

Даний винахід стосується розчинного CTLA4, який є мутантним варіантом CTLA4 дикого типу, що зберігає спроможність зв'язувати CD80 і/або CD86.

Антиген-неспецифічні міжклітинні взаємодії між Т-лімфоцитами і клітинами, що презентують антигени (APC), викликають Т-клітинні сигнали, що співстимулюють, які індукують Т-клітинну відповідь на антиген [Jenkins and Johnson (1993) *Curr. Opin. Immunol.* 5: 361-367]. Сигнали, що співстимулюють, визначають величину Т-клітинної відповіді на антиген і те, активує чи інактивує ця відповідь наступні реакції на антиген [Mueller et al. (1989) *Annu. Rev. Immunol.* 7: 445-480].

Активация Т-клітин у відсутність співстимуляції приводить до припинення Т-клітинної відповіді або до анегрічної Т-клітинної відповіді [Schwartz, R. H. (1992) *Cell* 71: 1065-1068]. Один ключовий сигнал, що співстимулює, утворюється при взаємодії рецептора Т-клітинної поверхні CD28 із родинними B7 молекулами на клітинах, що презентують антигени, (відомими також, наприклад, як B7-1 і B7-2 або CD80 і CD86, відповідно) [P. Linsley and J. Ledbetter (1993) *Annu. Rev. Immunol.* 11: 191-212].

Молекула, відома сьогодні як CD80 (B7-1), була спочатку описана як активаційний антиген, пов'язаний із людськими В-клітинами [Yokochi, T. et al. (1981) *J. Immunol.* 128:823-827; Freeman, G. J. et al. (1989) *J. Immunol.* 143: 2714-2722], і який, відповідно, ідентифікується як протирецептор у відношенні до родинних Т-клітинних молекул CD28 і CTLA4 [Linsley, P., et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5031-5035; Linsley, P.S. et al., (1991a) *J. Exp. Med.* 173:721-730; Linsley, P.S. et al. (1991b) *J. Exp. Med.* 174: 561-570].

Пізніше на клітинах, що презентують антигени, був ідентифікований інший протирецептор для CTLA4 [Azuma, N. et al. (1993) *Nature* 366: 76-79; Freeman (1993a) *Science* 262: 909-911; Freeman, G. J. et al. (1993b) *J. Exp. Med.* 178: 2185-2192; Hathcock, K.L.S., et al. (1994) *J. Exp. Med.* 180: 631-640; Lenschow, D. J. et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11054-11058; Ravi-Wolf, Z. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11182-11186; Wu, Y., et al., (1993) *J. Exp. Med.* 178: 1789-1793]. Ця молекула, відома сьогодні як CD86 [Caux, C., et al. (1994) *J. Exp. Med.* 180: 1841-1848], але що зветься також B7-0 [Azuma et al. (1993, див. вище] або B7-2 [Freeman et al. (1993a), див. вище], має послідовність, приблизно, на 25% ідентичну послідовності CD80 на її позаклітинній ділянці [Azuma et al. (1993), див. вище; Freeman et al. (1993a), див. вище, (1993b), див. вище]. Клітини, що трансфікуються молекулами CD86, ініціюють опосередковані CD28 Т-клітинні реакції [Azuma et al. (1993), див. вище; Freeman et al. (1993a), (1993b), див. вище].

Порівняння експресії CD80 і CD86 було предметом декількох досліджень [Azuma et al. (1993), див. вище; Hathcock, et al. (1994), див. вище; Larsen, C.P., et al. (1994) *J. Immunol.* 152: 5208-5219; Stack, R. M., et al., (1994) *J. Immunol.* 152: 5723-5733]. Сучасні дані показують, що експресія CD80 і CD86 регулюється по-різному, і наводять на думку, що експресія CD86 має тенденцію у процесі імунної відповіді передувати експресії CD80.

Розчинні форми CD28 і CTLA4 були створені злиттям варіабельних (v)-подібних позаклітинних областей CD28 і CTLA4 із постійними областями імуноглобуліну (Ig), що дає в результаті CD28Ig і CTLA4Ig. CTLA4Ig зв'язує як CD80-позитивні, так і CD86-позитивні клітини сильніше, ніж CD28Ig [Linsley, P., et al. (1994) *Immunity* 1: 793-80]. Багато серед залежних від Т-клітин імунних реакцій блокуються CTLA4Ig як *in vitro*, так і *in vivo* [Linsley, et al., (1991b), див. вище; Linsley, P.S. et al. (1992a) *Science* 257: 792-795; Linsley, P. S. et al. (1992b) *J. Exp. Med.* 176: 1595-1604; Lenschow, D. J. et al., (1992), *Science* 257: 789-792; Tan, P. et al., (1992) *J. Exp. Med.* 177: 165-173; Turka, L. A., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 11102-11105].

Пітч зі співробітниками [Peach, et al., *J. Exp. Med.* (1994) 180: 2049-2058] ідентифікували ділянки позаклітинної області CTLA4, що є важливими для міцного зв'язування з CD80. Конкретно, гексапептидний мотив (MYPPPY) на ділянці, подібній гіперваріабельній ділянці 3 (CDR3), був ідентифікований як цілком консервативна область в усіх членів сімейства CD28 і CTLA4. Мутагенез із скануванням аланіну за допомогою мотиву MYPPPY у CTLA4 і в обраних залишках CD28Ig послабляє або припиняє зв'язування з CD80.

Були також створені химерні молекули, що взаємодіють із гомологічними ділянками CTLA4 і CD28. Молекули HS4, HS4-A і HS4-B були сконструйовані "пересаджуванням" CDP3-подібних ділянок CTLA4, що містили також частину карбоксильного кінця, продовжену так, щоб включати певні неконсервативні амінокислотні залишки на CD28Ig. Ці гомологічні мутанти проявили більш високу авідність зв'язування з CD80, ніж CD28Ig.

В іншій групі химерних гомологічних мутантів CDRI-подібну ділянку CTLA4, що не є консервативною в CD28 і, як прогнозувалося, просторово прилягає до CDR3-подібної ділянки, "пересаджували" до HS4 і HS4-A. Ці химерні гомологічні мутантні молекули (позначені як HS7 і HS8) продемонстрували навіть більш високу авідність зв'язування з CD80, ніж CD28Ig.

Химерні гомологічні мутантні молекули були також отримані шляхом пересаджування до HS7 і HS8 CDR2-подібної ділянки CTLA4, але ця комбінація не дає додаткового поліпшення авідності зв'язування з CD80. Отже, мотив MYPPPY CTLA4 і CD28 був визначений як критичний для зв'язування з CD80, але деякі неконсервативні амінокислотні залишки CDR1- і CDR3-подібних ділянок були також відповідальними за підвищену авідність зв'язування CTLA4 із CD80.

Було показано, що CTLA4Ig ефективно блокує обумовлену CD80 Т-клітинну додаткову стимуляцію (співстимуляцію), але не є ефективним щодо блокади CD86-обумовлених імунних реакцій. Були створені молекули розчинного мутантного CTLA4, зокрема такого, що має більш високу авідність до CD86, ніж CTLA4 дикого типу, які, можливо, більш спроможні блокувати примування антиген-специфічних активованих клітин, ніж CTLA4Ig.

Залишається необхідність у більш досконалих молекулах CTLA4 для створення поліпшених фармацевтичних композицій для супресії імунної відповіді і для терапії раку, ніж відомі до тих пір розчинні форми CTLA4.

Відповідно до вищевикладеного винаходом пропонується розчинний мутантний CTLA4, молекули якого зв'язуються з CD80 і/або CD86. До числа мутантних молекул згідно з даним винаходом належать такі молекули, що можуть розпізнавати CD80 і CD86 як поодиночі, так і обидва, і зв'язуватися або з CD80 або CD86, або з ними обома. У деяких варіантах здійснення даного винаходу запропоновані мутантні молекули зв'язують CD80 і/або CD86 із більш високою авідністю, ніж CTLA4.

Одним із прикладів мутантної молекули CTLA4 є описана тут L104EA29Ylg (Фіг.7). Іншим прикладом мутантної молекули CTLA4 є L104Elg (Фіг.8), також подана в даному описі. Молекули L104EA29Ylg і L104Elg зв'язуються з CD80 і CD86 із більш високою авідністю, ніж CTLA4lg.

На Фіг.1 наведені результати аналізу рівноважного зв'язування L104EA29Ylg, L104Elg і CTLA4lg дикого типу з CD86lg.

На Фіг.2A і 2B наведені результати FACS-аналізу (FACS: клітинний сортер зі збудженням флуоресценції), що ілюструє зв'язування L104EA29Ylg, L104Elg і CTLA4lg із людськими CD80- і CD86-трансфікованими CHO клітинами, як описано в Прикладі 2, див. нижче.

На Фіг.3A і 3B показано інгібування проліферації CD80-позитивних і CD86-позитивних CHO-клітин, як описано нижче, в Прикладі 2.

На Фіг.4A і 4B продемонстровано, що L104EA29Ylg більш ефективно інгібує проліферацію первинних і вторинних алостимульованих Т-клітин, ніж CTLA4lg, як описано нижче, в Прикладі 2.

На Фіг.5A-С показано, що L104EA29Ylg більш ефективно, ніж CTLA4lg, інгібує продукування цитокінів IL-2 (Фіг.5A), IL-4 (Фіг.5B) і  $\gamma$ -інтерферону (Фіг.5C) алостимульованих людських Т-клітин, як описано нижче, у Прикладі 2.

