIg 的维持疗法给予预防 AR 中的相等功效以及类似的患者和移植物存活。另外，与基于 CsA 的维持免疫抑制比较，L104EA29YIg 证实肾功能的

显著改善和 CAN 的减少。L104EA29YIg 是安全和良好耐受的并且不伴随一般的 CNi 相关毒性。

CSBPAr 和 BPAr 的比率在 3 个治疗组之间是相似的，从而证实使用基于 CsA 的疗法观察到的低 AR 比率使用 L104EA29YIg 同样达到了。大多数 BPAr 分类为亚临床的，从而提示肾功能未受损。与 LI 组比较 MI 组中数字上较低的 AR 比率提示对于 L104EA29YIg 可能的剂量依赖性应答。L104EA29YIg 组中更频繁的活组织检查可能已导致这些组中急性和慢性排斥的过度诊断，从而提示 L104EA29YIg 治疗的利益在这项研究中可能被少说。

大多数 BPAr 事件在移植后的前 3 个月内发生，这并不意外，因为其他人已显示在移植后的早期过程中需要较高剂量的免疫抑制剂（Wiecek A, Nowicki M, Kokot F, Ritz E. Acute failure of the transplanted kidney – pathophysiology, diagnosis and prevention. Ann Transplant 1996; 1 (4): 5 – 9 和 Bennett WM. Posttransplant acute renal failure. Ren Fail 1997; 19 (2): 225 – 6）。因为大多数这些事件在低于所需谷值发生，所以应当考虑改变在达到稳定状态之前的第 1 个月治疗方案。在维持期过程中可见的大多数 BPAr 在非常低或不可检测的 L104EA29YIg 水平上发生，从而提示在那些时间段过程中 AR 的发生率与不足的免疫抑制相关，这可以通过剂量方案中的改变避免。

这项研究证实与 CsA 比较 L104EA29YIg 伴随类似的总 AE 比率，而与研究药物相关的 AE 较少。在 3 个治疗组之间没有鉴别出病毒相关的 AEs 数目中的实际差异。

在低 AR 比率的存在下，维持免疫抑制的新目标是减少长期健康并发症，包括高血压、高脂血症、药物毒性和预防瘢痕形成。如在自身免疫性疾病中，出现了新一代的免疫选择性维持免疫抑制剂。经由用 L104EA29YIg 免疫选择性共刺激阻断抑制 T 细胞共刺激代表了新的范例，从而在肾移植中提供更有选择性的维持免疫抑制、减少的毒性和改善的长期结果的希望。

实施例 4

存在对肾移植中新疗法的相当大的未满足的医学需要，所述疗法可以提供与 CNIs 可比较的短期受试者和移植物存活，而无其长期肾

毒性、心血管和代谢作用。该需要在 ECD 定义的肾同种异体移植物的受体中特别重大，其长期受试者和移植物存活率明显低于来自符合标准合格标准的供体的同种异体移植物受体的那些。具有新型作用机制的免疫抑制剂 L104EA29YIg 是用于在 ECD 同种异体移植物的肾移植受体中使用的有希望的非肾毒性候选者。因为 L104EA29YIg 可以在移入时而不是以延迟方式施用，如对于 CNIs 通常必需的 - 特别是在肾功能最初受损的那些同种异体移植物中 - 所以它提供了及时方式的免疫抑制并且无需多克隆抗淋巴细胞制剂。这可以转化为具有有利的安全特征的可比较的急性排斥率。因为 L104EA29YIg 预期不是肾毒性的，所以可见关于同种异体移植物结构（即，CAN）和功能（即 GFR）的另外利益。最后，与 CNIs 不同，L104EA29YIg 作用的靶定机制应提供免疫抑制而不会不利地影响心血管/代谢特征。下文提供了关于 L104EA29YIg 在这种受试者群体中使用的总体利益 - 危险评估。

将研究 2 种剂量方案（如实施例 3 中所述，伴随 LI 方案的较小修改并使用每 4 周的维持输注时间表）。

初级目的

1) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12 个月时受试者和移植物存活复合的作用。

2) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12 个月时测量的 $GFR < 60 \text{ mL/分钟/1.73 m}^2$ 或从第 3 个月到第 12 个月测量的 GFR 减少 $\geq 10 \text{ mL/分钟/1.73 m}^2$ 复合的作用。

次级目的

1) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12 个月时测量的 GFR 的作用。

2) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对由 12 个月的活组织检查证明的 CAN 的作用。

3) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 3 个月时测量的 GFR ，以及从基线（3 个月）到 12 个月的变化中的作用。

4)评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12 个月时测量的 GFR < 30 mL/分钟/1.73 m² 的受试者比例的作用。

5) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 3、12、24 和 36 个月时测量的 GFR，以及从基线（3 个月）到 12、24 和 36 个月的变化中的作用。

6)评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12、24 和 36 个月时 PTDM 的作用。

7) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12、24 和 36 个月时高血压测量的作用，包括 SBP 和 DBP、高血压和受控制的高血压的发生率和流行率、以及治疗方案的强度。

8) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12、24 和 36 个月时血脂异常测量的作用，包括血清总、非 HDL、低密度脂蛋白（LDL）和 HDL 胆固醇和 TGs，血脂异常和受控制的血脂异常的发生率和流行率，以及治疗方案的强度。

9) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 24 和 36 个月时受试者和移植物存活的作用。

10) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 6 个月时急性排斥测量的作用，包括急性排斥的发生率和严重性、用于受损的肾功能和预期 DGF 的多克隆抗淋巴细胞制剂的使用、用于治疗急性排斥的淋巴细胞消耗疗法的最初使用、抗类固醇急性排斥的发生率、急性排斥后完全恢复（SCr 回到基线）的发生率、亚临床性排斥的发生率、以及不管组织学发现所有治疗的急性排斥发作的发生率。

11) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对 QoL 的作用。

12) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 的总体安全性。

第三级目的

1) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对从基线（3 个月）到 12、24 和 36 个月计算的 GFR 的斜率和截距的作用。

2) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12 个月时测量的 GFR < 45 mL/分钟/1.73 m² 的受试者比例的作用。

3)评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在第 12 个月时计算的 $\text{GFR} < 75 \text{ mL/分钟/1.73 m}^2$ 的受试者, 以及从第 3 个月到第 12 个月计算的 GFR 减少至少 $15 \text{ mL/分钟/1.73 m}^2$ 的受试者比例的作用。

4) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对 DGF 发生率的作用。

5) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12、24 和 36 个月时急性排斥测量的作用, 包括急性排斥的发生率和严重性、用于受损的肾功能和预期 DGF 的多克隆抗淋巴细胞制剂的使用、用于治疗急性排斥的淋巴细胞消耗疗法的最初使用、抗类固醇急性排斥的发生率、急性排斥后完全恢复 (SCr 回到基线) 的发生率、亚临床性排斥的发生率、以及不管组织学发现所有治疗的急性排斥发作的发生率。

6) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12、24 和 36 个月时复合心血管疾病终末点 (判定的心血管性死亡、心肌梗死、缺血性发作、由于心血管原因的非选择性住院治疗、和经皮冠状介入) 的作用。

7) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12、24 和 36 个月时复合心肾疾病终末点 (死亡、移植物丢失、非致命性心肌梗死和中风) 的作用。

8) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12、24 和 36 个月时 Framingham 危险评分的作用。

9) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对研究药物中断发生率的作用。

10) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对抗供体人白细胞抗原 (HLA) 抗体的作用。

11) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对活组织检查样品中 C4d 阳性的作用。

研究设计

该研究的持续时间是 3 年, 伴随关于安全性评估的后续 8 周随访期。在 3 年治疗期结束时, 受试者可能对于长期延伸研究是合格的。

这是随机化、半盲、活性对照、平行组研究。所有受试者都将接受来自具有如下定义的扩大标准的供体的肾。这些标准部分基于由器官共享联合网 (UNOS) 提出的那些; 它们还包括广泛用于鉴别潜在

的伤害器官的其他特征，例如来自心源性死亡（DCD，无心跳）或延长的冷缺血时间（CIT）供体的那些。

大约 540 名受试者将以 1:1:1 的比率随机化至使用 L104EA29YIg（MI 方案）、L104EA29YIg（LI 方案）或 CsA 的治疗。所有受试者还将接受使用巴利昔单抗的诱导，以及 MMF 和皮质类固醇的背景维持免疫抑制方案。随机化至 MI 方案的受试者将接受第 1 和 5 天时，随后每 2 周到第 3 个月（第 2、4、6、8、10 和 12 周），以及随后每 4 周到第 6 个月（第 16、20 和 24 周）的静脉内 L104EA29YIg（10 mg/kg）。6 个月后，MI 治疗组中的受试者将接受每 4 周施用的 L104EA29YIg 5 mg/kg 的维持剂量，直至 36 个月试验完成时。随机化至 LI 方案的受试者将接受第 1 和 5 天时，以及随后每 2 周到第 1 个月（第 2 和 4 周），以及每 4 周到第 3 个月（第 8 和 12 周）的静脉内 L104EA29YIg（10 mg/kg）。3 个月后，LI 治疗组中的受试者将接受每 4 周施用的 L104EA29YIg 5 mg/kg 的维持剂量，直至 36 个月试验完成时。

LI 和 MI 组之间的不知情将借助于在第 6 和 10 周时 LI 治疗组中的安慰剂输注来保持。随机化至 CsA 的受试者将接受每天 2 次的剂次，其设计为达到与目前医疗实践一致的指定谷血清浓度范围。

多克隆抗淋巴细胞制剂（Thymoglobulin 或 ATGAM）的使用对于随机化至 CsA、经历受损的肾同种异体移植物功能和预期 DGF 的受试者是允许的 - 但不是必需的。这些试剂以这种能力广泛用于提供免疫抑制，直至移植物功能恢复用于施用 CsA。在这种临床情况中多克隆抗淋巴细胞制剂使用和剂量的决定由研究者在方案指南内自行决定。L104EA29YIg 的安全性和功效将在 1、2 和 3 年时评估。

初级结果测量

每种基于 L104EA29YIg 的方案将对于下列初级功效结果测量与基于 CsA 的方案进行比较：（1）在 12 个月时受试者和移植物存活的复合；（2）在 12 个月时测量的 $GFR < 60 \text{ mL/分钟/1.73 m}^2$ 或从第 3 个月到第 12 个月测量的 GFR 减少 $\geq 10 \text{ mL/分钟/1.73 m}^2$ 的复合。目的是证实对于死亡和移植物丢失的非劣势以及对于肾功能的优势。选择受试者和移植物存活的终末点，因为这些测量是关于同种异体移植

物受体的最重要的临床结果。尽管同种异体移植物丢失可以通过有效的免疫抑制疗法来预防，但相同疗法可增加由于感染、PTLD、恶性肿瘤、肾毒性或心血管疾病死亡的危险。因此，检查受试者和移植物存活的复合终末点作为同种异体移植物受体中免疫抑制疗法的净利益的概括测量是合适的。这种复合终末点具有在所有受试者中不由于漏失数据或受试者错误分类而偏性评估的进一步优点。

选择肾功能作为终末点，这是因为移植后肾功能和长期肾结果之间的关联已在各种情况下重复证实。无论肾功能在移植后数天、出院时、还是在移植后 6 和 12 个月时测量，这种关联都存在。这已在来自活和尸体供体肾的受体、来自较年轻和较年长的尸体供体肾的受体、第 2 次移植受体、以及成年人和儿科受体中观察到。

来自多中心研究的结果证实 SCr 对于预期长期移植物存活的重要性。肾功能和长期预后之间的关联是强烈且可重现的，但不是严格线性的。在成年人肾移植受体的分析中，1 年时的 SCr 和预计的移植物中值半衰期之间的关联检查揭示 $SCr > 1.5 \text{ mg/dL}$ 时的显著拐点。类似地，从 6 个月到 1 年的 SCr 变化 (ΔSCr) 和预计的移植物中值半衰期之间的关联检查揭示 $\Delta SCr \geq 0.3 \text{ mg/dL}$ 时的显著拐点。因此，1 年时肾功能的绝对水平和从 6 个月（或类似稳定的早期移植后时间点）到 1 年的肾功能变化适合于用作结果测量。肾功能与长期结果关联的非线性的存在提示肾功能的分类测量将比空间测量具有更大的临床关联性。关于肾功能在 1 年时 $> 1.5 \text{ mg/dL}$ 的阈值以及从第 6 个月到第 1 年 $SCr \geq 0.3 \text{ mg/dL}$ 的变化看起来是合适的。

在上文参考的研究中，肾功能的预后重要性使用 SCr 作为标记证实。这些研究一般太大而不能使用肾小球滤过的直接测量。SCs 作为肾功能标记的局限性是众所周知的。SCs 水平主要反映肌酸酐的肾排泄和肌酸酐的内源性产生之间的平衡。后者可以受肌肉量、感染、炎症和类固醇使用中的变化的显著作用，所述变化在移植群体中是非常普遍的。此外，肌酸酐的肾排泄可以通过 2 种途径 - 肾小球滤过和肾小管分泌发生。肾小球滤过的丧失对 SCr 的影响通常被肾小管分泌中的补偿性增加掩盖，并且增加的 SCr 作为肾损伤标记的效用从而减少。已估计 40% GFR 减少的受试者将具有正常或低 SCr。已开发了众多公式，其寻求通过说明人口统计学和生物统计学因素的作用来改善