На Фіг.6 показано, що L104EA29Ylg більш ефективно, ніж CTLA4lg, інгібує проліферацію фітогематоглітинін(PHA)-стимульованих Т-клітин мавп, як описано нижче, у Прикладі 2.

На Фіг.7 зображені нуклеотидна й амінокислотна послідовності мутантної молекули CTLA4 (L104EA29Ylg), що містять сигнальний пептид; мутантна позаклітинна область CTLA4, починаючи від метіоніну в положенні +1 і закінчуючи аспарагіною кислотою в положенні +124, або починаючи від аланіну в положенні -1 і закінчуючи аспарагіною кислотою в положенні +124; і ділянка Ig, як описано нижче, у Прикладі 1.

На Фіг.8 зображені нуклеотидна й амінокислотна послідовності мутантної молекули CTLA4 (L104Elg), що містять сигнальний пептид; мутантна позаклітинна область CTLA4, починаючи від метіоніну в положенні +1 і закінчуючи аспарагіною кислотою в положенні +124, або починаючи від аланіну в положенні -1 і закінчуючи аспарагіною кислотою в положенні +124; і ділянка Ig, як описано нижче, у Прикладі 1.

На Фіг.9 зображені нуклеотидна й амінокислотна послідовності CTLA4lg, що містять сигнальний пептид; амінокислотна послідовність позаклітинної області CTLA4 дикого типу, починаючи від метіоніну в положенні +1 і закінчуючи аспарагіною кислотою в положенні +124, або починаючи від аланіну в положенні -1 і закінчуючи аспарагіною кислотою в положенні +124; і ділянка Ig.

На Фіг.10A-С подані результати PAGE-аналізу в SDS-gel (Фіг.10A) для CTLA4lg (доріжка 1), L104Elg (доріжка 2) і L104EA29Ylg (доріжка 3A) і результати ексклюзивної за розміром хроматографії для CTLA4lg (Фіг.10B) і L104EA29Ylg (Фіг.10C).

На Фіг.11A і 11B зображена смугова діаграма V-подібної складки позаклітинного Ig CTLA4, отримана шляхом визначення структури за допомогою ЯМР-спектроскопії. На Фіг.11B поданий розгорнутий вигляд ділянки S25-R33 і ділянки MYPPPY, що демонструє положення та орієнтацію бічного ланцюга мутацій L104 і A29, що підвищують авідність.

На Фіг.12 зображена схематична діаграма вектора pILN-LEF29Y із інсерцією L104EA29Ylg.

#### Термінологія

Нижче дані визначення застосовані у даному описі спеціальної термінології.

Термін "CTLA4 дикого типу" стосується CTLA4, який має амінокислотну послідовність природного повномірного CTLA4 (Патенти США №№5434131, 5844095, 5851795), або його позаклітинної області, що зв'язує CD80 і/або CD86, і/або перешкоджає CD80 і/або CD86 зв'язуватися з їхніми лігандами. У конкретних варіантах здійснення винаходу позаклітинна область CTLA4 дикого типу починається з метіоніну в положенні +1 і закінчується аспарагіною кислотою в положенні +124, або позаклітинна область CTLA4 дикого типу починається з аланіну в положенні -1 і закінчується аспарагіною кислотою в положенні +124. CTLA4 дикого типу являє собою білок клітинної поверхні, що містить N-кінцеву позаклітинну область, трансмембранну область і C-кінцеву цитоплазматичну область. Позаклітинна область зв'язується з цільовими антигенами (мішенями), такими як CD80 і CD86. У природній клітині білок CTLA4 дикого типу транслюється у вигляді незрілого поліпептиду, що включає у себе сигнальний пептид на N-кінці. Незрілий поліпептид зазнає посттрансляційного процесінгу, який включає у себе відщеплення і видалення сигнального пептиду з утворенням продукту розщеплення CTLA4, котрий має новостворений N-кінець, що відрізняється від N-кінця незрілої форми. Для фахівця у даній галузі зрозуміло, що може відбуватися додатковий посттрансляційний процесінг, при якому із новоствореного N-кінця продукту розщеплення CTLA4 видаляється одна чи більше амінокислот. Молекула зрілої форми CTLA4 включає позаклітинну область CTLA4 або будь-яку її частину, що зв'язується з CD80 і/або CD86.

"CTLA4lg" являє собою розчинний злитий білок, що містить позаклітинну область CTLA4 дикого типу або її частину, котра зв'язує CD80 і/або CD86, з'єднаної з кінцем Ig. Кращий варіант даного винаходу включає у себе позаклітинну область CTLA4 дикого типу, починаючи від метіоніну в положенні +1 і закінчуючи аспарагіною кислотою в положенні +124; або починаючи від аланіну в положенні -1 і закінчуючи аспарагіною кислотою в положенні +124; ділянку з'єднання - амінокислотний залишок глутамін у положенні +125; і імуноглобулінову ділянку, що охоплює ділянку від глутамінової кислоти в положенні +126 до лізину в положенні +357 (Фіг.9).

Застосовуване в даному описі поняття "злитий білок" визначається як одна або більше амінокислотних послідовностей, з'єднаних між собою за допомогою добре відомих способів і способів, описаних у патентах США №5434131 або №5637481. При цьому з'єднані амінокислотні послідовності утворюють один злитий білок.

Застосовуваний у даному описі вираз "молекула мутантного CTLA4" ("мутантний CTLA4") може позначати молекулу повномірного CTLA4 (повномірний CTLA4) або її (його) частини (похідні або фрагменти), що містять мутацію або множинні мутації в CTLA4 (переважно у позаклітинній області CTLA4), так, що вона (він) стає аналогічною (аналогічним), але не ідентичною (ідентичним) молекулі CTLA4 дикого типу (CTLA4 дикого типу). Молекули мутантного CTLA4 зв'язуються або з CD80, або з CD86 або з ними обома. Молекули мутантного CTLA4 можуть містити в собі біологічно або хімічно активну не- CTLA4 молекулу, або ця молекула може бути

приєднана до молекули мутантного CTLA4. Молекули мутантного з'єднання можуть бути розчинними (тобто такими, що циркулюють) або можуть бути пов'язані з поверхнею. Молекули мутантного CTLA4 можуть включати у себе всю позаклітинну область CTLA4 або її частини, наприклад, фрагменти або похідні. Мутантний CTLA4 можна одержувати шляхом синтезу або за методами рекомбінантних ДНК.

Застосовуваний у даному описі термін "мутація" означає зміну в нуклеотидній або амінокислотній послідовності поліпептиду дикого типу. У даному випадку він означає зміну в позаклітинній області CTLA4 дикого типу. Такою зміною може бути зміна амінокислоти, що включає у себе заміни, делеції, додавання або усикання (скорочення). Мутантна молекула може містити одну або декілька мутацій. Мутації в нуклеотидній послідовності можуть викликати або не викликати мутації в амінокислотній послідовності, що добре зрозуміло з рівня техніки. Так, деякі нуклеотидні кодони кодують одну й ту саму амінокислоту. Прикладами тут можуть служити кодони CGU, CGG, CGC і CGA, що кодують амінокислоту, аргінін (R); або кодони GAU і GAC, що кодують амінокислоту, аспарагінову кислоту (D). Отже, білок може кодуватися однією і більше нуклеїновими кислотами, що відрізняються специфічними нуклеотидними послідовностями, проте кодують білки з ідентичними послідовностями. Нижче перелічені послідовності, що кодують амінокислоти.

Амінокислота	Символ	Однолітерний символ	Кодони
Аланін	Ala	A	GCU, GCC, GCA, GCG
Цистеїн	Cys	C	UGU, UGC
Аспарагінова к-та	Asp	D	GAU, GAC
Глутамінова к-та	Glu	E	GAA, GAG
Фенілаланін	Phe	F	UUU, UUC
Гліцин	Gly	G	GGU, GGC, GGA, GGG
Гістидин	His	H	CAU, CAC
Ізолейцин	Ile	I	AUU, AUC, AUA
Лізин	Lys	K	AAA, AAG
Лейцин	Leu	L	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG
Метіонін	Met	M	AUG
Аспарагін	Asn	N	AAU, AAC
Пролін	Pro	P	CCU, CCC, CCA, CCG
Глутамін	Gln	Q	CAA, CAG
Аргінін	Arg	R	CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Серин	Ser	S	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
Треонін	Thr	T	ACU, ACC, ACA, ACG
Валін	Val	V	GUU, GUC, GUA, GUG
Триптофан	Trp	W	UGG
Тирозин	Tyr	Y	UAU, UAC

Уживаний у даному описі термін "позаклітинна область CTLA4" означає частину CTLA4, що розпізнає CD80 і/або CD86 і зв'язується з ними. Наприклад, позаклітинна область CTLA4 включає у себе ділянку від метіоніну в положенні +1 до аспарагінової кислоти в положенні +124 (Фіг.9). Або ж позаклітинна область CTLA4 включає у себе ділянку від аланіну в положенні -1 до аспарагінової кислоти в положенні +124 (Фіг.9). Позаклітинна область включає у себе фрагменти або похідні CTLA4, що зв'язуються з CD80 і/або CD86.