SCr 和 GFR 之间的关联。在具有稳定肾功能的 294 名移植受体中研究由各种公式估计的 GFR 和通过菊粉清除率测量的真实 GFR 之间的一致水平。预测的 GFR 值与测量的菊粉清除率的不同为至少 10 mL/分钟/1.73 m² 的比例对于 Jelliffe 公式为 34%，至对于 Nankivell 公式为 53%。由 Levey 等人提出的公式将在这项研究中用于计算 GFR。这个公式已显示在移植群体中比其他公式例如 Nankivell 更精确地预测 GFR，在预测和测量值之间具有最佳关联。考虑到真实 GFR 和计算的 GFR 之间的相当大差异，真实肾小球滤过标记的清除率将用于评估肾功能的初级终末点（附录 1）。60 mL/分钟/1.73 m² 的 GFR，或至少 10 mL/分钟/1.73 m² 的 GFR 变化将用作在大流行病学研究中确立的 1.5 mg/dL 的 SCr 阈值或至少 0.3 mg/dL 的 SCr 变化的近似等价物。复合终末点的变化组分将从第 3 - 12 个月评估，这是因为移植后肾功能在第 3 个月大部分稳定。

其他结果测量

关键的次级目的是评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12 个月时测量的 GFR 以及对在 12 个月时活组织检查证明的 CAN 的作用。这些终末点与其他次级终末点分开以强调其在 L104EA29YIg 评估中的重要性。如上文讨论的，ECD 肾中的功能性肾单位量和肾保存由于供体特征（例如，较大的年龄、心血管共病（co-morbidities）、获得操作和 CIT）在移植时很可能是减少的，所得到的受试者和移植物存活率显著低于使用标准条件供体器官观察到的那种。因为肾功能在移入时可能是减少的，所以可能相当大比例的受试者可以满足在研究入组或基线肾同种异体移植物功能测定时共同初级肾功能终末点的标准。因此，方案的关键次级目的是评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 在 12 个月时测量的 GFR 中的差异中的作用。这种关键次级终末点允许不考虑这种 ECD 群体中预先存在的供体变异性而区别 L104EA29YIg 与 CsA 比较的作用。它还促成肾功能的总体评估，并进一步巩固 L104EA29YIg 在肾移植受体中提供显著医学利益的结论。其余的关键次级目的是由 12 个月的活组织检查证明的 CAN。CAN 是死亡的仅仅第二位的原因，其中功能性移植物是晚期肾同种异体移植物丢失的主要原因。荒谬的是，CNIs 被视为通过直接（即直接肾毒性作用）和间

接途径（即不利的心血管和代谢作用）促成 CAN。由于其具体作用机制，L104EA29YIg 不可能是直接肾毒性的，或不可能不利地改变心血管和代谢参数。

在上文实施例中，在 L104EA29YIg 治疗的受试者中可见 CAN 发生率减少中的有利作用。在目前研究中，确立 CAN 发生率的减少连同肾功能的改善将巩固 L104EA29YIg 在肾移植受体中提供显著医学利益的结论。L104EA29YIg 在预防急性排斥中的功效将通过各种结果测量来评估。这些包括其发生率、严重性、对治疗的应答性和结果。然而，这些测量的解释被 L104EA29YIg 和 CsA 中的固有差异复杂化。L104EA29YIg 在移植时施用，而 CsA 在存在初始肾功能证据时开始。预期在这项研究中随机化至 CsA 的某些受试者将接受多克隆抗淋巴细胞制剂以提供免疫抑制覆盖，如果初始肾功能是受损的并且预期 DGF 的话。这种治疗作用可以预防或掩盖 CsA 治疗的受试者中急性排斥的发展，并且使得受试者对于急性排斥的结果测量不可评价。因为在随机化至 L104EA29YIg、从移植时开始治疗的受试者中无需采取类似作用，所以急性排斥的比较评估是不相等的。为了更精确地评估 L104EA29YIg 在预防急性排斥中的功效，这种能力的多克隆抗淋巴细胞制剂的使用还连同其他急性排斥测量一起报告。

研究群体

研究群体包括由于供体特征、获得操作、CIT 或其他因素可能是不最理想的肾同种异体移植物的受体。具体的合格标准基于由 UNOS 提出的器官捐赠‘扩大标准’。来自延长的 CIT 或来自 DCDs 供体肾的受体也将是合格的。一般地，免疫学标准在受试者选择中将不起主要作用。各种免疫学危险水平上的受试者是合格的。然而，该研究将排除最大的免疫学危险的受试者（交叉配型阳性、系列反应性抗体 [PRA] $\geq 30\%$ ，或先前移植的那些）。这些受试者可能需要减少其抗体负荷的治疗，例如血浆去除术，这超出这种方案的范围。受试者将在全球大约 90 个地点入选。

初级功效结果测量

1) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12 个月时受试者和移植
物存活复合的作用。

2) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12 个月时测量的 $GFR < 60$
 mL/分钟/1.73 m^2 或从第 3 个月到第 12 个月测量的 GFR 减少 $\geq 10 \text{ mL/}$
 分钟/1.73 m^2 复合的作用。

次级功效结果测量

1) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12 个月时测量的 GFR 的
作用。

2) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对由 12 个月的活组织检查证
明的 CAN 的作用。

3) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 3 个月时测量的 GFR ，以
及从基线（3 个月）到 12 个月的变化作用。

4) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12 个月时测量的 $GFR < 30$
 mL/分钟/1.73 m^2 的受试者比例的作用。

5) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 3、12、24 和 36 个月时
测量的 GFR ，以及从基线（3 个月）到 12、24 和 36 个月的变化作用。

6) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12、24 和 36 个月时 PTDM
的作用。

7) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12、24 和 36 个月时高血
压测量的作用，包括 SBP 和 DBP、高血压和受控制的高血压的发生
率和流行率、以及治疗方案的强度。

8) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12、24 和 36 个月时血脂
异常测量的作用，包括血清总、非 HDL、LDL 和 HDL 胆固醇和 TGs，
血脂异常和受控制的血脂异常的发生率和流行率，以及治疗方案的强
度。

9) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 24 和 36 个月时受试者和
移植物存活的作用。

10) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 6 个月时急性排斥测量
的作用，包括急性排斥的发生率和严重性、用于受损的肾功能和预期
DGF 的多克隆抗淋巴细胞制剂的使用、用于治疗急性排斥的淋巴细胞

消耗疗法的最初使用、抗类固醇急性排斥的发生率、急性排斥后完全恢复（SCr 回到基线）的发生率、亚临床性排斥的发生率、以及不管组织学发现所有治疗的急性排斥发作的发生率。

11) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对 QoL 的作用。

10) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 的总体安全性。

第三级结果测量

1) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对从基线（3 个月）到 12、24 和 36 个月计算的 GFR 的斜率和截距的作用。

2) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12 个月时测量的 $\text{GFR} < 45 \text{ mL/分钟/1.73 m}^2$ 的受试者比例的作用。

3) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在第 12 个月时计算的 $\text{GFR} < 75 \text{ mL/分钟/1.73 m}^2$ 的受试者，以及从第 3 个月到第 12 个月计算的 GFR 减少至少 $15 \text{ mL/分钟/1.73 m}^2$ 的受试者比例的作用。

4) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对 DGF 发生率的作用。

5) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12、24 和 36 个月时急性排斥测量的作用，包括急性排斥的发生率和严重性、用于受损的肾功能和预期 DGF 的多克隆抗淋巴细胞制剂的使用、用于治疗急性排斥的淋巴细胞消耗疗法的最初使用、抗类固醇急性排斥的发生率、急性排斥后完全恢复（SCr 回到基线）的发生率、亚临床性排斥的发生率、以及不管组织学发现所有治疗的急性排斥发作的发生率。

6) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12、24 和 36 个月时复合心血管疾病终末点（判定的心血管性死亡、心肌梗死、缺血性发作、由于心血管原因的非选择性住院治疗、和经皮冠状介入）的作用。

7) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12、24 和 36 个月时复合心肾疾病终末点（死亡、移植物丢失、非致命性心肌梗死和中风）的作用。

8) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12、24 和 36 个月时 Framingham 危险评分的作用。

9) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对研究药物中断发生率的作用。

10) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对抗供体 HLA 抗体的作用。

11) 评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对活组织检查样品中 C4d 阳性的作用。

移植物丢失的定义 移植物丢失定义为功能丧失或躯体缺失。功能丧失将定义为如通过中心实验室测定的 $\text{SCr} \geq 6.0 \text{ mg/dL}$ ($530 \mu\text{mol/L}$) 的持续水平 ≥ 4 周或 ≥ 56 连续透析天数, 或肾功能损害至这样的程度, 从而使得受试者接受第 2 次移植。移植物丢失的所有原因将由独立的 EAC 判定。

移植物功能延迟 (DGF) 的定义 DGF 定义为到研究第 8 天 (手术后第 7 天) 的透析治疗。

慢性同种异体移植物肾病 (CAN) 的定义 活组织检查证明的 CAN 将通过不知情的中心组织病理学家使用 Banff 97 肾移植病理学工作分类来测定。CAN 发生率将通过比较所有第 1 天后的活组织检查与移植时获得的基线活组织检查来测定。这种比较确定随后可能解释为 CAN 的任何预先存在的组织病理学的存在和严重性。

移植后糖尿病的定义 PTDM 将根据由近期国际一致指南 20 阐述的定义进行定义。这些标准概括为: a) 糖尿病症状加血浆葡萄糖 (PG) 浓度偶尔 $\geq 200 \text{ mg/dL}$ (11.1 mmol/L), 或 b) 空腹血糖 (FPG) $\geq 126 \text{ mg/dL}$ (7.0 mmol/L), 或 c) 在经口葡萄糖耐量测试过程中 2 小时 PG $\geq 200 \text{ mg/dL}$ (11.1 mmol/L), 和 d) 在伴随急性代谢失代偿的明确高血糖症不存在下必须在另一天进行基于静脉 PG 测量的证实性实验室测试。该研究将利用 FPG 用于评估 PTDM, 然而, 如果受试者使用这些其他方法评估且发现满足上述标准, 那么他们将被视为患有 PTDM。

高血压测量的定义 高血压在这项研究中将根据关于预防、检测、评估和治疗高血压的全国联合委员会第 7 次报告 (Seventh Report of the Joint National Committee on the Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure) 21 对于患有慢性肾病的受试者进行定义。这个定义依据 $\text{SBP} \geq 130 \text{ mm Hg}$ 或 $\text{DBP} \geq 80 \text{ mm Hg}$ 。另外, $\text{SBP} < 130 \text{ mm Hg}$ 和 $\text{DBP} < 80 \text{ mm Hg}$ 、正在接受用于高血压适应症的抗高血压药物或具有高血压医疗史的所有受试者包括在这个定义内。高血压发生率定义为在随机化和移植后发展高血压的受试者比例。高血压流行率定义为在任何给定时间满足上文说明的高血压定义的受试者比例。受控制的高血压定义为 $\text{SBP} < 130 \text{ mm Hg}$

和 DBP < 80 mm Hg, 同时接受用于高血压适应症的抗高血压药物, 或具有高血压医疗史、接受用于另一种适应症的抗高血压药物。SBP < 130 mm Hg 和 DBP < 80 mm Hg、没有高血压医疗史、开处用于除高血压以外的适应症的抗高血压药物 (例如用于偏头痛预防的 β 阻滞剂) 的受试者, 将不视为具有高血压或受控制的高血压。治疗方案的强度定义为用于控制高血压的抗高血压药物的总数目。所有抗高血压药物将对于患有高血压或受控制的高血压的受试者中的高血压适应症计数, 因为抗高血压效应的存在与适应症无关。

血脂异常测量的定义 血脂异常依据来自全国肾脏基金会肾脏疾病结果质量倡议 (National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative) (NKF - K/DOQI) 22 的近期指南进行定义。血脂异常定义为高甘油三酸酯血症 (TGs $\geq$ 500 mg/dL [5.65 mmol/L])、高胆固醇血症 (LDL $\geq$ 100 mg/dL [2.59 mmol/L])、或在高 TGs (TGs $\geq$ 200 mg/dL [2.26 mmol/L] 的存在下非 HDL 升高 (非 HDL $\geq$ 130 mg/dL [3.36 mmol/L])。受控制的血脂异常在这项研究中定义为接受用于上文说明的血脂异常之一的药理学处理的受试者, 所述血脂异常被成功治疗, 并且其脂质值降到先前段落中描述的阈值之下。这些试剂中的一些具有关于伴随 CsA 使用的起始剂量或最大推荐剂量, 关于肾功能不全给药的特殊预防措施和/或警告, 或可以引起 CsA PK 改变。参考关于具体推荐的合适的包装插页。用作抗高血脂药的任何其他试剂 (即, 非抑制素疗法) 将视为水平 I 的治疗强度。抑制素和另一类试剂 (例如依泽替米贝 (ezetimibe)) 的伴随使用将抑制素治疗的强度水平提高 1 个水平; 因此, 超过 5 的强度水平是可能的。

急性排斥 将定义为需要临床证据和活组织检查证实的临床病理学事件。同种异体移植活组织检查将通过不知情的中心独立病理学家使用 Banff 97 肾移植病理学工作分类来评估急性排斥的存在和严重性。在急性排斥的分析中, 通过中心病理学家的活组织检查解释和分级将代替地方性解释。对于没有完全满足标准, 但由中心病理学家解释为是急性排斥并导致用于急性排斥的治疗的可疑急性排斥进行的活组织检查将作为急性排斥计数。亚临床性排斥定义为与急性排斥一致但缺乏其临床关联的中心病理学家的组织学发现。抗类固醇急性排斥定义为在使用皮质类固醇治疗后缺乏 SCr 改善和/或使淋巴细胞消

耗疗法的使用成为必要的组织学发现。Framingham 危险评分这种危险评分利用来自 Framingham Heart Study 23 的数据以估计关于‘顽固性 (hard)’冠心病 (心肌梗死和冠状死亡) 的 10 年危险。包括在这种计算中的危险因素是年龄、性别、总胆固醇、HDL 胆固醇、SBP、糖尿病、关于高血压的治疗以及在先前月份中的任何吸烟。

样本大小测定

初级目的是评估 L104EA29YIg 与 CsA 比较对在 12 个月时受试者和移植物存活以及肾功能的作用。2 个共同初级终末点是：(1) 在移植后 12 个月时具有存活移植物的受试者比例和 (2) 在 12 个月时测量的 GFR $< 60 \text{ mL/分钟/1.73 m}^2$ 和/或从第 3 个月到第 12 个月测量的 GFR 减少 $\geq 10 \text{ mL/分钟/1.73 m}^2$ 的受试者比例。每个治疗组 180 名受试者的样本大小将提供 83 % 能力，以确定在第一个共同初级终末点 (受试者和移植物存活) 中关于绝对差异 (每个 L104EA29YIg 方案和 CsA 方案之间) 的 97.3 % 双侧 CIs 的上限将不超过 10 %，如果在 12 个月时真实受试者和移植物存活率对于 CsA 方案是 80 % 并且对于 2 个 L104EA29YIg 方案中的每一个为 83 % 的话。对于肾功能终末点，每组 180 名受试者的样本大小能够检测与 CsA 方案比较对于每个 L104EA29YIg 方案满足测量的 GFR 终末点的受试者比例 25 % 的减少，其中假定 75 % 的 CsA 受试者满足肾功能终末点以及每个治疗组 25 % 的退出。总的来说，每个治疗组 180 名受试者将提供至少 80 % 的能力，以检测 1 L104EA29YIg 方案满足 2 个共同初级终末点，其总第 I 类误差控制在 0.05 显著性水平 (Dunnett 调整)。

包括标准

靶群体：1) 受试者是已故供体肾移植的第 1 次受体 2) 供体和/或供体肾满足关于器官捐赠的下列扩大标准中的至少一个：a) 供体年龄 ≥ 60 岁或 b) 供体年龄 50 - 59 岁以及下列之一：(i) 脑血管意外 (CVA) + 高血压 + SCr $> 1.5 \text{ mg/dL}$ 或 (ii) CVA + 高血压或 (iii) CVA + SCr $> 1.5 \text{ mg/dL}$ 或 (iv) 高血压 + SCr $> 1.5 \text{ mg/dL}$ 或 c) CIT ≥ 24 小时，供体年龄 > 10 岁或 d) 心源性死亡的供体 (无心跳供体) 3) 男性和女性，年龄 18 或更大，包含性的 4) WOCBP 必须使用适当的避孕

方法以以这样的方式避免整个研究期间以及研究后最高达 8 周怀孕，从而使得怀孕的危险最小化。WOCBP 包括已经历月经初潮并且未经历成功的外科手术绝育（子宫切除术、两侧输卵管结扎或双侧卵巢切除术）或不是绝经后（定义为闭经 $\geq$ 连续 12 个月；或使用激素替代疗法的女性，其具有文件证明的血清促卵泡激素水平 >35 mIU/mL）的任何女性。甚至使用经口、植入或可注射的避孕激素或机械产品例如宫内器具或障碍方法（隔膜、避孕套、杀精子剂）以预防怀孕或实行节欲或其中配偶不育（例如输精管切除术）的女性都应当视为有分娩的可能性。WOCBP 必须具有在研究药物开始前 72 小时内的阴性血清妊娠测试（最小灵敏度 25 IU/L 或人绒毛膜促性腺激素[HCG]的等价单位）。5）男性整个研究期间以及最后输注后最高达 8 周必须使用足够的避孕方法，从而使得其配偶的怀孕危险降到最低。

排除标准

1）不愿意或不能使用可接受的方法以避免整个研究时间段以及最后输注后最高达 8 周怀孕的 WOCBP。2）怀孕或进行母乳喂养的女性 3）在入选时或在研究药物施用前妊娠测试阳性的女性 4）对于整个研究时间段以及研究药物最后输注后最高达 8 周不愿意或不能使用适当的避孕方法的男性 5）供体年龄 <10 岁 6）具有下列潜在肾病的受试者：a）局灶性节段性肾小球硬化症（活组织检查证明的）b）I 或 II 型膜性增生性肾小球肾炎 c）溶血性尿毒性综合征/血栓形成性血小板减少性紫癜综合征 7）目前 PRA $\geq 30\%$ 的受试者 8）T 细胞淋巴细胞毒性交叉配型阳性的受试者 9）具有任何先前实体器官移植（包括肾）的受试者 10）接受同时发生的实体器官（心脏、肝、胰）或细胞（胰岛、骨髓、干细胞）移植的受试者 11）接受来自扩大标准供体的成对肾的受试者（双肾移植）12）丙型肝炎抗体阳性或关于丙型肝炎的聚合酶链反应（PCR）阳性的受试者 13）乙型肝炎表面抗原阳性或关于乙型肝炎的 PCR 阳性的受试者 14）已知人免疫缺陷病毒（HIV）感染的受试者 15）在前 3 年内具有需要治疗的活动性结核（TB）的受试者或先前需要关于 TB 的三重（或更多）组合治疗的任何受试者。已知纯化的蛋白衍生物（PPD）阳性的受试者对于研究将不是合格的，除非他们完成关于潜伏 TB 的治疗并且在入选时具有阴性胸部 X 射线

检查。在最后 12 个月内进行的 PPD 测试是可接受的，只要存在结果的文件证明。具有先前的阴性结果、在最后 12 个月中没有 PPD 的受试者可以入选，如果他们在入选时还具有阴性胸部 X 射线检查，没有指示 TB 的症状，没有已知的 TB 接触，目前没有居住在 TB 地方性流行区域、近期没有去所述区域旅游、或先前不是从所述区域移来的话。 ≥ 10 mm 硬结的 PPD 应答或在非卡介苗（非 BCG）免疫受试者中 > 1 或在 BCG 免疫受试者中 > 2 的 Heaf 得分应当视为阳性测试。根据公布的指南和/或由医疗协会认可的地方标准可以应用更保守的标准

16) 具有活性感染或通常将排除移植的其他禁忌症的受试者 17) 生命期望受疾病状态或其他潜在医学状况严格限制的受试者 18) 在最后 5 年内具有癌症史（通过局部切除术治愈的除非黑素瘤皮肤细胞癌外的）的受试者 19) 在过去 5 年内具有物质滥用（药物或酒精）史，或与适当的研究随访不相容的精神病症的受试者 20) 具有活性消化性溃疡病、慢性腹泻或胃肠吸收不良的受试者 21) 地方实验室值为通用毒性标准 (CTC) II 级或更大的受试者不能参与该研究。然而，对于 CTC II 级是例外的某些特定实验室参数将是允许的。注意下列允许：血液学：血红蛋白可以低于 CTC II 级（但不低于 8 g/dL）。血小板可以低于 CTC II 级，但不低于 80,000/mm³ (80 x 10⁹/L)。总白细胞 (WBC) 计数可以低于 CTC II 级，但不低于 3000/mm³ (3 x 10⁹/L)。粒细胞和淋巴细胞计数可以是任何值。化学：SCr 和血液尿素氮 (BUN) 值可以是任何值。血糖可以是任何值。尿分析：尿分析结果可以是任何值 22) 所有 40 岁或更大的女性，和具有乳癌史的一级亲属或具有乳癌的其他危险因素的任何年龄的女性必须具有筛选乳房 X 线照片、或提供在入选 6 个月内进行的筛选乳房 X 线照片结果。具有怀疑恶性肿瘤的乳房 X 线照片以及在另外的临床、实验室或其他诊断评估后不能合理地排除恶性肿瘤可能性的受试者将被排除。如果筛选乳房 X 线照片没有在入选 6 个月内进行，但受试者由地方标准视为合适的移植候选者，那么基线乳房 X 线照片可以在移植后 4 周内获得 23) 具有静脉内进入困难或可能将排除测量的 GFR 共同初级终末点评估的其他原因的受试者，或不太可能（例如由于预先存在的凝固问题）或不愿意经历方案指定的 12 个月同种异体移植物活组织检查的受试者 24) 具有对静脉内注射碘化 X 射线造影剂的真实变态反应史的受试者

25) 在第 1 天就诊前 30 天内已使用任何试验药的受试者 26) 先前用 L104EA29YIg 治疗的受试者 27) 囚犯或由于精神病或身体（例如传染病）疾病治疗被强制拘留（非自愿的禁闭）的受试者必须不能入选这项研究。

L104EA29YIg 的施用

第 1 天定义为移植当天（移植后第 0 天）。第 1 天给药的输注应当在外科医生已进行最初手术中评估，且已得出结论为受试者仍然是移植候选者并且将进行移植后，以及在开始移植血管吻合前开始。输注剂量将基于在研究第 1 天时的受试者实际体重，并且在研究过程期间将不修改，除非体重变化 $\pm 10\%$ 。研究药物应当以相对恒定的速率经过 30 分钟施用于受试者。第 1 天和第 5 天（移植后第 4 天）的剂量应当隔开大约 96 小时（ ± 6 小时）施用。后续就诊和输注窗口在下文提供。对于进行透析的受试者，L104EA29YIg 的输注以及受试者重量的测定应当在透析治疗后发生。

L104EA29YIg MI 方案：随机化至 MI 方案的受试者将接受第 1 和 5 天时，以及随后 2 个月每隔一周（第 2、4、6、8、10 和 12 周），以及随后每 4 周到第 6 个月（第 16、20 和 24 周）的静脉内 L104EA29YIg（10 mg/kg）。6 个月后，MI 治疗组中的受试者将接受每 4 周的 L104EA29YIg 5 mg/kg 的维持剂量，直至 36 个月时试验完成。

L104EA29YIg LI 方案：随机化至 LI 方案的受试者将接受第 1 和 5 天时，以及随后 2 周每隔一周（第 2 和 4 周），以及 2 个月每 4 周（第 8 和 12 周）的静脉内 L104EA29YIg（10 mg/kg）。3 个月后，LI 治疗组中的受试者将接受每 4 周的 L104EA29YIg 5 mg/kg 的维持剂量，直至 36 个月时试验完成。LI 和 MI 组之间的不知情将借助于 LI 治疗组中的 2 次安慰剂输注来保持。因此，随机化至 LI 方案的受试者将在第 6 和 10 周时施用安慰剂（溶于注射用水的葡萄糖 5% [D5W]）输注。

环孢菌素（CsA）的施用

CsA 的日剂量应当根据与时刻和膳食有关的一致时间表以 2 次分开的剂次施用。在研究就诊日时，受试者必须停止早晨 CsA 剂次直至

获得谷 CsA 血液水平后。在研究就诊日时，当受试者将具有标准化的 BP 监控和/或测量的 GFR 评估时，这些测量将在 CsA 给药前完成。最初日剂量应为 7 ± 3 mg/kg（即，4 – 10 mg/kg）。后续剂量应当进行调整以维持预定范围的谷血清浓度：第 1 个月：靶水平 150 – 300 ng/mL 第 1 个月：靶水平 100 – 250 ng/mL。使用给药后 2 小时的血浆浓度（C2）监控 CsA 水平在这项研究中不使用。尽管通过 C2 监控管理 Neoral 的近期国际一致声明支持 C2 监控的使用，但它也清楚地声明缺乏关于对肾功能的长期作用、CAN 的发生率、以及与 C2 监控有关的一般安全性特征的数据。²⁴ 此外，不是所有受试者都适合于 C2 监控，包括患有糖尿病、缓慢胃排空的受试者，或者使用改变 CsA 清除率的伴随药物的受试者。此外，低 C2 水平可以由真实的低吸收（其中 CsA 剂量应当增加）或由慢吸收（其中存在延迟的最大血浆浓度并且剂量增加可能产生毒性）引起。最后，这种实践并不普遍，并且预期证实这种实践超过目前方案的范围。关于另外的处方信息，参见包装插页。CsA 应当在所有受试者中第 7 天开始。对于其中研究者认为开始 CsA 根本不是为了受试者的最佳利益（例如，由于肾功能受损），并且相反选择使用非研究药物（例如西罗莫司）的受试者，这种行为将被视为中断研究药物。