Уживаний у даному описі термін "не-CTLA4 білкова послідовність" або "не-CTLA4 молекула" означає будь-яку молекулу, що не зв'язується з CD80 і/або CD86 і не перешкоджає зв'язуванню CTLA4 з її ціллю. Як приклад, що не обмежує, тут можна навести постійну ділянку імуноглобуліну (Ig) або її частину. У кращому варіанті постійна ділянка імуноглобуліну являє собою постійну ділянку людського Ig або Ig мавпи, наприклад, людський С(гамма) 1, включаючи шарнірну ділянку, ділянки CH2 і CH3. Постійна ділянка Ig може мутувати, послаблюючи його ефекторні функції (Патенти США №5637481 і 6132992).

Застосовуваний у даному описі вираз "фрагмент мутантної молекули CTLA4" означає частину мутантної молекули CTLA4, переважно позаклітинну область CTLA4 або її частину, що розпізнає мішень, наприклад, CD80 і/або CD86, і зв'язується з нею.

Застосовуваний у даному описі вираз "похідна мутантного CTLA4" ("похідна молекули мутантного CTLA4") означає молекулу, що має послідовність, принаймні на 70% подібну послідовності позаклітинної області CTLA4, і функції, аналогічні функціям цієї області, тобто вона розпізнає CD80 і/або CD86 і зв'язується з ними.

Застосовуваний у даному описі вираз "частина (ділянка) молекули CTLA4" включає фрагменти і похідні (молекули) CTLA4, що зв'язуються з CD80 і/або CD86.

Нижче даний винахід розглядається більш докладно.

Композиції згідно з даним винаходом

Даним винаходом пропонується розчинний мутантний CTLA4, що розпізнає CD80 і/або CD86 і зв'язується з ними. У деяких варіантах здійснення винаходу розчинні мутантні CTLA4 виявляють більш високу авідність до CD80 і/або CD86, ніж CTLA4lg.

Одним із прикладів мутантного CTLA4 є L104EA29Ylg (Фіг.7). Амінокислотна послідовність L104EA29Ylg може починатися аланіном в положенні -1 амінокислоти і закінчуватися лізином у положенні +357 амінокислоти. Або ж амінокислотна послідовність L104EA29Ylg може починатися метіоніном у положенні +1 амінокислоти і закінчуватися лізином у положенні +357 амінокислоти. CTLA4-ділянка L104EA29Ylg охоплює метіонін у положенні +1 амінокислоти аж до аспарагінової кислоти в положенні +124 амінокислоти. L104EA29Ylg містить ділянку з'єднання - амінокислотний залишок глутамін у положенні +125 - і ділянку імуноглобуліну, що охоплює ділянку від глутамінової кислоти в положенні +126 до лізину в положенні +357 (Фіг.7). Авідність L104EA29Ylg при зв'язуванні з CD80 є приблизно удвічі вищою за авідність CTLA4lg дикого типу (що далі зветься CTLA4lg) і приблизно в 4 рази вищою при зв'язуванні з CD86. Таке більш сильне

зв'язування приводить до того, що L104EA29Ylg більш ефективно блокує імунні реакції, ніж CTLA4lg.

Молекули мутантного CTLA4 містять, щонайменше, позаклітинну область CTLA4 або її ділянку, що зв'язується з CD80 і/або CD86. Позаклітинна область молекули мутантного CTLA4 містить амінокислотну послідовність, починаючи від метіоніну в положенні +1 до аспарагінової кислоти в положенні +124 (Фіг.7 або 8). Або ж позаклітинна область CTLA4 може включати амінокислотну послідовність, починаючи від аланіну в положенні -1 і закінчуючи аспарагіновою кислотою в положенні +124 (Фіг.7 або 8).

В одному з варіантів здійснення винаходу розчинний мутантний CTLA4 являє собою злитий білок, що містить позаклітинну область CTLA4, котра має одну чи більше мутацій на ділянці амінокислотної послідовності, починаючи серином в положенні +25 і закінчуючи аргініном у положенні +33 (S25-R33). Наприклад, аланін у положенні +29 CTLA4 дикого типу можна замінити на тирозин (кодони: UAU, UAC). Або ж аланін можна замінити на лейцин (кодони: UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG), фенілаланін (кодони: UUU, UUC), триптофан (кодон: UGG) або треонін (кодони: ACU, ACC, ACA, ACG). Як легко зрозуміють фахівці у даній галузі, урацил (U), нуклеотид послідовності РНК, відповідає тиміну (T), нуклеотиду послідовності ДНК.

В іншому варіанті здійснення винаходу розчинний мутантний CTLA4 являє собою злитий білок, що містить позаклітинну область CTLA4, котра має одну й більше мутацій на ділянці або біля ділянки амінокислотної послідовності, що починається метіоніном в положенні +97 і закінчується гліцином у положенні +107 (M97-G107). Наприклад, лейцин у положенні +104 CTLA4 дикого типу можна замінити на глутамінову кислоту (кодони GAA, GAG) Мутантний CTLA4, що містить таку заміну, називається в даному описі L104Elg (Фіг.8)

Ще в одному варіанті здійснення даного винаходу розчинний мутантний CTLA4 являє собою злитий білок, що має позаклітинну область CTLA4, котра містить одну і більше мутацій на ділянках S25-R33 і M97-G107. Наприклад, згідно з одним із варіантів винаходу мутантний CTLA4 містить тирозин у положенні +29 замість аланіну; і глутамінову кислоту в положенні +104 замість лейцину. Мутантний CTLA4, що містить таку заміну, фігурує в даному описі під назвою L104EA29Ylg (Фіг.7). Нуклеїнова кислота, що кодує L104EA29Ylg, міститься в рD16 L104EA29Ylg і депонована 19 червня 2000 року Американською Колекцією Культур Клітин (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 (ATCC No. PTA-2104). Вектор рD16 L104EA29Ylg є похідним від вектора pcDNA3 (INVITROGEN).

Винаходом охоплюється також розчинний мутантний CTLA4, що містить позаклітинну область CTLA4, як показано на Фіг.7 або 8, або його частину (частини), і фрагмент, що змінює розчинність, афінність і/або валентність мутантного CTLA4.

Практика застосування даного винаходу показує, що зазначений фрагмент може являти собою постійну ділянку імуноглобуліну або її частину. Для застосування *in vivo* краще, якщо постійна ділянка імуноглобуліну не викликає шкідливої імунної відповіді у пацієнта. Наприклад, бажано, щоб у клінічних протоколах молекули мутанта включали постійні ділянки людського або мавпячого імуноглобуліну. Одним із прикладів підхожої ділянки імуноглобуліну є людський C(гамма)1, що містить шарнірну ділянку, CH2 і CH3 ділянки. Можливі також інші ізотипи. Крім того, можливі й інші постійні ділянки (бажано, щоб це були слабоімуногенні або неімуногенні постійні ділянки імуноглобуліну).

Фрагментами можуть бути також поліпептидні мітки. Підхожими мітками можуть бути, наприклад, молекули p97, env gp120, E7 і ova [Dash, B., et al. (1994) J. Gen. Virol. 75: 1389-97; Ikeda, T., et al. (1994) Gene 138:193-6; Falk, K., et al. (1993) Cell. Immunol. 150: 447-52; Fujisaka, K., et al. (1994) Virology 204: 789-93]. Як мітки можуть бути застосовані також інші молекули [Gerard, C, et al. (1994) Neuroscience 62: 721-739; Byrn, R., et al., (1989) J. Virol 63: 4370-4375; Smith, D. et al. (1987) Science 238:1704-1707; Lasky, L, (1996) Science 273: 209-212].

Крім того, винаходом охоплюються розчинні мутантні злиті білки CTLA4lg, переважно, більш реактогенні щодо антигена CD80 і/або CD86 порівняно з CTLA4 дикого типу. Одним із прикладів таких білків є L104EA29Ylg, показаний на Фіг.7.

В іншому варіанті здійснення даного винаходу молекула розчинного мутантного білка CTLA4 включає у себе з'єднувальний амінокислотний залишок, розташований між ділянкою CTLA4 і ділянкою імуноглобуліну. Ділянка з'єднання амінокислот може бути будь-якою амінокислотою, що містить глутамін. З'єднувальна амінокислота (ділянка з'єднання) може вводитися за методами молекулярної генетики або за допомогою відомих методів хімічного синтезу.

Ще в одному варіанті здійснення винаходу молекула розчинного мутантного білка CTLA4 включає ділянку імуноглобуліну (наприклад, шарнірну ділянку, CH2 і CH3 ділянки), де будь-який цистеїновий залишок або всі цистеїнові залишки в шарнірній області імуноглобулінової ділянки замінені на серин, як, наприклад, цистеїнові залишки в положеннях +130, +136 або +139 (Фіг.7 або 8). Мутантні молекули можуть також включати у себе пролін у положенні +148, замінений на серин, як показано на Фіг.7 або 8.

Молекула розчинного мутантного білка CTLA4 може містити послідовність сигнального пептиду, пов'язану з N-кінцем позаклітинної області CTLA4-частини мутантної молекули. Сигнальний пептид може являти собою будь-яку послідовність, що дозволяє мутантній молекулі секретувати; ним може бути, наприклад, сигнальний пептид онкостатину M [Malik, et al., (1989) Molec. Cell. Biol. 9: 2847-2853] або CD5 [Jones, N. H. et al., (1986) Nature 323: 346-349] або сигнальний пептид будь-якого позаклітинного білка.

Молекула мутантної сполуки може включати у себе сигнальний пептид онкостатину M, пов'язаний із N-кінцем позаклітинної області CTLA4, і молекулу людського імуноглобуліну (наприклад, шарнірну ділянку, CH2 і CH3 ділянки), пов'язану із C-кінцем позаклітинної області CTLA4. Ця молекула містить сигнальний пептид онкостатину M, що охоплює амінокислотну послідовність, починаючи від метіоніну в положенні -26 і закінчуючи аланіном в положенні -1, ділянку CTLA4, що охоплює амінокислотну послідовність від метіоніну в положенні +1 до аспарагінової кислоти в положенні +124, ділянку з'єднання - амінокислотний залишок глутамін у положенні +125 і ділянку імуноглобуліну, що охоплює амінокислотну послідовність від глутамінової кислоти в положенні +126 до лізину в положенні +357.

Розчинний мутантний білок CTLA4 можна одержувати за молекулярними методами рекомбінантних ДНК або за хімічними методами синтезу. Молекулярні методи включають такі стадії: інтродукцію підхожої клітини-

хазяїна з молекулою нуклеїнової кислоти, що експресує і кодує молекулу розчинного мутантного CTLA4; культивування інтродукованої у такий спосіб клітини-хазяїна в умовах, що дозволяють клітині-хазяїну експресувати мутантні молекули; і виділення мутантного білка, що експресує. Ділянка сигнального пептиду мутантної молекули робить можливою експресію білка на поверхні клітини і секрецію його клітиною-хазяїном. Мутантні молекули, що трансклюються, можуть піддаватися посттрансляційній модифікації, котра включає у себе відщеплення сигнального пептиду з утворенням зрілого білка, який містить ділянки CTLA4 й імунoglobulinу. Відщеплення може здійснюватися після аланіну в положенні -1, що дає молекулу зрілого мутантного білка, котра містить метіонін у положенні +1 які першу амінокислоту (Фіг.7 або 8). Або ж відщеплення може відбуватися після метіоніну в положенні -2, що дає молекулу зрілого мутантного білка, котра як першу амінокислоту містить аланін у положенні -1.

Кращим варіантом здійснення винаходу є молекула розчинного мутантного білка CTLA4, що містить позаклітинну область людського CTLA4, пов'язану з цілою молекулою імунoglobulinу або її частиною (наприклад, шарнірною ділянкою, CH2 і CH3 ділянками). Молекула такого білка містить STC4-ділянку молекули розчинного білка, що охоплює амінокислотну послідовність від метіоніну в положенні +1 до аспарагінової кислоти в положенні +124, ділянку з'єднання - амінокислотний залишок глутамін у положенні +125 і ділянку імунoglobulinу, що охоплює амінокислотну послідовність від глутамінової кислоти в положенні +126 до лізину в положенні +357. Частина, що містить позаклітинну область CTLA4, мутує так, що аланін у положенні +29 замінюється на тирозин, а лейцин у положенні +104 замінюється на глутамінову кислоту. Імунoglobulinова частина мутантної молекули може мутувати так, що цистеїнові залишки в положеннях +130, +136 і +139 замінюються на серин, а пролін у положенні +148 також замінюється на серин. Цей мутантний білок (мутантна молекула) позначена в даному описі як L104EA29Ylg (Фіг.7).

Іншим варіантом мутантної молекули L104EA29Ylg згідно з даним винаходом є мутантна молекула, що має амінокислотну послідовність від аланіну в положенні -1 до аспарагінової кислоти в положенні +124, ділянку з'єднання амінокислот - глутаміновий залишок - у положенні +125 і ділянку імунoglobulinу, що охоплює глутамінову кислоту в положенні +126 (наприклад, від +126 до лізину в положенні +357). Ділянка, що містить позаклітинну область CTLA4, мутує так, що аланін у положенні +29 замінюється на тирозин, а лейцин у положенні +104 замінюється на глутамінову кислоту. Імунoglobulinова частина мутантної молекули мутує так, що цистеїнові залишки в положеннях +130, +136 і +139 замінюються на серин, а пролін у положенні +148 також замінюється на серин. Цей мутантний білок (мутантна молекула) позначена в даному описі як L104EA29Ylg (Фіг.7). Після відщеплення сигнальної послідовності L104EA29Ylg може починатися з метіоніну в положенні +1 або з аланіну в положенні -1.

Іншою мутантною молекулою за даним винаходом є молекула розчинного мутантного білка CTLA4, що має позаклітинну область людського CTLA4, пов'язану з молекулою людського імунoglobulinу (наприклад, шарнірною ділянкою, CH2 і CH3). Ця молекула включає у себе частину амінокислотної послідовності, що кодує CTLA4, починаючи від метіоніну в положенні +1 і закінчуючи аспарагіновою кислотою в положенні +124, ділянку з'єднання амінокислот - глутаміновий залишок - у положенні +125 і ділянку імунoglobulinу, що охоплює амінокислотну послідовність від глутамінової кислоти в положенні +126 до лізину в положенні +357. Ділянка, що містить позаклітинну область CTLA4, мутує так, що лейцин у положенні +104 замінюється на глутамінову кислоту. Шарнірна ділянка молекули мутує так, що цистеїнові залишки в положеннях +130, +136 і +139 замінюються на серин, а пролін у положенні +148 також замінюється на серин. Цей мутантний білок (мутантна молекула) позначений у даному описі як L104Elg (Фіг.8).

Альтернативним варіантом L104Elg є молекула розчинного мутантного CTLA4, що містить позаклітинну область CTLA4 пов'язану з молекулою людського імунoglobulinу (наприклад, шарнірною ділянкою, CH2 і CH3). Ця молекула включає у себе частину CTLA4, що охоплює амінокислотну послідовність від аланіну в положенні -1 до аспарагінової кислоти в положенні +124, ділянку з'єднання - амінокислотний залишок глутамін у положенні +125 і ділянку імунoglobulinу, що охоплює область від глутамінової кислоти в положенні +126 до лізину в положенні +357. Ділянка, що містить позаклітинну область CTLA4, мутує так, що лейцин у положенні +104 замінюється на глутамінову кислоту. Шарнірна ділянка мутантної молекули мутує так, що цистеїнові залишки в положеннях +130, +136 і +139 замінюються на серин, а пролін у положенні +148 також замінюється на серин. Цей мутантний білок (мутантна молекула) позначений у даному описі як L104Elg (Фіг.8).

Крім того, даним винаходом охоплюється молекула розчинного мутантного CTLA4, що має: (а) першу амінокислотну послідовність мембранного глікопротеїну, наприклад, CD28, CD86, CD80, CD40 і gp39, що блокує проліферацію Т-клітин, зливу з другою амінокислотною послідовністю; (б) другу амінокислотну послідовність, що є фрагментом позаклітинної області мутантного CTLA4, що блокує проліферацію Т-клітин, таку як, наприклад, молекула амінокислоти, що включає у себе ділянку від метіоніну в положенні +1 до аспарагінової кислоти в положенні +124 (Фіг.7 або 8); і (с) третю амінокислотну послідовність, що діє як ідентифікаційна мітка або підвищує розчинність молекули. Наприклад, третя амінокислотна послідовність може складатися виключно із амінокислотних залишків шарнірної ділянки, CH2 і CH3-ділянок молекули неімуногенного імунoglobulinу. Підходими молекулами імунoglobulinу можуть бути, наприклад, людський або мавпячий імунoglobulin, наприклад, С(гамма)1. Можливими є також інші ізотипи.

Крім того, винаходом охоплюються нуклеотидні молекули, котрі мають нуклеотидні послідовності, що кодують амінокислотні послідовності, які відповідають молекулам запропонованого розчинного мутантного CTLA4. В одному з варіантів здійснення винаходу нуклеотидна молекула являє собою ДНК (наприклад, кДНК) або її гібрид. Нуклеотидними молекулами можуть бути також РНК або їхні гібриди.

Крім того, даний винахід включає у себе вектор, що містить запропоновані нуклеотидні послідовності. Винаходом охоплюється також система вектора-хазяїна. Система вектора-хазяїна включає у себе вектор за даним винаходом у підхожій клітині-хазяїні. Підхожими клітинами-хазяїнами можуть бути, наприклад, клітини прокаріотів і еукаріотів.

Винаходом охоплюються фармацевтичні композиції для лікування захворювань імунної системи, що містять фармацевтично ефективні кількості розчинного мутантного CTLA4. У деяких варіантах винаходу

захворювання імунної системи опосередковуються взаємодією CD28- і/або CTLA4-позитивних клітин із CD80- і/або CD86-позитивними клітинами. Молекули розчинного мутантного CTLA4, переважно, являють собою молекули CTLA4, що містять одну чи більше мутацій у позаклітинній області CTLA4. Фармацевтична композиція може містити розчинний мутантний білок CTLA4 і/або нуклеїнову кислоту і/або вектори, що їх кодують. У кращих варіантах здійснення винаходу розчинний мутантний CTLA4 має амінокислотну послідовність позаклітинної області CTLA4, як показано на Фіг.7 або на Фіг.8 (L104EA29Y або L104E, відповідно). У ще кращому варіанті розчинним мутантним CTLA4 є L104EA29Ylg, поданий у даному описі. Композиції можуть містити також інші терапевтичні агенти, включаючи без обмеження, лікарські токсини, ферменти, антитіла або кон'югати.