对于具有立即同种异体移植物功能的受试者：对于随机化至使用 CsA 治疗的受试者，CsA 的第 1 剂应当一有适当的同种异体移植物功能的证据就施用，但直到那时才施用。适当的同种异体移植物功能定义为与最初的移植后值比较 SCr 减少至少 1 mg/dL，或在移植后 12 小时（或更少）的时间段内尿排出量 ≥ 250 mL。

对于具有受损的肾同种异体移植物功能和预期 DGF 的受试者：具有手术后受损的同种异体移植物功能和预期 DGF 的受试者对于接受多克隆抗淋巴细胞制剂合格 – 但不是必需的。无论受试者接受多克隆淋巴细胞制剂与否，当存在同种异体移植物功能恢复的证据（如上文限定）或第 7 天时应当开始 CsA。

皮质类固醇

这项研究中的所有受试者将每天用皮质类固醇治疗。

类固醇维持 - 逐渐减少。移植日（第 1 天）：在到达手术室（OR）后静脉内 500 mg 甲基强的松龙（作为琥珀酸钠）

第 2 天：甲基强的松龙（作为琥珀酸钠）250 mg 静脉内

第 3 天：强的松（或强的松龙）100 mg 经口（口服）

第 4 天到第 14 天（即，第 2 周结束时）：强的松（或强的松龙）逐渐减少至 20 - 30 mg 每天 1 次口服

第 15 天到第 6 个月：强的松（或强的松龙）逐渐减少至不低于 2.5 mg 每天 1 次口服

受试者必须保持在至少 2.5 mg 每天 1 次口服到第 3 年。

前 2 个剂量（研究第 1 天，移植日和研究第 2 天，手术后第 1 天）将静脉内施用。其余剂量将口服施用。然而，当经口给药不可能时静脉内给药相等剂量的甲基强的松龙有时也是允许的。关于静脉内而不是口服给药的此类原因是并发性疾病、手术后肠梗阻、或由研究者自行决定的其他原因。如果甲基强的松龙不可用，那么允许使用与甲基强的松龙剂量等价的另一种静脉内皮质类固醇试剂。

霉酚酸酯给药

这项研究中的所有受试者将用 MMF 治疗。每天的 MMF 应当根据与时刻和膳食有关的一致时间表以 2 次分开的剂次施用。剂量应当是每天 2 g；然而，在非裔美国人中，可以由研究者自行决定施用每天 3 g。25 MMF 应当口服施用。由于并发性疾病、手术后肠梗阻、或由研究者自行决定的其他原因，如果需要，静脉内给药是允许的。第 1 次剂量应当在手术前施用。后续剂量应当一旦受试者能够耐受经口药物就口服施用。剂量和时间表可以基于实验室值（例如减少的 WBCs）和受试者可容许性（参见下文）来调整。关于完整的处方信息，参见包装插页。

对于发展恶心、腹泻或其他 MMF 相关胃肠不利作用的受试者（例如症状充分评估并且视为不具有除对 MMF 不耐受以外的病因），MMF 剂量可以减少至最大耐受剂量。对于发展嗜中性白细胞减少症（绝对嗜中性粒细胞计数 $< 1.3 \times 10^3/\text{L}$ ）的受试者，使用 MMF 的给药应当中断或按照包装插页减少剂量。

巴利昔单抗给药

这项研究中的所有受试者将用巴利昔单抗的推荐给药方案治疗。巴利昔单抗应当只通过外周或中央静脉施用。重构的巴利昔单抗（溶于 5 mL 中的 20 mg）应当用生理盐水或葡萄糖 5% 稀释至 50 mL 的体积并且作为静脉内输注在 20 - 30 分钟内施用。第 1 次 20 mg 剂量应当在第 1 天时（移植当天；手术后第 0 天）施用。对于随机化至 L104EA29YIg 的受试者，这种第 1 次巴利昔单抗输注应当在 L104EA29YIg 输注完成后尽快发生。第 2 次 20 mg 剂量应当在第 5 天时（手术后第 4 天）给予。第 2 次巴利昔单抗剂量不应施用于受试者，如果他们已接受或预期接受淋巴细胞消耗疗法的话。关于另外的信息，参见包装插页。

用于受损的肾同种异体移植物功能和预期 DGF 的多克隆抗淋巴细胞制剂

多克隆抗淋巴细胞制剂（Thymoglobulin 或 ATGAM）的使用对于随机化至 CsA、移植后经历受损的肾同种异体移植物功能和预期 DGF 的患者是允许的 - 但不是必需的。在其中存在市场授权区域内，并且如果它们标明用于治疗肾移植中的急性排斥，则允许使用其他多克隆抗淋巴细胞制剂或多克隆抗胸腺细胞球蛋白。值得注意的是，OKT3 不用于这个目的，但可以用于治疗 Banff 97 IIb 级或更大的急性排斥或抗类固醇急性排斥。Campath 1-H[®]（阿仑单抗（alemtuzumab））的使用在这种方案中是不允许的，因为它没有标明用于在肾移植中使用。这些试剂以这种能力广泛用于提供免疫抑制，直至移植物功能允许施用 CsA。因此，在这种临床情况中可以由研究者自行决定在满足 ≥ 1 个下列标准的受试者中使用多克隆抗淋巴细胞制剂，所述标准在存在移植物动脉和静脉未闭，并且通过声波图没有肾积水的证据的情况下观察到：a) 尿排出量 < 250 cc/12 小时 b) SCr 从基线值经过移植后的前 24 - 72 小时没有显著改善 (< 1 mg/dL) c) 透析治疗。用于受损的肾同种异体移植物功能和预期 DGF 的这些试剂的使用在 L104EA29YIg 治疗的受试者中是不允许的。

新诺明/甲氧苄啶给药

参与这项研究、没有禁忌症的所有受试者都应当接受新诺明/甲氧苄啶预防以防止泌尿道和卡氏肺孢子虫 (*Pneumocystis carinii*) 感染。给药和施用将由与包装插页一致的肾功能水平决定。具有针对磺胺药或甲氧苄啶的禁忌症或不耐受的受试者可以由研究者自行决定接受使用吸入的戊烷脒的预防治疗。关于完整的处方信息, 参见包装插页。

瓦更昔洛韦/更昔洛韦, 阿昔洛韦/伐昔洛韦给药

没有针对瓦更昔洛韦、更昔洛韦、阿昔洛韦和伐昔洛韦的禁忌症的所有受体都应当用这些药物预防性治疗以防止由于 CMV 和单纯疱疹 (*Herpes simplex*) 的感染。下列是关于预防性治疗的给药和持续时间的指南:

用于移植后的前 10 天或在 T 细胞消耗疗法过程中的预防: 所有移植受试者都将根据关于手术后 10 天的方案接受瓦更昔洛韦或更昔洛韦。如果使用关于诱导治疗的 T 细胞消耗疗法或关于急性排斥的治疗方法, 那么受试者对于 T 细胞消耗疗法的持续时间将接受瓦更昔洛韦或更昔洛韦。如果受试者在 10 天前出院, 那么将如下文所述基于 CMV 免疫状态开始经口瓦更昔洛韦、更昔洛韦、伐昔洛韦或阿昔洛韦。

用于预防的瓦更昔洛韦: 肌酸酐清除率 ≥ 60 mL/分钟, 剂量 900 mg 每日; 肌酸酐清除率 40 - 59 mL/分钟, 剂量 450 mg 每日; 肌酸酐清除率 < 40 mL/分钟, 剂量 450 mg 每隔一日。

用于预防的更昔洛韦: 如果受试者不能耐受经口药物, 或者瓦更昔洛韦不能用于使用, 那么更昔洛韦悬浮液或胶囊可以代替。肌酸酐清除率 ≥ 70 mL/分钟, 剂量 1 g 每天 3 次; 肌酸酐清除率 50 - 69 mL/分钟, 剂量 500 mg 每天 3 次; 肌酸酐清除率 25 - 49 mL/分钟, 剂量 500 mg 每天 2 次; 肌酸酐清除率 10 - 24 mL/分钟, 剂量 500 mg 每日; 肌酸酐清除率 < 10 mL/分钟, 剂量 500 mg, 血液透析后 3 次/周。如果需要静脉内更昔洛韦, 那么参见包装插页用于给药。

移植后 10 天后到至少 3 个月的预防: CMV 抗体血清反应阳性供体对 CMV 抗体血清反应阴性受体: 上文列出的瓦更昔洛韦或更昔洛韦方案持续 ≥ 3 个月。

CMV 抗体血清反应阳性或血清反应阴性供体对 CMV 抗体血清反应阳性受体：经口阿昔洛韦 ≥ 移植后 3 个月：血清肌酸酐 ≥ 50 mL/分钟，剂量 800 mg 经口每天 4 次；血清肌酸酐 25 - 49 mL/分钟，剂量 800 mg 经口每天 3 次；血清肌酸酐 11 - 24 mL/分钟，剂量 800 mg 经口每天 2 次；血清肌酸酐 < 10 mL/分钟，剂量 800 mg 经口每日；对于血液透析，血液透析后剂量 800 mg 每日。

在出院时为了受试者方便伐昔洛韦可以代替阿昔洛韦。血清肌酸酐 ≥ 50 mL/分钟，剂量 500 mg 经口每天 2 次；血清肌酸酐 25 - 49 mL/分钟，剂量 500 mg 经口每日；血清肌酸酐 11 - 24 mL/分钟，剂量 500 mg 经口每日；血清肌酸酐 < 10 mL/分钟，剂量 250 mg 经口每日；对于血液透析，血液透析后剂量 250 mg 每日。

CMV 抗体血清反应阴性供体对 CMV 抗体血清反应阴性受体：经口阿昔洛韦方案只对于疱疹预防需要：持续 ≥ 移植后 3 个月。阿昔洛韦 400 mg 口服每天 2 次，或在出院时为了患者方便伐昔洛韦可以代替阿昔洛韦。关于完整的处方信息，参考包装插页。

仅输注就诊操作

a) 对于随机化至 L104EA29YIg 治疗的受试者：在 L104EA29YIg 施用前要求阴性妊娠测试。剂量基于最近的先前研究就诊时的受试者重量。应当监控受试者的生命体征（输注前和后），并且应当评估 AEs。在某些就诊时可能需要 PK 样品。

b) 对于随机化至 CsA 治疗的受试者：受试者应当只对于 AEs 评估进行联系。这种就诊可以是电话联系，并且应当在关于指定就诊开处的就诊窗口内发生。

就诊窗口

a) 对于随机化至 L104EA29YIg 治疗的受试者：第 1 天和第 5 天的剂量应当隔开大约 96 小时（± 6 小时）施用。为了促进仅输注就诊的时间安排，下列窗口对于后续剂量是允许的：就诊第 2 周，就诊窗口靶日期 ± 2 天；就诊第 4 周 - 第 6 个月就诊窗口靶日期 ± 3 天，就诊第 7 个月 - 第 36 个月，就诊窗口靶日期 ± 5 天；就诊随访 8 周，就诊窗口靶日期 ± 5 天。

b) 对于随机化至 CsA 治疗的受试者：第 5 天后，受试者只需要参加第 2、4、8 和 12 周的临床就诊；随后每 3 个月时间间隔的就诊。在非 3 个月时间间隔的就诊时（即，第 6、10、16、20、28、32 周等），将进行电话联系以收集 AE 信息。临床和联系就诊应当在与上文指定的关于随机化至 L104EA29YIg 的受试者相同的就诊窗口发生。关于第 3 和 12 个月 GFR 评估的靶日期是第 12 周 $\pm$ 14 天和第 52 周 $\pm$ 14 天。在某些情况下，且使用先前批准的医学监控，在第 3 个月和 12 个月时测量的 GFR 评估可以分别到第 6 个月和 15 个月进行。可以使测量的 GFR 评估延长有正当理由的此类原因包括同时发生的急性排斥发作的存在或由于技术原因需要重复评估。

关于第 12 个月的同种异体移植物活组织检查的靶日期是第 52 周 $\pm$ 14 天。类似地，在某些情况下且使用先前批准的医学监控，同种异体移植物活组织检查可以到第 15 个月获得。可以使同种异体移植物活组织检查延长有正当理由的此类原因包括关于抗凝作用的临时需要。

实施例 5

本领域技术人员可以利用上文实施例 4 中描述的施用时间表以设计包括不同研究群体、供体标准和/或目的的研究。例如，这项移植研究将评估接受来自活供体或已故供体、预期冷缺血时间 <24 小时的肾移植的受试者。各种免疫学危险水平上的受试者将是合格的。然而，该研究将排除最大的免疫学危险的受试者。受试者将如上文实施例 4 中所述随机化至 MI、LI 或 CsA 组。