Фармацевтичні композиції також можуть включати у себе підхожі носії або ад'юванти, що містять будь-який матеріал, який при з'єднанні з молекулою за даним винаходом (наприклад, розчинним мутантним CTLA4, таким як L104EA29Y або L104E) зберігає активність молекули і не є реактивним по відношенню до імунної системи пацієнта. Підхожими носіями і ад'ювантами можуть бути, але без обмеження лише ними: людський сироватковий альбумін; іонообмінні речовини; оксид алюмінію; лецитин; буфери, такі як фосфати; гліцин; сорбінова кислота; сорбат калію; і солі або електроліти, такі як протамінсульфат. У числі інших прикладів можна назвати будь-які стандартні фармацевтичні носії, такі як фізіологічний розчин із фосфатним буфером; вода; емульсії, наприклад, емульсія олії у воді; і різноманітні зволожуючі засоби. Носіями можуть бути також стерильні розчини; таблетки, включаючи таблетки, покриті оболонкою, і капсули. Зазвичай такі носії містять ексципієнти, такі як крохмаль, молоко, цукор, деякі види глини, желатинів, стеаринову кислоту або її солі, стеарат магнію або кальцію, тальк, рослинні жири або олії, смоли, гліколи або інші відомі ексципієнти. Такі носії можуть містити також смакові добавки і барвники або інші інгредієнти. Композиції з такими носіями готують у добре відомі способи. Такі композиції можна також поміщати в різноманітні ліпідні середовища, такі як ліпосоми, або у різні полімерні середовища, наприклад, полімерні мікросфери.

Фармацевтичні композиції за даним винаходом можна вводити пацієнтам у звичайні способи, включаючи без обмеження внутрішньовенний (вв), внутрішньочеревинний (вч), внутрішньом'язовий (вм), підшкірний, пероральний шляхи, супозиторний спосіб або місцевий контакт, або ж імплантацію пацієнту медикаментозно-постачального пристрою пролонгованої дії, такого як мініосмотичний насос.

Фармацевтичні композиції згідно з даним винаходом можуть мати вигляд різноманітних лікарських форм, які містять без обмеження рідкі розчини або суспензії, таблетки, пілюлі, порошки, супозиторії, полімерні мікрокапсули або мікровезикули, ліпосоми і розчини для ін'єкцій або вливань. Краща форма залежить від способу введення і терапевтичного застосування.

Найбільш ефективний спосіб застосування і схема приймання композицій за даним винаходом залежать від тяжкості і перебігу хвороби, стану здоров'я хворого і реакції на лікування, а також від рішення лікаря-куратора. Відповідно до цього, дозування композицій варто визначати для кожного пацієнта індивідуально.

Молекули розчинного мутантного CTLA4 можна вводити пацієнту в кількості і в часі (наприклад, період і/або кількість прийомів), достатніми для того, щоб блокувати зв'язування ендogenous B7 (наприклад, CD80 і/або CD86) із їхніми відповідними лігандами в організмі пацієнта. Тим самим блокада зв'язування ендogenous B7/ліганда інгібує взаємодію B7-позитивних клітин (наприклад, CD80- і/або CD86-позитивних клітин) із CD28- і/або CTLA4-позитивними клітинами. Дозування терапевтичного агента залежить від багатьох чинників, включаючи без обмеження характер тканини, в яку вводять агент, вид аутоімунного (аутоалергічного) захворювання, що підлягає лікуванню, тяжкість захворювання, стан здоров'я пацієнта і реакція пацієнта на лікування за допомогою агентів. Відповідно до цього, дозування агентів може змінюватися в залежності від пацієнта і способу введення. Молекули розчинного мутантного CTLA4 можна вводити в кількості 0,1-20,0мг/кг маси хворого на день, краще, якщо 0,5-10,0мг/кг/день. Вводити фармацевтичні композиції можна з різноманітними проміжками часу. В одному з варіантів фармацевтичну композицію за даним винаходом можна вводити протягом однієї години і більше. Крім того, введення композиції можна повторювати відповідно до тяжкості захворювання, а також інших чинників, добре відомих фахівцям.

Винаходом охоплюються також способи одержання білка, що полягають у вирощуванні системи хазяїн-вектор згідно з винаходом таким чином, щоб продукувати білок у хазяїні, і у відділенні утвореного при цьому білка.

Крім того, винаходом охоплюються способи регулювання функціональної взаємодії CTLA4- і CD28-позитивних Т-клітин із CD80- і/або CD86-позитивними клітинами. До цих способів належить приведення у контакт CD80- і/або CD86-позитивних клітин із молекулою розчинного мутантного CTLA4 за винаходом таким чином, щоб утворилися комплекси мутантний CTLA4/CD80 і/або мутантний CTLA4/CD86, причому ці комплекси перешкоджають реакції антигена ендogenous CTLA4 із CD80 і/або CD86, і/або реакції антигена ендogenous CD28 із CD80 і/або CD86. В одному з варіантів здійснення винаходу молекула розчинного мутантного CTLA4 являє собою злитий білок, який містить принаймні частину позаклітинної області мутантного CTLA4. В іншому варіанті молекула розчинного мутантного CTLA4 містить: першу амінокислотну послідовність, що включає позаклітинну область CTLA4 від метіоніну в положенні +1 до аспарагінової кислоти в положенні +124, що містить принаймні одну мутацію; і другу амінокислотну послідовність, що включає шарнірну ділянку, CH2 і CH3-ділянки молекули людського імуноглобуліну гама 1 (Фіг.7 або 8).

Відповідно до практики застосування даного винаходу CD80- і/або CD86-позитивні клітини приводять у контакт із фрагментами або похідними молекули запропонованого розчинного мутантного CTLA4. Або ж розчинний мутантний CTLA4 за даним винаходом використовується у формі злитого білка CD28lg/CTLA4lg, що має першу амінокислотну послідовність, яка відповідає частині позаклітинної області рецептора CD28 і злита з другою амінокислотною послідовністю, що відповідає частині позаклітинної області мутантного рецептора CTLA4, і третю амінокислотну послідовність, що відповідає шарнірній ділянці, CH2 і CH3-ділянкам молекули людського імуноглобуліну С-гамма-1.

Передбачається, що розчинний мутантний CTLA4 виявляє інгібувальні властивості in vivo. В умовах, коли взаємодія Т-клітина/APC-клітина, наприклад, взаємодія Т-клітина/В-клітина, відбувається в результаті контакту

Т-клітин і APC-клітин, зв'язування введених із метою реакції з CD80- і/або CD86-позитивними клітинами, наприклад, із В-клітинами, молекул мутантного CTLA4 може перешкоджати (тобто інгібувати) взаємодії Т-клітина/APC-клітини, що викликає регуляцію імунних реакцій.

Винахід охоплює способи негативної регуляції (інгібування) імунних реакцій. Негативна регуляція (модуляція) імунної відповіді молекулами розчинного мутантного CTLA4 може відбуватися шляхом інгібування або блокади імунної відповіді вже в процесі розвитку або може запобігати індукції імунної відповіді. Молекули розчинного CTLA4 за винаходом можуть інгібувати функції активованих Т-клітин, такі як проліферація Т-лімфоцитів і секреція цитокінів, пригнічуючи Т-клітинні реакції або викликаючи специфічну толерантність у Т-клітинах, або у той та інший спосіб одночасно.

Крім того, даним винаходом охоплюються способи лікування захворювань імунної системи й індукції толерантності. В особливо прийнятних варіантах здійснення винаходу захворювання імунної системи опосередковуються взаємодією CD28- і/або CTLA4-позитивних клітин із CD80/CD86-позитивними клітинами. В іншому варіанті винаходу Т-клітинна взаємодія інгібуються. До числа вищезгаданих захворювань імунної системи входять, але без обмеження, аутоімунні захворювання, імунопроліферативні захворювання і захворювання, пов'язані з трансплантацією. Способи згідно з винаходом включають у себе введення пацієнту молекул запропонованого розчинного мутантного CTLA4 з метою регуляції Т-клітинної взаємодії з CD80- і/або CD86-позитивними клітинами. Або ж можна вводити гібрид мутантного CTLA4, що містить мембранний глікопротеїн, з'єднаний із молекулою мутантного CTLA4. Серед захворювань, пов'язаних із трансплантацією, можна назвати гомологічну хворобу (GVHD) (наприклад, таку, що може явитися результатом пересадження кісткового мозку або при індукції толерантності), розлади імунної системи, обумовлені відторгненням трансплантата, хронічним відторгненням, а також ало- і ксенотрансплантатами тканин або клітин, включаючи щільні тканини (органи), островці, м'язи, гепатоцити, нейрони. У числі прикладів імунопроліферативних захворювань можна назвати, без обмеження, псоріаз; Т-клітинну лімфому; Т-клітинний гострий лімфобластний лейкоз; доброякісний лімфоцитарний ангіїт; і аутоімунні захворювання, такі як вовчак (наприклад, системний червоний вовчак, *lupus perhritis*), тиреоїдит Хасімото, первинна мікседема, хвороба Грейвса, злоякісна анемія, аутоімунний атрофічний гастрит, хвороба Аддісона, діабет (наприклад, інсулінозалежний цукровий діабет типу I), синдром Гудпасчера, тяжка псевдопаралітична міастенія, пупирчатка, хвороба Крона, симпатична офтальмія, симпатичний увеїт, розсіяний склероз, аутоімунна гемолітична анемія, ідіопатична тромбоцитопенія, первинний біліарний цироз, хронічний активний гепатит, неспецифічний виразковий коліт, синдром Сегрена, ревматичні захворювання (наприклад, ревматоїдний артрит), поліміозит, склеродерма і змішана сполучнотканнна хвороба.