初级目的

评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对 12 个月的受试者和移植物存活复合的作用。评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12 个月时测量的 $\text{GFR} < 60 \text{ mL/分钟/1.73 m}^2$ 或从第 3 个月到第 12 个月测量的 GFR 减少 $\geq 10 \text{ mL/分钟/1.73 m}^2$ 复合的作用。评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对 12 个月的急性排斥发生率的作用。

次级目的

评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12 个月时测量的 GFR 的作用。评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12 个月时的活组织检查证明的 CAN 的作用。评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12 个月时测量的 $\text{GFR} < 60 \text{ mL/分钟/1.73 m}^2$ 或从第 3 个月到第 12 个月测量的 GFR 减少 $\geq 10 \text{ mL/分钟/1.73 m}^2$ 的初级复合终末点中个别组分的作用。评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对 12、24 和 36 个月的死亡、移植物丢失和急性排斥的三重复合终末点的作用。评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 24 个月时测量的 $\text{GFR} < 60 \text{ mL/分钟/1.73 m}^2$ 的受试者比例的作用。评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 3 和 24 个月时测量的 GFR，以及从基线（3 个月）到 12 和到 24 个月的变化作用。评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12 和 24 个月时测量的 $\text{GFR} < 30 \text{ mL/分钟/1.73 m}^2$ 的受试者比例的作用。评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 6、12、24 和 36 个月时计算的 GFR，以及从 6 个月到 12、24 和 36 个月的变化作用。评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对 12、24 和 36 个月的 PTDM 的作用。评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12、24 和 36 个月时高血压测量的作用，包括 SBP 和 DBP、高血压和受控制的高血压的发生率和流行率、以及治疗方案的强度。评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12、24 和 36 个月时血脂异常测量的作用，包括血清总、非 HDL、低密度脂蛋白（LDL）和 HDL 胆固醇和 TGs，血脂异常和受控制的血脂异常的发生率和流行率，以及治疗方案的强度。评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对 24 和 36 个月的受试者和移植物存活的作用。评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 24 和 36 个月时计算的 $\text{GFR} < 60 \text{ mL/分钟/1.73 m}^2$ 的受试者比例的作用。评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对 6、12、24 和 36 个月时急性排斥测量的作用，包括急性排斥的发生率和严重性、用于受损的肾功能和预期移植物功能延迟（DGF）的多克隆抗淋巴细胞制剂的使用、用于治疗急性排斥的淋巴细胞消耗疗法的最初使用、抗类固醇急性排斥的发生率、急性排斥后完全恢复（SCr 回到基线）的发生率、亚临床性排斥的发生率、以及不管组织学发现所有治疗的急性排斥发作的发生率，以及急性排斥发作的时间。评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对 QoL 的作用。评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 的总体安全性。评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对从 3 个月到 12、24 和 36 个月计算的 GFR

的斜率和截距的作用。评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12 个月时计算的 GFR < 60 mL/分钟/1.73 m² 的受试者，或从第 3 个月到第 12 个月计算的 GFR 减少至少 10 mL/分钟/1.73 m² 的受试者比例的作用。评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对 DGF 发生率的作用。评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12 和 24 个月时如通过测量的 GFR 评估，具有 1 期到 5 期慢性肾脏疾病的受试者比例的作用。评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 36 个月时如通过计算的 GFR 评估，具有 1 期到 5 期慢性肾脏疾病的受试者比例的作用。评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对 12、24 和 36 个月的复合心血管疾病终末点（判定的心血管性死亡、心肌梗死、缺血性发作、和血管再通[外科手术或经皮]操作）的作用。评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对 12、24 和 36 个月的复合心肾疾病终末点（死亡、移植物丢失、非致命性心肌梗死和中风）的作用。评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对在 12、24 和 36 个月时 Framingham 危险评分的作用。评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对研究药物中断发生率的作用。评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对抗供体人白细胞抗原（HLA）抗体的作用。评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对血管紧张素 II 1 型（AT1）-受体抗体的作用。评估 L104EA29YIg 相对于 CsA 对活组织检查样品中 C4d 阳性的作用。

研究设计

该研究的持续时间是 3 年，随后是关于安全性评估的 8 周随访期。这是随机化、半盲、活性对照、平行组研究。所有受试者都将接受来自预期 CIT < 24 小时的活供体或已故供体的肾移植。

大约 660 名受试者将以 1:1:1 的比率随机化至使用 L104EA29YIg（MI 方案）、L104EA29YIg（LI 方案）或 CsA 的治疗。所有受试者还将接受使用巴利昔单抗的诱导，以及 MMF 和皮质类固醇的背景维持免疫抑制方案。随机化至 MI 方案的受试者将接受第 1 和 5 天时，随后每 2 周到第 3 个月（第 2、4、6、8、10 和 12 周），以及随后每 4 周到第 6 个月（第 16、20 和 24 周）的静脉内 L104EA29YIg（10 mg/kg）。6 个月后，MI 治疗组中的受试者将接受每 4 周施用的 L104EA29YIg 5 mg/kg 的维持剂量，直至 36 个月时试验完成。随机化至 LI 方案的受试者将接受第 1 和 5 天时，以及随后每 2 周到第 1 个

月（第 2 和 4 周），以及每 4 周到第 3 个月（第 8 和 12 周）的静脉内 L104EA29YIg（10 mg/kg）。3 个月后，LI 治疗组中的受试者将接受每 4 周施用的 L104EA29YIg 5 mg/kg 的维持剂量，直至 36 个月时试验完成。LI 和 MI 组之间的不知情借助于在第 6 和 10 周时 LI 治疗组中的安慰剂输注来保持。随机化至 CsA 的受试者将接受每天 2 次的剂量，其设计为达到与目前医疗实践一致的指定谷血清浓度范围。L104EA29YIg 的安全性和功效将在 1、2 和 3 年时评估。独立的 DSMB 将在正在进行的基础上再检查来自研究的数据，并在必要时作出关于改变试验进行的建议。

研究群体

研究群体包括来自预期 CIT < 24 小时的活供体或已故供体的肾同种异体移植物的受体。一般地，免疫学标准在受试者选择中将不起主要作用。各种免疫学危险水平上的受试者是合格的。然而，该研究将排除最大的免疫学危险的受试者（交叉配型阳性、目前系列反应性抗体[PRA]≥50%，或目前 PRA≥30%的先前移植的那些）。这些受试者可能需要减少其抗体负荷的治疗，例如血浆去除术，这超出这种方案的范围。受试者将在全球大约 100 个地点入选。

包括标准

靶群体：1）受试者是预期 CIT < 24 小时的活供体或已故供体肾移植的受体 2）男性和女性，年龄 18 或更大，包含性的 3）WOCBP 必须使用适当的避孕方法以以这样的方式避免整个研究期间以及研究后最高达 8 周怀孕，从而使得怀孕的危险最小化。WOCBP 包括已经历月经初潮并且未经历成功的外科手术绝育（子宫切除术、两侧输卵管结扎或双侧卵巢切除术）或不是绝经后（定义为闭经连续 12 个月；或使用激素代替疗法[HRT]的女性，其具有文件证明的血清促卵泡激素[FSH]水平>35 mIU/mL）的任何女性。甚至使用经口、植入或可注射的避孕激素或机械产品例如宫内器具或障碍方法（隔膜、避孕套、杀精子剂）以预防怀孕或实行节欲或其中配偶不育（例如输精管切除术）的女性都应当视为有分娩的可能性。WOCBP 必须具有在研

究药物开始前 72 小时内的阴性血清妊娠测试(最小灵敏度 25 IU/L 或人绒毛膜促性腺激素[HCG]的等价单位)。

排除标准

1) 不愿意或不能使用可接受的方法以避免整个研究时间段以及最后输注后最高达 8 周怀孕的 WOCBP。2) 怀孕或进行母乳喂养的女性。3) 在入选时或在研究药物施用前妊娠测试阳性的女性。4) 遗传上相同的供体受体对(即单卵双生)。5) 供体年龄<10 岁。6) 接受和扩大标准的供体器官的受试者,其如下定义: a) 供体年龄≥60 岁或 b) 供体年龄 50 - 59 岁以及下列之一: (i) 脑血管意外(CVA)+高血压+SCr > 1.5 mg/dL 或 (ii) CVA+高血压或 (iii) CVA+SCr > 1.5 mg/dL 或 (iv) 高血压+SCr > 1.5 mg/dL 或 c) 预期 CIT ≥24 小时或 d) 心源性死亡的供体(无心跳供体)。7) 具有下列潜在肾病的受试者: a) 原发性局灶性节段性肾小球硬化症 b) I 或 II 型膜性增生性肾小球肾炎 c) 溶血性尿毒性综合征(HUS)/血栓形成性血小板减少性紫癜综合征。如果受试者具有病因不明的 ESRD 和/或没有组织学证实的诊断,那么受试者将入选该研究,只要如研究者判断的,没有与原发性局灶性节段性肾小球硬化症、I 或 II 型膜性增生性肾小球肾炎或 HUS 的临床诊断一致的临床病征或症状。8) 经历初次(第 1 次)移植目前 PRA ≥ 50% 的受试者,或经历再次移植 PRA ≥ 30% 的受试者。9) 由于急性排斥先前移植物丢失的受试者。10) T 细胞淋巴细胞毒性交叉配型阳性的受试者。11) 具有先前非肾实体器官移植(在其他研究标准满足前经历肾再次移植的受试者是合格的),或经历多器官移植(例如肾-胰)的受试者,或由研究者认为在接下来的 3 年内可能具有第 2 次实体器官或细胞移植(例如胰或胰岛移植)的受试者。12) 接受同时发生的实体器官(心脏、肝、胰)或细胞(胰岛、骨髓、干细胞)移植的受试者。13) 接受成对肾的受试者(双或全肾移植)。14) 已知丙型肝炎抗体阳性或关于丙型肝炎的聚合酶链反应(PCR)阳性的受试者。15) 已知乙型肝炎表面抗原阳性或关于乙型肝炎的 PCR 阳性的受试者。16) 已知人免疫缺陷病毒(HIV)感染的受试者。17) 在前 3 年内具有需要治疗的活动性结核(TB)的受试者或先前需要关于 TB 的三重(或更多)组合治疗的任何受试者。已知纯化的蛋

白衍生物 (PPD) 阳性的受试者对于研究将是不合格的, 除非他们完成关于潜伏 TB 的治疗并且在入选时具有阴性胸部 X 射线检查。在最后 12 个月内进行的 PPD 测试是可接受的, 只要存在结果的文件证明。具有先前的阴性结果、在最后 12 个月中没有 PPD 的受试者可以入选, 如果他们在入选时还具有阴性胸部 X 射线检查, 没有 TB 指示的症状, 没有已知的 TB 接触, 目前没有居住在 TB 地方性流行区域、近期没有去所述区域旅游、或先前不是从所述区域移来的话。 ≤ 10 mm 硬结的 PPD 应答或在非卡介苗 (非 BCG) 免疫受试者中 > 1 或在 BCG 免疫受试者中 > 2 的 Heaf 得分应当视为阳性测试。根据公布的指南和/或由医疗协会认可的地方标准可以应用更保守的标准。18) 具有活性感染或通常将排除移植的其他禁忌症的受试者。19) 生命期望受疾病状态或其他潜在医学状况严格限制的受试者。20) 在最后 5 年内具有癌症史 (通过局部切除术治愈的除非黑素瘤皮肤细胞癌外的) 的受试者。21) 在过去 5 年内具有物质滥用 (药物或酒精) 史, 或与适当的研究随访不相容的精神病症的受试者。22) 具有活性消化性溃疡病、慢性腹泻或胃肠吸收不良的受试者。

关于 L104EA29YIg MI 和 LI 以及 CsA 方案的施用和就诊窗口, 包括所需的列表, 将如上文和实施例 4 中描述的。

如对于本发明所属领域的技术人员将显而易见的, 在不背离本发明的精神或基本特征的情况下, 本发明可以以除上文具体公开的那些以外的形式具体化。因此上文描述的本发明的具体实施方案视为说明性而不是限制性的。本发明的范围如附加权利要求中阐述的而不是限制于前述说明书中包含的实施例。

<110> Bristol-Myers Squibb Company
Hagerty, David
Rusnak, James

<120> 使用可溶性 CTLA4 突变型分子治疗与移植物移植有关的免疫病症的方法

<130> 10522A PCT

<160> 10

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 41

<212> DNA

<213> 人 T 序列

<220>

<223> 制瘤素 M CTLA4 (OMCTLA4) 正向引物

<400> 1

gaggtagataa agcttcacca atgggtgtac tgctcacaca g

41

<210> 2

<211> 42

<212> DNA

<213> 人 T 序列

<220>

<223> 制瘤素 M CTLA4 (OMCTLA4) 反向引物

<400> 2

gtgggtgtatt ggtctagatc aatcagaatc tgggcacggt tc

42

<210> 3

<211> 1152

<212> DNA

<213> 人 T 序列

<220>

<223> L104EA29YIg

<400> 3

atgggtgtac tgctcacaca gaggacgtg ctcagtctgg tccttgcaact cctgtttcca	60
agcatggcga gcatggcaat gcacgtggcc cagcctgctg tggactggc cagcagccga	120
ggcatcgcta gctttgtgtg tgagtatgca tctccaggca aatatactga ggtccgggtg	180
acagtgcttc ggcaggtga cagccagggtg actgaagtct gtgcggcaac ctacatgatg	240
gggaatgagt tgaccttcct agatgattcc atctgcacgg gcacctccag tggaaatcaa	300
gigaacctca ctatccaagg actgagggcc atggacacgg gactctacat ctgcaagggtg	360
gagctcatgt acccaccgcc atactacgag ggcataggca acggaacca gatttatgta	420
attgatccag aaccgtgccc agattctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac	480
acatccccac cgtccccagc acctgaactc ctggggggat cgtcagtctt cctcttcccc	540
ccaaaacca aggacacct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg	600
gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg	660
cataatgcca agacaaagcc gcgaggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc	720
gtctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagt caaggtctcc	780
aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga	840
gaaccacagg tgtacacct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc	900
ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat	960
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgctg tggactccga cggtctcttc	1020
ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca	1080
tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct	1140
ccgggtaaat ga	1152

<210> 4

<211> 383
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> L104EA29YIg

<400> 4

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
 1 5 10 15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
 20 25 30

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
 35 40 45

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
 50 55 60

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
 65 70 75 80

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
 85 90 95

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
 100 105 110

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
 115 120 125

Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
 130 135 140

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
145 150 155 160

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
165 170 175

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
180 185 190

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
195 200 205

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
210 215 220

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
225 230 235 240

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
245 250 255

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
260 265 270

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
275 280 285

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
290 295 300

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
305 310 315 320

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
325 330 335

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
340 345 350

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
355 360 365

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375 380

<210> 5
<211> 1152
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> L104EIg

<400> 5
atgggtgtac tgctcacaca gaggacgctg ctcagtcctgg tccttgcaact cctgtttcca 60
agcatggcga gcatggcaat gcacgtggcc cagcctgctg tggactggc cagcagccga 120
ggcatcgcta gctttgtgtg tgagtatgca tctccaggca aagccactga ggtccgggtg 180
acagtgcctc ggcaggctga cagccagggtg actgaagtct gtgcggcaac ctacatgatg 240
gggaatgagt tgaccttctt agatgattcc atctgcacgg gcacctccag tggaaatcaa 300
gtgaacctca ctatccaagg actgagggcc atggacacgg gactctacat ctgcaagggtg 360
gagctcatgt acccaccgcc atactacgag ggcataggca acggaacca gatttatgta 420
attgatccag aaccgtgccc agattctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 480
acatccccac cgtccccagc acctgaactc ctgggggggat cgtcagtcctt cctcttcccc 540

ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccttg aggtcacatg cgtggtggtg 600
gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 660
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 720
gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 780
aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 840
gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 900
ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 960
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1020
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1080
tgcgccgiga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1140
ccgggtaaatt ga 1152

<210> 6
<211> 383
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> L104Elg

<400> 6

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
1 5 10 15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
20 25 30

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
35 40 45

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
50 55 60

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
65 70 75 80

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
85 90 95

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
100 105 110

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
115 120 125

Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
130 135 140

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
145 150 155 160

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
165 170 175

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
180 185 190

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
195 200 205

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
210 215 220

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
225 230 235 240

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
245 250 255

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
260 265 270

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
275 280 285

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
290 295 300

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
305 310 315 320

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
325 330 335

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
340 345 350

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
355 360 365

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375 380

<210> 7

<211> 1152

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CTLA4Ig

<400> 7

atgggtgtac tgctcacaca gaggacgtg ctcagtctgg tccttgcaact cctgtttcca	60
agcatggcga gcatggcaat gcacgtggcc cagcctgtg tggtactggc cagcagccga	120
ggcatcgcta gctttgtgtg tgagtatgca tctccaggca aagccactga ggtccgggtg	180
acagtgttc ggcaggctga cagccagggt actgaagtct gtgcggcaac ctacatgatg	240
gggaatgagt tgaccttctt agatgattcc atctgcacgg gcacctccag tggaaatcaa	300
gtgaacctca ctatccaagg actgagggcc atggacacgg gactctacat ctgcaaggtg	360
gagcicatgt acccaccgcc atactacctg ggcataggca acggaacca gatttaigta	420
attgatccag aaccgtgccc agattctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac	480
acatccccac cgtccccagc acctgaactc ctgggtggat cgtcagtctt cctcttcccc	540
ccaaaacca aggacacct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg	600
gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg	660
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg ggtggtcagc	720
gtcttcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc	780
aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga	840
gaaccacagg tgtacacct gcccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc	900
ctgacctgcc tggicaaagg ctctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat	960
gggcagccgg agaacaacta caagaccag cctcccgctg ttgactccga cggtccttc	1020
ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca	1080
tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct	1140

ccgggtaaat ga

1152

<210> 8

<211> 383

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CTLA4Ig

<400> 8

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
 1 5 10 15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
 20 25 30

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
 35 40 45

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
 50 55 60

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
 65 70 75 80

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
 85 90 95

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
 100 105 110

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
 115 120 125

Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
130 135 140

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
145 150 155 160

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
165 170 175

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
180 185 190

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
195 200 205

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
210 215 220

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
225 230 235 240

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
245 250 255

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
260 265 270

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
275 280 285

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
290 295 300

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
305 310 315 320

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
325 330 335

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
340 345 350

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
355 360 365

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375 380

<210> 9
<211> 636
<212> DNA
<213> 智人 (Homo Sapiens)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(636)

<220>
<221> mat_peptide
<222> (79)..()

<400> 9
atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca 48
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
-25 -20 -15

ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct 96
Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10 -5 -1 1 5

gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gcc agc ttt gtg tgt gag	144
Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu	
10 15 20	
tat gca tct cca ggc aaa gcc act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg	192
Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg	
25 30 35	
cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg	240
Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met	
40 45 50	
ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc	288
Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser	
55 60 65 70	
agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac	336
Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp	
75 80 85	
acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac	384
Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr	
90 95 100	
tac ctg ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa	432
Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu	
105 110 115	
ccg tgc cca gat tct gac ttc ctc ctc tgg atc ctt gca gca gtt agt	480
Pro Cys Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser	
120 125 130	
tcg ggg ttg ttt ttt tat agc ttt ctc ctc aca gct gtt tct ttg agc	528
Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser	
135 140 145 150	
aaa atg cta aag aaa aga agc cct ctt aca aca ggg gtc tat gtg aaa	576
Lys Met Leu Lys Lys Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys	
155 160 165	
atg ccc cca aca gag cca gaa tgt gaa aag caa ttt cag cct tat ttt	624
Met Pro Pro Thr Glu Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe	
170 175 180	

att ccc atc aat 636
Ile Pro Ile Asn
185

<210> 10
<211> 212
<212> PRT
<213> 智人 (Homo Sapiens)

<400> 10

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
-25 -20 -15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10 -5 -1 1 5

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
10 15 20

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
25 30 35

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
40 45 50

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55 60 65 70

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
75 80 85

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
90 95 100

Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
105 110 115

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser
120 125 130

Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser
135 140 145 150

Lys Met Leu Lys Lys Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys
155 160 165

Met Pro Pro Thr Glu Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe
170 175 180