У даний винахід входить також спосіб інгібування відторгнення пацієнтом трансплантатів однорідних органів і/або щільних тканин, де пацієнт є реципієнтом пересадженої тканини. Як правило, при трансплантації тканини відторгнення трансплантата ініціюється розпізнаванням його Т-клітинами як чужорідного з наступною імунною відповіддю, що руйнує трансплантат. Молекули розчинного мутантного CTLA4 за даним винаходом, інгібуючи проліферацію Т-лімфоцитів і/або секрецію цитокінів, можуть привести до зменшення деструкції тканини, а індукція антиген-специфічної імунологічної толерантності Т-клітин може дати тривале приживлення трансплантата при відсутності необхідності в загальній імуносупресії. Крім того, молекули розчинного мутантного CTLA4 згідно з даним винаходом можна застосовувати разом з іншими фармацевтичними препаратами, без обмеження, такими як кортикостероїди, циклоспорин, рапаміцин, мікофенолятмофетил, азатіоприн, такролімус, базиликсимаб і/або інші біологічні сполуки.

Даним винаходом також охоплюється спосіб інгібування гомологічної хвороби у пацієнта. Цей засіб полягає у введенні пацієнту (молекул) розчинного мутантного CTLA4 за винаходом, самого або разом із додатковими лігандами, реактогенними з IL-2, IL-4 або  $\gamma$ -інтерфероном. Наприклад, розчинний мутантний CTLA4 згідно з даним винаходом можна вводити реципієнту трансплантата кісткового мозку з метою інгібувати алореактивність донорних Т-клітин. Або ж донорні Т-клітини трансплантата кісткового мозку можна позбавляти імуногенності щодо алоантигенів реципієнта *ex vivo* перед трансплантацією.

Інгібування Т-клітинної імунної відповіді розчинним мутантним CTLA4 може також бути корисним при лікуванні аутоімунних порушень. Багато аутоімунних порушень є наслідком невідповідної активації Т-клітин, що є реактивними до аутоантигенів і активують продукування цитокінів і аутоантитіл, "залучених" до патології захворювання. Введення (молекул) розчинного мутантного CTLA4 пацієнту, що страждає на аутоімунне порушення, може попередити активацію аутореактивних Т-клітин і зменшити або зняти симптоми захворювання. Цей спосіб може також полягати у введенні пацієнту (молекул) розчинного мутантного CTLA4 за даним винаходом, самого або разом із додатковими лігандами, реактогенними з IL-2, IL-4 або  $\gamma$ -інтерфероном.

Даний винахід також включає у себе застосування (молекул) розчинного мутантного CTLA4 разом з іншими імуносупресорами, наприклад, із циклоспорином, див. [Mathiesen, "Prolonged Survival and Vascularization of Xenografted Human Glioblastoma Cells in the Central Nervous System of Cyclosporin A-treated Rats" (1989) *Cancer Lett.* 44: 151-156], преднізоном, азатіоприном і метотрексатом [R. Handschumacher "Chapter 53: Drugs Used for Immunosuppression" pages 1264-1276]. Можливим є застосування інших імуносупресорів. Наприклад, при лікуванні ревматоїдного артрити (молекули) розчинного мутантного CTLA4 можна вводити з фармацевтичними препаратами, включаючи, але без обмеження, кортикостероїди, нестероїдні протизапальні лікарські препарати/інгібітори Cox-2, метотрексат, гідроксихлорохін, сульфасалазопірин, солі золота, етанерцепт, інфліксимаб, анакінру, азатіоприн і/або інші біологічні препарати, такі як проти-ТГФ-препарати. При лікуванні системного червоного вовчак молекули розчинного мутантного CTLA4 можна вводити з фармацевтичними препаратами, включаючи, але без обмеження, кортикостероїди, цитоксан, азатіоприн, гідроксихлорохін, мікофенолятмофетил і/або інші біологічні препарати. Крім того, при лікуванні розсіяного склерозу молекули розчинного мутантного CTLA4 можна вводити з фармацевтичними препаратами, включаючи, але без обмеження, кортикостероїди, інтерферон бета-1a, інтерферон бета-1b, глатирамеру ацетат, метоксантрону гідрохлорид і/або інші біологічні препарати.

Молекули розчинного мутантного CTLA4 (переважно, L104EA29YIg) можна також застосовувати в комбінації з одним і більше із таких агентів для регуляції імунної відповіді: розчинний др39 (також відомий як ліганд CD40 (CD40L), CD-154, T-BAM, TRAP), розчинний CD29, розчинний CD40, розчинний CD80, розчинний CD86, розчинний CD28, розчинний CD56, розчинний Thy-1, розчинний CD3, розчинний TCR, розчинний VLA-4, розчинний VCAM-1, розчинний LECAM-1, розчинний ELAM-1, розчинний CD44, антитіла, реактивні у відношенні до др39; антитіла, реактивні у відношенні до CD40; антитіла, реактивні у відношенні до B7; антитіла, реактивні у відношенні до CD28; антитіла, реактивні у відношенні до LFA-1; антитіла, реактивні у відношенні до LFA-2; антитіла, реактивні у відношенні до IL-2, антитіла реактивні у відношенні до IL-12, антитіла реактивні у відношенні до IFN-гамма; антитіла, реактивні у відношенні до CD2; антитіла, реактивні у відношенні до CD48; антитіла, реактивні у відношенні до будь-яких ICAM (наприклад, ICAM-2); антитіла, реактивні у відношенні до CTLA4; антитіла, реактивні у відношенні до Thy-1; антитіла, реактивні у відношенні до CD56; антитіла, реактивні у відношенні до CD3; антитіла, реактивні у відношенні до CD29; антитіла, реактивні у відношенні до TCR; антитіла, реактивні у відношенні до VLA-4; антитіла, реактивні у відношенні до VCAM-1; антитіла, реактивні у відношенні до LECAM-1; антитіла, реактивні у відношенні до ELAM-1; антитіла, реактивні у відношенні до CD44. В окремих варіантах здійснення винаходу кращими є моноклональні антитіла (mAbs). В інших варіантах винаходу кращими є фрагменти антитіл. Для фахівця у даній галузі добре зрозуміло, що комбінація такого типу може включати у себе розчинний мутантний CTLA4 за винаходом й інших імуносупресор, розчинний мутантний CTLA4 із двома іншими імуносупресорами, розчинний мутантний CTLA4 із трьома іншими імуносупресорами і т.д. Визначення оптимальної комбінації і дозувань можна визначити й оптимізувати за добре відомими фахівцям методами.

Серед деяких конкретних комбінацій можна назвати такі: L104EA29YIg і CD80 mAbs; L104EA29YIg і CD86 mAbs; L104EA29YIg, CD80 mAbs і CD86 mAbs; L104EA29YIg і gp39 mAbs; L104EA29YIg і CD40 mAbs; L104EA29YIg і CD28 mAbs; L104EA29YIg, CD80 і CD86 mAbs і gp39 mAbs; L104EA29YIg, CD80 і CD86 mAbs і CD40 mAbs; і L104EA29YIg, анти-LFA1 mAb і анти-gp39 mAb. Конкретним прикладом gp39 mAb є MR1. Існує також безліч інших комбінацій, які зможуть легко скласти і гідно оцінити фахівці у даній галузі.

Розчинний мутантний CTLA4 (молекули), наприклад, L104EA29Y, можна вводити як єдиний (самостійний) активний інгредієнт або разом з іншими лікарськими речовинами для імуномодуляції або для лікування чи відвертання гострого або хронічного відторгнення ало- або ксенотрансплантата, або запальних чи аутоімунних захворювань, або ж для індукції толерантності. Наприклад, його можна використовувати в комбінації з інгібітором кальциневрину, наприклад, циклоспорином А або FK506; із імуносупресорним макролідом, наприклад, рапаміцином або його похідною, наприклад, 40-О-(2-гідроксі)етилрапаміцином; із лімфоцитарним агентом хомінгу, наприклад, FTY720 або його аналогом; із кортикостероїдами; із циклофосфамідом; з азатіоприном; із метотрексатом; лефлюномідом або його аналогом; із мізорибіном; із мікофенольною кислотою; із мікофенолятом мофетилу; із 15-дезоксипергуаліном або його аналогом; із імуносупресорними моноклональними антитілами, наприклад, моноклональними антитілами проти рецепторів лейкоцитів, у тому числі MHC, CD2, CD3, CD4, CD11a/CD18, CD7, CD25, CD27, B7, CD40, CD45, CD58, CD137, ICOS, CD150 (SLAM), OX40, 4-1BB або інші ліганди; або з іншими імуномодуляторними сполуками, наприклад, CTLA4/CD28-Ig, або молекулами інших інгібіторів адгезії, наприклад, mAbs чи з інгібіторами з низькомолекулярною вагою, включаючи антагоністи LFA-1, антагоністи селектину й антагоністи VLA-4. Дана сполука є особливо ефективною у застосуванні в комбінації зі сполукою, що заважає CD40 і його ліганду, наприклад, антитілам проти CD40 і антитілам проти CD40-L досягти вищеописаних показань, наприклад, індукції толерантності.