Ile Pro Ile Asn
185

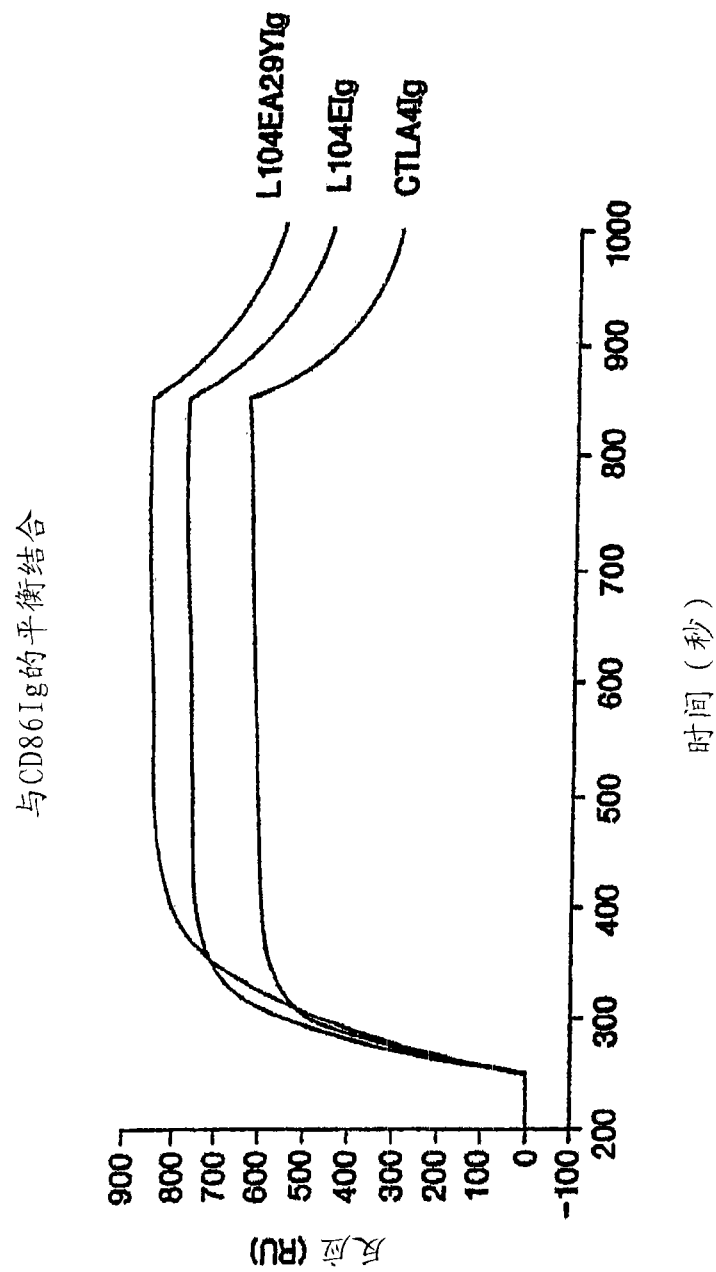


图 1

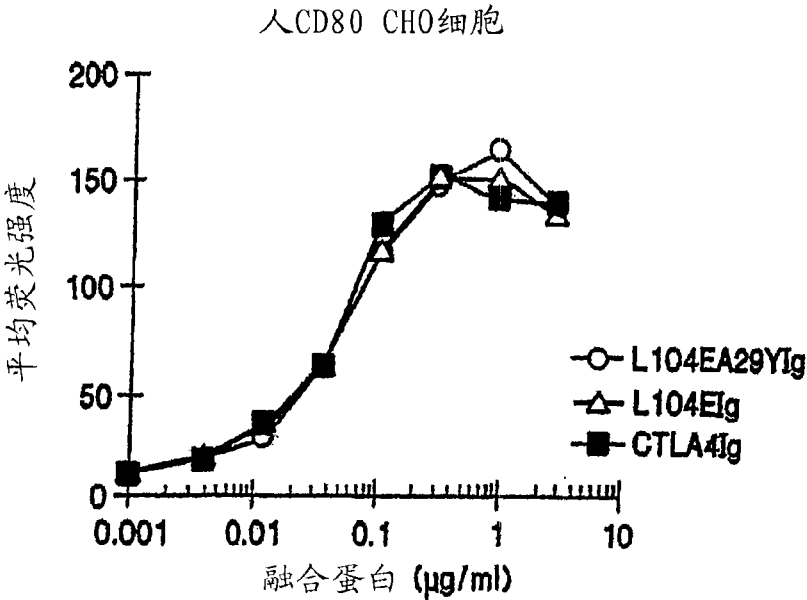


图 2A

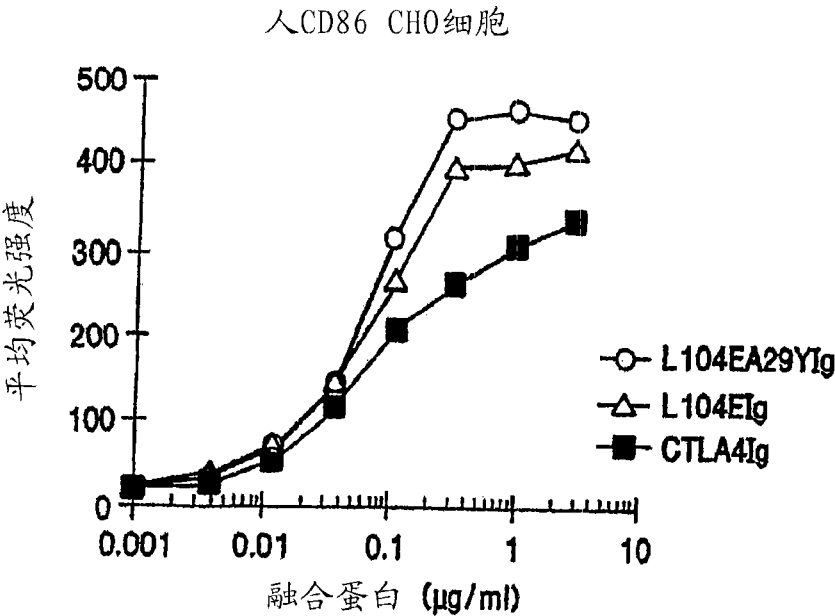


图 2B

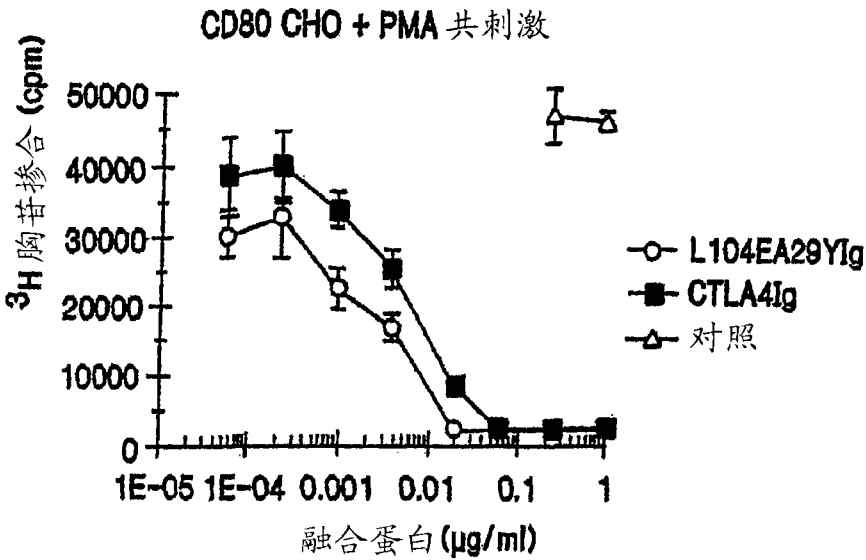


图 3A

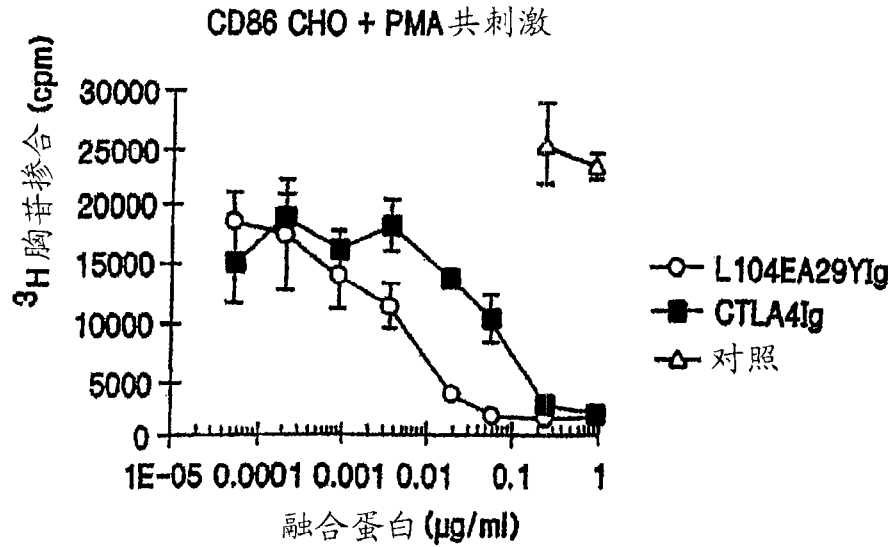


图 3B

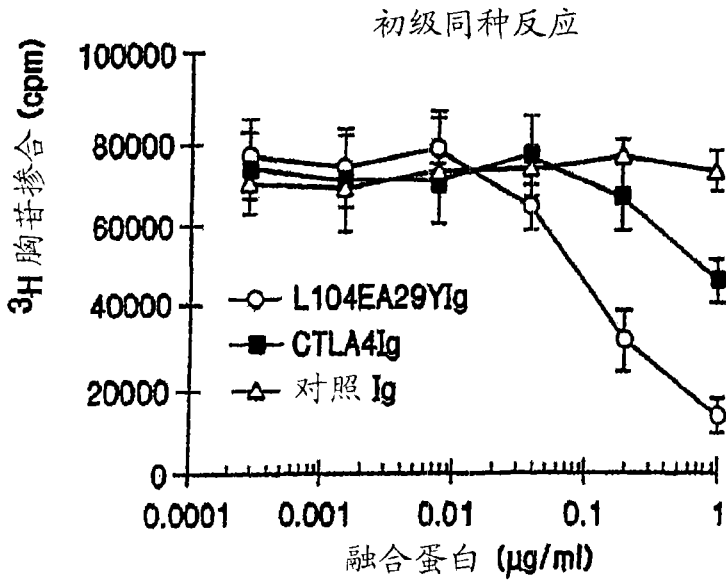


图 4A

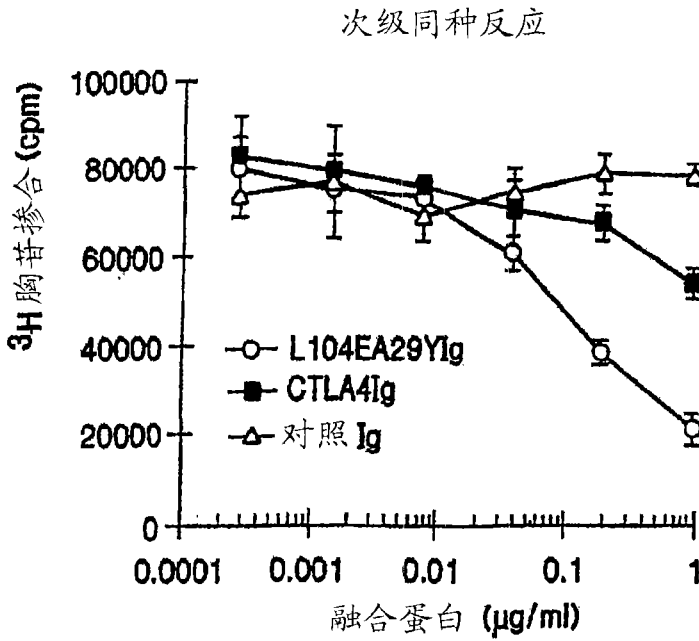


图 4B

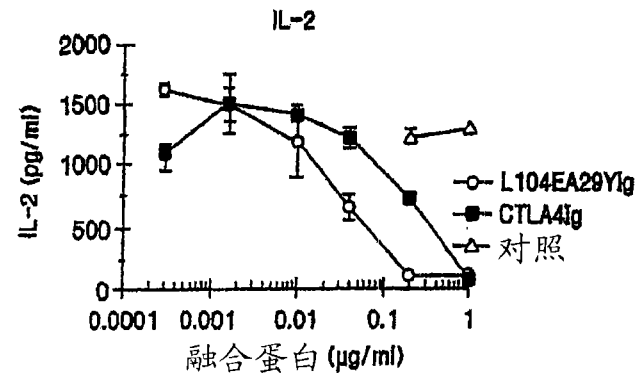


图 5A

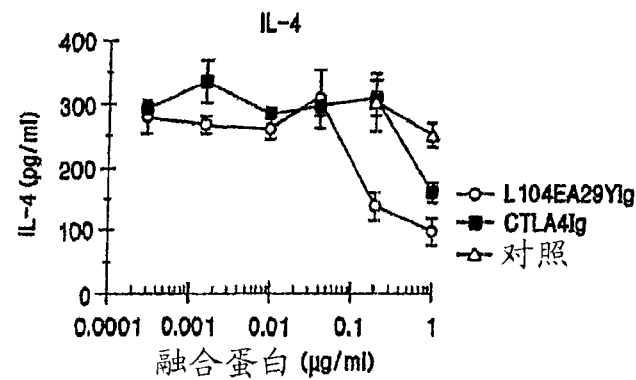


图 5B

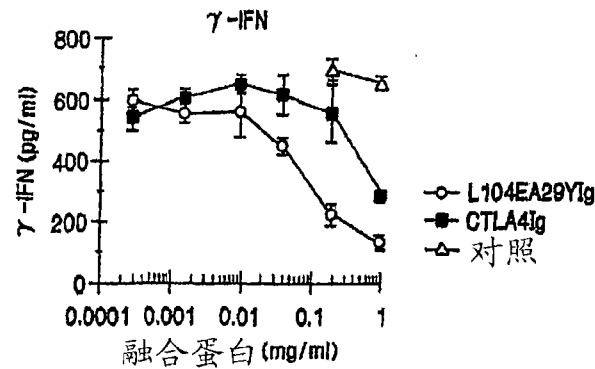


图 5C

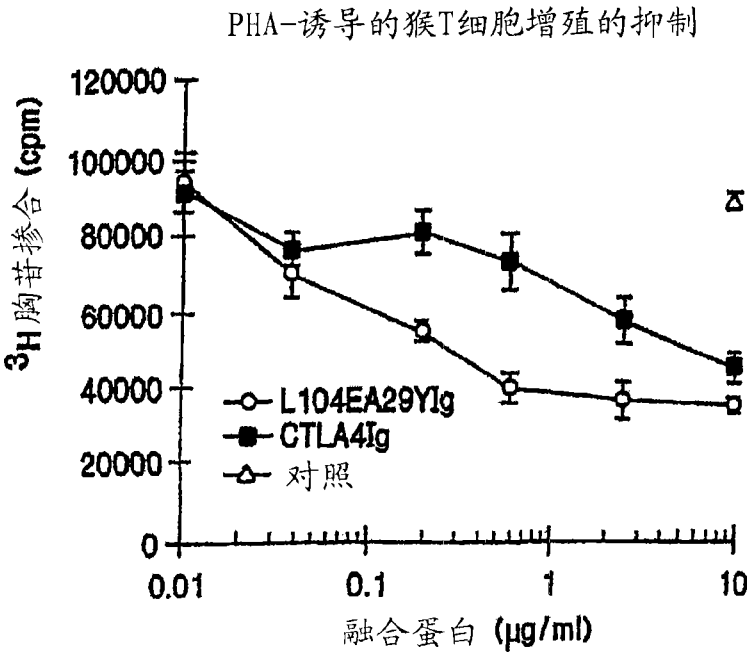


图 6

ATGGGTGTA CTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCA	-19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P--	-7
AGCATGGCGAGCATGGCAATGCAAGTGGCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA	+42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--F--A--V--V--L--A--S--S--R--	+14
+1	
GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTOCAGGCAATATACTGAGGTCCGGGTG	+102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--Y--T--E--V--R--V--	+34
ACAGTGCCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG	+162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--	+54
GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA	+222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--	+74
GTGAACCTCAGTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG	+282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--	+94
GAGCTCATGTATCCACCCCATACTACGAGGGCATAGGCAACGGAAACCCAGATTTATGTA	+342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--	+114
ATTGATCCAGAACCGTGCCTCAGATTCTGATCAGGAGCCCAATCTTCTGACAAAACCTCAC	+402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--	+134
ACATCCCCACCGTCCCGAGCAGCTGAATCCTGGGGGATCGTCAGTCTTCTCTCCCC	+462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P--	+154
CCAAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTG	+522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--	+174
GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG	+582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V--	+194
CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGTCAGC	+642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--	+214
GTCTTCACCGTCTGCAACAGGACTGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC	+702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--	+234
AACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCAGCCCCGA	+762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--	+254
GAACCAAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGC	+822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--	+274
CTGACCTCGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT	+882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--	+294
GGGCAGCCCGAGAACTACTAAGACCAAGCCTCCCGTGTCTGACTCCGACGGCTCCTTC	+942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--	+314
TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA	+1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S--	+334
TGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACAGCAGAGAGCCTCTCCCTGTCT	+1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--	+354
CCGGGTAAATGA	
P--G--K--*	