Коли молекули розчинного мутантного CTLA4 згідно з даним винаходом вводять у сполученні з іншими імуносупресорними/імуномодуляторними або протизапальними терапевтичними засобами, наприклад, такими, як наведені вище, дозування спільно вживаного імуносупресора, імуномодулятора або протизапального засобу, цілком зрозуміло, залежить від типу спільно вживаної лікарської речовини, наприклад, від того, є вона стероїдом чи циклоспорином, від конкретної застосовуваної лікарської речовини, від стану хворого і т.п.

Відповідно до вищеописаного даний винахід пропонує в додатковому аспекті зазначені вище способи, що полягають у спільному, наприклад, одночасному (супутньому) або послідовному введенні терапевтично ефективної кількості (молекул) розчинного мутантного CTLA4 за даним винаходом, L104EA29YIg, у вільному вигляді або у вигляді фармацевтично прийнятної солі, і другої лікарської речовини, при цьому зазначена друга лікарська речовина є імуносупресором, імуномодулятором або протизапальною лікарською речовиною, наприклад, такою, як зазначено вище. Крім того, винаходом передбачаються терапевтичні комбінації, наприклад, такі, як набір, що містить L104EA29YIg, у вільному вигляді або у вигляді фармацевтично прийнятної солі, призначений для застосування у будь-який із вищезазначених способів шляхом введення одночасно або послідовно принаймні з однією фармацевтичною композицією, що містить імуносупресор, імуномодулятор або протизапальний лікарський засіб. Набір може містити інструкції для їх застосування.

Способи одержання молекул згідно з даним винаходом

Експресію молекул мутантного CTLA4 можна здійснювати в клітинах прокаріотів. Найчастіше прокаріоти мають форму різноманітних штамів бактерій. Бактерії можуть бути грампозитивними або грамнегативними. Як правило, кращими є грамнегативні бактерії, такі як *E. coli*. Можна використовувати також інші штами мікробів.

Послідовності, що кодують молекули мутантного CTLA4, можна вбудовувати у вектор, створений для експресування чужорідних послідовностей у клітинах прокаріотів, таких як *E. coli*. До числа цих векторів можуть входити звичайно використовувані прокаріотні регулярні послідовності, котрі, згідно з даним описом, включають промотори ініціації транскрипції, у разі необхідності, з оператором, поряд із сайтами зв'язування рибосом, такі звичайно використовувані промотори, як промоторні системи бета-лактамази (пеніцилінази) і лактози (lac) [Chang, et al., (1977) *Nature* 198: 1056], промоторна система триптофану (trp) [Goeddel, et al., (1980) *Nucleic Acids Res.* 8: 4057], промотор  $P_L$  і сайт зв'язування рибосом N-гена лямбда-фага [Shimatake, et al., (1981) *Nature* 292: 128].

Такі вектори експресії також включають ориджини реплікації і селективні маркери, такі як ген бета-



лактамази або неоміцин-фосфотрансферази, що надають антибіотикам стійкості, завдяки чому вектори можуть реплікувати у бактеріях, і можна відбирати клітини, що несуть плазмід, вирощені при наявності антибіотиків, таких як ампіцилін або канаміцин.

Плазмідну експресію можна вводити в клітини прокариотів за допомогою різноманітних стандартних методів, включаючи, без обмеження лише ними,  $\text{CaCl}_2$ -шок [Cohen, (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2110; Sambrook et al., (eds.), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, (1989)] і електропорацію.

Згідно з практикою застосування даного винаходу клітини еукаріотів також підходять для використання як клітини-хазяїни. Прикладами клітин еукаріотів можуть бути будь-які тваринні клітини, як первинні, так і іморталізовані, дріжджові клітини (наприклад, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* і *Pichia pastoris*) і рослинні клітини. Як приклади тваринних клітин, котрі можна використовувати як клітини-хазяїни, можна назвати клітини мієломи, COS і CHO. Підходящими CHO-клітинами можуть бути, зокрема, але без обмеження, DG44 [Chasin, et al., (1986) Som. Cell. Molec. Genet. 12: 555-556; Kolkekar (1997) Biochemistry 36: 10901-10909], CHO-K1 [ATCC No.CCL-61], CHO-K1 Tet-On клітинна лінія [Clontech], CHO, позначені як ECACC 85050302 [CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK], CHO-клон 13 [GEIMG, Geneva, IT], CHO-клон B [GEIMG, Genova, IT], CHO-K1/SF, позначений як ECACC 93061607 [CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK] і RR-CHOK1, позначений як ECACC 92052129 [CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK]. До числа підходящих рослинних клітин належать, наприклад, клітини тютюну (ціла рослина, культури клітин або калюс), пшениці, сої культурної і рису. Застосовувати можна також насіння пшениці, сої культурної і рису.

Нуклеотидні послідовності, що кодують молекули мутантного CTLA4, можна також вбудовувати у вектор, призначений для експресування чужорідних послідовностей у клітинах еукаріотів. Регуляторні елементи вектора можуть варіюватися відповідно до конкретної еукаріотичної клітини-хазяїни.

Використовувані звичайно еукаріотичні регулярні послідовності для застосування у векторах експресії включають до свого числа промотори і регулярні послідовності, сумісні з клітинами ссавців, такі, наприклад, як промотор CMV (вектор CDM8) і вірус саркоми птахів (ASV) (вектор  $\mu$ TLN). Серед інших застосовуваних звичайно промоторів можна назвати, наприклад, ранні і пізні промотори вірусу зеленої мартишки (SV40) [Fiers, et al., Nature 273: 113], або інші вірусні промотори, такі як вірусні промотори поліоми, аденовірусу 2 і вірусу бичачої папіломи. Можна також використовувати індукційний промотор, такий як hMTII [Karin, et al., (1982) Nature 299: 797-802].

Вектори експресії (молекул) мутантного CTLA4 в клітинах еукаріотів можуть також нести послідовності, називані енхансерами (енхансерна ділянка). Вони є важливими для оптимізації експресії гена і знаходяться в ряді послідовностей вище або нижче промотора.

Як приклади векторів експресії еукаріотичних клітин-хазяїнів можна назвати, без обмеження лише ними, вектори клітин-хазяїнів ссавців (наприклад, BPV-1, pHyg, pRSV, hSV2, pTK2 (Maniatis); pIRES (Clontech); pRc/CMV2, pRc/RSV, pSFV1 (Life Technologies); вектори pVPакс, вектори pCMV, вектори pSG5 (Stratagene)), ретровірусні вектори (наприклад, вектори pFB (Stratagene)), pCDNA-3 (Invitrogen) або їхні модифіковані форми, аденовірусні вектори; вектори аденозв'язаних вірусів, вектори бакуловірусів, дріжджові вектори (наприклад, вектори pESC (Stratagene)).

Нуклеотидні послідовності, що кодують молекули мутантного CTLA4, можна інтегрувати в геном еукаріотичної клітини-хазяїни і реплікувати у вигляді реплік геному клітини-хазяїни. Або ж вектор, що несе молекули мутантного CTLA4, може містити ориджини реплікації, що роблять можливою позахромосомну реплікацію.

Для експресії нуклеотидних послідовностей у *Saccharomyces cerevisiae* можна використовувати ориджин реплікації ендогенної дріжджової плазмід, виток (кільце) 2 $\mu$  [Broach, (1983) Meth. Enz. 101: 307]. Або ж можна використовувати послідовності дріжджового геному, спроможні активувати автономну реплікацію, див., наприклад, [StinchMomb et al., (1979) Nature 282: 39]; Tschemper et al., (1980) Gene 10: 157; Clarke et al., (1983) Meth. Enz. 101: 300].

Транскрипційні регулярні послідовності дріжджових векторів включають промотори синтезу гліколітичних ферментів [Hess et al., (1968) J Adv. Enzyme Reg. 7: 149; Holland et al., (1978) Biochemistry 17: 4900]. Додаткові промотори, відомі в техніці, містять CMV-промотор, створений у векторі CDM8 [Toyama and Okayama, (1990) FEBS 268: 217-221]; промотор 3-фосфогліцераткінази [Hitzeman et al., (1980) J. Biol. Chem. 255: 2073] і промотори інших гліколітичних ферментів.

Інші промотори є індукційними, оскільки вони можуть регулюватися подразниками із навколишнього середовища або із живильного середовища для вирощування клітин. До таких індукційних промоторів належать промотори генів білків теплового шоку, алкогольдегідрогенази 2, ізоцитохрому C, кислої фосфатази, ферментів, пов'язаних із катаболізмом азоту, і ферментів, відповідальних за утилізацію мальтози і галактози.

Регуляторні послідовності можна поміщати на 3'-кінець кодувальних послідовностей. Ці послідовності можуть стабілізувати матричну РНК. Такі термінатори виявлені на 3'-ділянці, що не трансклюється і розташовується слідом за кодувальними послідовностями декількох генів дріжджів і ссавців.

Серед прикладів векторів рослин і рослинних клітин можна назвати, без обмеження, плазміді T<sub>1</sub> агробактерій, вірус мозаїки цвітної капуста (CaMV) і вірус золотої мозаїки томатів (TGMV).