图 7

ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCTTGCACTCCTGTTTCCA	-19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--F--	-7
AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCAGCCTGCTGTTGTTACTGGCCAGCAGCCGA	+42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--	+14
+1	
GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGATATGCATCTCCAGGCAAAGCCACTGAGGTCCGGGTG	+102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--F--G--K--A--T--E--V--R--V--	+34
ACAGTGTCTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGGGCAACCTACATGATG	+162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--	+54
GGCAATGAGTTGACCTTCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA	+222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--	+74
GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG	+282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--	+94
GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACCTGGGCATAGGCAACGGAAACCAGATTTATGTA	+342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--L--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--	+114
ATTGATCCAGAAACCGTCCCGCAGATTCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAACTCAC	+402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--	+134
ACATCCCCACCGTCCCGCAGCACTGAACTCCTGGGTGGATCGTCACTCTTCTCTTCCCC	+462
T--S--F--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P--	+154
CCAAACCCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAATGCGTGGTGGTG	+522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--	+174
GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG	+582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V--	+194
CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGC	+642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--	+214
GTCCTCACCGTCTTGCAACGAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC	+702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--	+234
AACAAAGCCCTCCCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA	+762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--L--S--K--A--K--G--Q--P--R--	+254
GAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTGAGC	+822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--	+274
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT	+882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--	+294
GGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTC	+942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--Y--L--D--S--D--G--S--F--	+314
TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGAGGGGAACGTCTTCTCA	+1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S--	+334
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT	+1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--	+354
CCGGGTAAATGA	
P--G--K--*	

ATGGGTGTACTGCTCACAAGAGGACGGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCA	-19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P--	-7
AGCATGGGAGCATGGCAATGCACGTGGCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA	+42
S--M--A--S--M--A--N--H--V--A--Q--F--A--V--V--L--A--S--S--R--	+14
+1	
GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGATATGCATCTCCAGGCAAAGCCACTGAGGTCCGGTG	+102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--A--T--E--V--R--V--	+34
ACAGTGTCTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGCAACCTACATGATG	+162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--H--	+54
GGGAATGAGTTGACCTTCTAGATGATTCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAATCAA	+222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--	+74
GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG	+282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--	+94
GAGCTCATGTACCCACGCCATACTACGAGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA	+342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--	+114
ATTGATCCAGAACCGTGCCAGATTCTGATCAGGAGCCAAATCTTCTGACAAAACTCAC	+402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--	+134
ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGATGCTCAGTCTTCTCTTCCCC	+462
T--S--P--F--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P--	+154
CCAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTG	+522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--	+174
GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG	+582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--X--V--D--G--V--E--V--	+194
CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCAAGTACCGTGTGGTCAGC	+642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--	+214
GTCTCTACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC	+702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--	+234
AACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA	+762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--	+254
GAACCAAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTACGC	+822
E--F--Q--V--Y--T--L--P--F--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--	+274
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCGGTGGAGTGGGAGAGCAAT	+882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--	+294
GGGCGCCGGAGAACAACTACAAGACCAAGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTC	+942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--	+314
TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA	+1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S--	+334
TGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACAAGCAGAGAGCCTCTCCCTGTCT	+1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--	+354
CCGGGTAAATGA	
P--G--K--*	

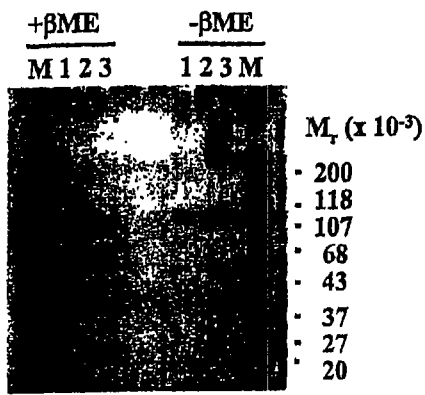


图 10 (A)

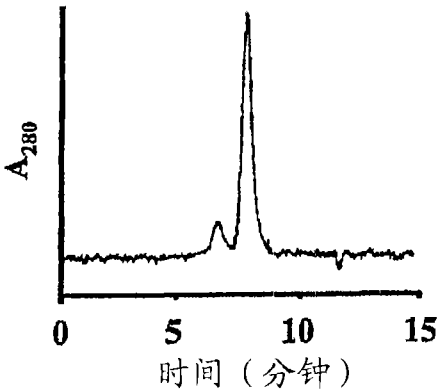


图 10 (B)

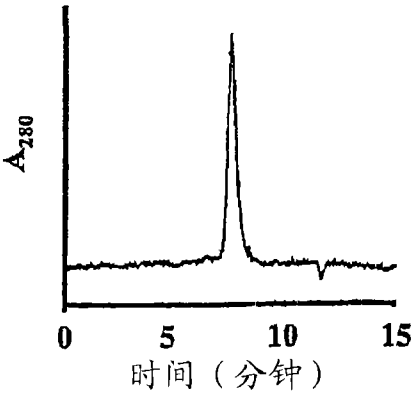


图 10 (C)

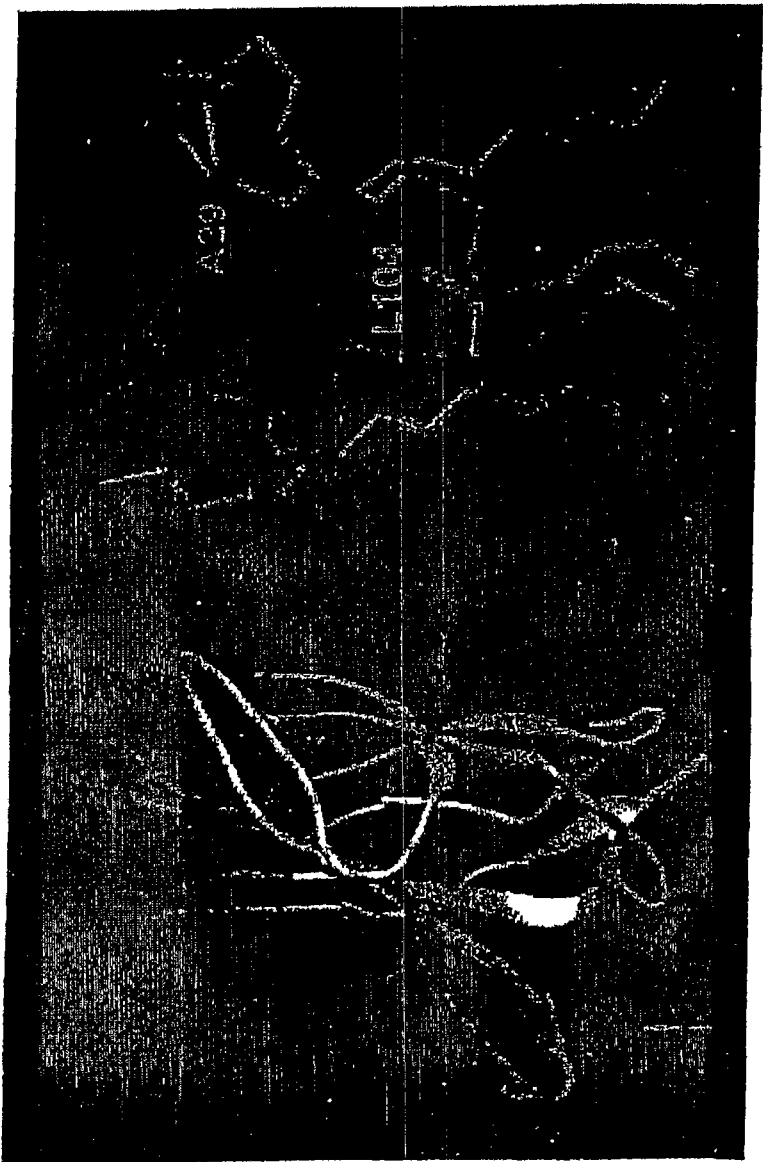


图 11

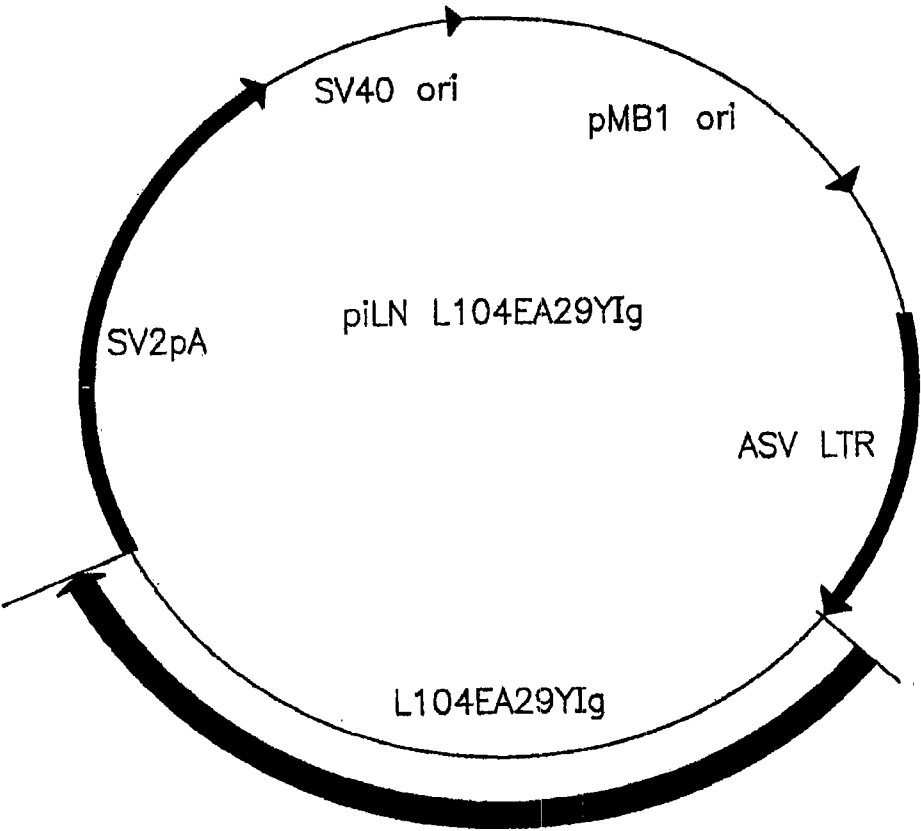


图 12

制瘤素M信号肽

M	G	V	L	L	T	Q	R	T	L	L	S	L	V	L	
ATG	GGT	GTA	CTG	CTC	ACA	CAG	AGG	ACG	CTG	CTC	AGT	CTG	GTC	CTT	
									← -1 +1 →						45
A	L	L	F	P	S	H	A	S	H	A	M	H	V	A	
GCA	CTC	CTG	TTT	CCA	AGC	ATG	GCG	AGC	ATG	GCA	ATG	CAC	GTG	GCC	
															90
Q	P	A	V	V	L	A	S	S	R	G	I	A	S	F	
CAG	CCT	GCT	GTG	GTA	CTG	GCC	AGC	AGC	CGA	GGC	ATC	GCC	AGC	TTT	
															135
V	C	E	Y	A	S	P	G	K	A	T	E	V	R	V	
GTG	TGT	GAG	TAT	GCA	TCT	CCA	GGC	AAA	GCC	ACT	GAG	GTC	CGG	GTG	
															180
T	V	L	R	Q	A	D	S	Q	V	T	E	V	C	A	
ACA	GTG	CTT	CGG	CAG	GCT	GAC	AGC	CAG	GTG	ACT	GAA	GTC	TGT	GCG	
															225
A	T	Y	M	H	G	N	E	L	T	F	L	D	D	S	
GCA	ACC	TAC	ATG	ATG	GGG	AAT	GAG	TTG	ACC	TTC	CTA	GAT	GAT	TCC	
															270
I	C	T	G	T	S	S	G	N	Q	Y	N	L	T	I	
ATC	TGC	ACG	GGC	ACC	TCC	AGT	GGA	AAT	CAA	GTG	AAC	CTC	ACT	ATC	
															315
Q	G	L	R	A	M	D	T	G	L	Y	I	C	K	V	
CAA	GCA	CTG	AGG	GCC	ATG	GAC	ACG	GGA	CTC	TAC	ATC	TGC	AAG	GTG	
									糖基化位点						360
E	L	M	Y	P	P	P	Y	Y	L	G	I	G	N	G	
GAG	CTC	ATG	TAC	CCA	CCG	CCA	TAC	TAC	CTG	GGC	ATA	GGC	AAC	GGA	
															405
T	Q	I	Y	V	I	D	F	E	P	C	P	D	S	D	
ACC	CAG	ATT	TAT	GTA	ATT	GAT	CCA	GAA	CCG	TGC	CCA	GAT	TCT	GAC	
															450
F	L	L	W	I	L	A	A	V	S	S	G	L	F	F	
TTC	CTC	CTC	TGG	ATC	CTT	GCA	GCA	GTT	AGT	TCG	GGG	TTG	TTT	TTT	
															495
Y	S	F	L	L	T	A	V	S	L	S	K	M	L	K	
TAT	AGC	TTT	CTC	CTC	ACA	GCT	GTT	TCT	TTG	AGC	AAA	ATG	CTA	AAG	
															540
K	R	S	P	L	T	T	G	V	Y	V	K	M	P	P	
AAA	AGA	AGC	CCT	CTT	ACA	ACA	GGG	GTC	TAT	GTG	AAA	ATG	CCC	CCA	
															585
T	Z	P	E	C	E	K	Q	F	Q	P	Y	F	I	P	
ACA	GAG	CCA	GAA	TGT	GAA	AAG	CAA	TTT	CAG	CCT	TAT	TTT	ATT	CCC	
															630
I	N													636	
ATC	AAT														

图 13