Загальні аспекти трансформації системи-хазяїни клітини ссавця описані Акселом [Axel, Патент США №4399216, виданий 16 серпня 1983 року]. Клітини ссавців можна трансформувати за допомогою різноманітних методів і, у тому числі, шляхом трансфекції у присутності фосфату кальцію, мікроін'єкції, електропорації або трансдукції за участі вірусних векторів.

До числа способів введення послідовності чужорідної ДНК у геноми рослин або дріжджів належать: (1) механічні способи, такі як мікроін'єкція ДНК в одиночні клітини або протопласти, здійснювана при інтенсивному перемішуванні клітин зі скляними кульками у присутності ДНК, або при "вистрілюванні" вольфрамовими чи золотими кульками в клітини або протопласти; (2) введення ДНК шляхом перетворення клітинних мембран на такі, що є проникними для макромолекул, обробкою їх поліетиленгліколем або за допомогою електроімпульсів

високої напруги (електропорация); або (3) застосування ліпосом (що містять кДНК), котрі зливаються з клітинними мембранами.

Експресію молекул мутантного CTLA4 можна виявити за допомогою добре відомих методів. Наприклад, мутантні молекули можна виявити по забарвленню геля SDS-PAGE Кумасі блакитним або за допомогою імуноблотінгу із застосуванням антитіл, що зв'язуються з CTLA4. Виділення білка можна здійснювати за допомогою стандартних способів очищення білків, наприклад, шляхом афінної хроматографії або іонообмінної хроматографії, одержуючи таким чином практично чистий продукт [R. Scopes, "Protein Purification. Principles and Practice", Third Edition, Springer-Verlag (1994)].

Даним винаходом також охоплюються молекули розчинного мутантного CTLA4 (розчинний мутантний CTLA4), що продукуються відповідно до описаного вище.

Мутагенез CTLA4lg за допомогою кодонів

В одному із варіантів здійснення даного винаходу застосовуються сайт-скерований мутагенез і нова методика скринінгу для ідентифікації декількох мутацій у позаклітинній області CTLA4, що підвищують авідність зв'язування з CD86. У цьому варіанті здійснюються мутації в залишках на ділянках позаклітинної області CTLA4 від серину 25 до аргініну 33, С'-ланцюга (аланін 49 і треонін 51), F-ланцюга (лізин 93, глутамінова кислота 95 і лейцин 96) і на ділянці від метіоніну до тирозину 102, від тирозину 103 до гліцину 107 і в G-ланцюзі в положеннях глутамін 111, тирозин 114 і ізолейцин 115. Ці сайти обрані на основі досліджень злитих білків химерного CD28/CTLA4 [Peach et al., J. Exp. Med. (1994) 180: 2049-2058] і на основі моделі, що дозволяє спрогнозувати те, бічні ланцюги яких амінокислотних залишків піддаються дії розчинника, і відсутність ідентичності або гомології амінокислотних залишків у деяких положеннях між CD28 і CTLA4. Далі, будь-який залишок, який розташований у безпосередній близькості (5-20 ангстремів) до залишків, що ідентифікуються, розглядається як частина даного винаходу.

З метою синтезу і скринінгу молекул розчинного мутантного CTLA4 зі зміненою афінністю до CD80 і/або CD86 обрана стратегія, що складається з двох стадій. На базі результатів експериментів спочатку була створена бібліотека мутацій у специфічному кодоні позаклітинної ділянки CTLA4, а потім проведено її скринінг шляхом аналізу за методом Bioscore з метою ідентифікації мутантів зі зміненою реактивністю у відношенні до CD80 або CD86. В аналітичному приладі Bioscore (Pharmacia, Piscataway, NJ.) використовується детекторна система резонансу поверхневого плазмону, яка включає у себе ковалентне зв'язування або CD80lg або CD86lg із покритим декстраном сенсорним чипом, розташованим в детекторі. Після цього речовину (молекули випробуваної речовини), що аналізується, упорскують у камеру, що містить сенсорний чип, і оцінюють кількість комплементарного білка, що зв'язується, виходячи зі зміни молекулярної маси, що фізично зв'язується з покритим декстраном боком сенсорного чипа; зміну молекулярної маси можна вимірювати за допомогою детекторної системи.

Переваги даного винаходу

Оскільки зв'язування CTLA4 із CD80 і CD86 характеризується високими швидкостями протікання ("on", "до") і високими швидкостями дисоціації ("off", "від") і оскільки комплекси CTLA4lg-CD86 дисоціюють приблизно у 5-8 разів швидше, ніж комплекси CTLA4lg-CD80, резонно припустити, що уповільнення швидкості дисоціації CTLA4lg у його комплексі з CD80 і/або CD86 приводить до утворення сполук (молекул) із більш сильними імуносупресорними властивостями. Отже, можна очікувати, що молекули розчинного мутантного CTLA4, що характеризуються більш високою авідністю до CD80-або CD86-позитивних клітин порівняно з CTLA4 дикого типу або немутантними формами CTLA4lg, будуть блокувати примування антиген-специфічних активованих клітин із більш високою ефективністю, ніж CTLA4 дикого типу або немутантні форми CTLA4lg.

Крім того, витрати на одержання CTLA4lg є дуже високими. Мутантний CTLA4lg (молекули), що володіє більш сильними імуносупресорними властивостями, може застосовуватися в клініці в значно менших дозах, ніж немутантний CTLA4lg, даючи аналогічні рівні імуносупресії. Отже, застосування розчинного мутантного CTLA4, наприклад, L104EA29Ylg, може бути дуже ефективним із погляду вартості.

Нижче наведені приклади, метою яких є ілюстрація даного винаходу і надання допомоги фахівцям щодо його здійснення і застосування. Наведені приклади жодним чином не обмежують об'єму винаходу.

Приклади

Приклад 1

У даному прикладі описані способи одержання нуклеотидних послідовностей, що кодують молекули розчинного мутантного CTLA4 за даним винаходом. Отриманий "односайтовий" мутант (мутант по одному сайту) L104Elg, і вивчена кінетика його зв'язування з CD80 і/або з CD86. Нуклеотидна послідовність L104Elg використана як матриця для створення послідовності "двосайтового" мутантного (мутантного по двох сайтах) CTLA4, L104EA29Ylg, і вивчена кінетика його зв'язування з CD80 і/або з CD86.

Мутагенез CTLA4 із використанням кодонів

Для визначення мутантних молекул CTLA4lg із меншими швидкостями дисоціації («від»-швидкості) у молекулах із CD80 і/або CD86 вироблена стратегія мутагенезу і скринінгу. "Односайтові" мутантні нуклеотидні послідовності одержують, використовуючи як матрицю CTLA4lg [патенти США №№5844095; 5851795; і 5885796; ATCC №68629]. Мутагенні олігонуклеотидні PCR-праймери створені для випадкового мутагенезу кодону специфічної кДНК, при цьому в положеннях 1 і 2 кодону припускається будь-яка основа, але в положенні 3 перебуває тільки гуанін або тимін (XXG/T; відомий також як NNG/T). Таким шляхом можна здійснювати довільну мутацію специфічного кодону, що кодує амінокислоту, щоб кодувати кожну з 20 амінокислот. При цьому мутагенез XXG/T дає 32 потенційних кодони, що кодують кожну з 20 амінокислот. PCR-продукти, що кодують мутації в безпосередній близькості до -M97-G107 CTLA4lg (див. Фіг.7 або 8), відщеплюють за допомогою SacI/XbaI і субклонують в аналогічним чином розрізаний вектор експресії CTLA4lg  $\pi$ LN. Цей спосіб застосовують, щоб одержати "односайтову" CTLA4-мутантну молекулу L104Elg (Фіг.8).

З метою мутагенезу в просторовій близькості до S25-R33 CTLA4lg сайт рестрикції NheI, що мовчить, спочатку вводять 5' до цієї петлі за допомогою PCR праймер-скерованого мутагенезу. PCR-продукти розщеплюють під дією NheI/XbaI і субклонують у розрізані аналогічним чином вектори експресії CTLA4lg або

L104E1g. Цей метод використовують для одержання молекули "двосайтового" мутантного CTLA4, L104EA29Y1g (Фіг.7). Зокрема, нуклеотидна молекула, що кодує "односайтову" мутантну молекулу CTLA4, L104E1g, використана як матриця для одержання молекули "двосайтового" мутантного CTLA4, L104EA29Y1g. Вектор pILN, що містить L104EA29Y1g, показаний на Фіг.12.

#### Приклад 2

Нижче поданий опис способів скринінгу, застосовуваних для ідентифікації "одно-" і "двосайтових" мутантних CTLA4-поліпептидів, які експресують за допомогою описаних у Прикладі 1 конструкцій, що виявляють більш високу авідність зв'язування з антигенами CD80 і CD86 порівняно з молекулами немутантного CTLA41g.

Сучасні дослідження *in vitro* і *in vivo* показують, що CTLA41g сам по собі не спроможний цілком блокувати примування антиген-специфічних активованих Т-клітин. Дослідження *in vitro* з визначення інгібування проліферації Т-клітин, проведені з CTLA41g і будь-яким моноклональним антитілом, що зв'язує CD80 або CD86, показують, що моноклональне антитіло, специфічне до CD80, не збільшує інгібування CTLA41g. Проте, моноклональне антитіло проти CD86 підвищує інгібування, засвідчуючи те, що CTLA41g неефективно блокує взаємодію з CD86. Ці дані підтверджують виявлений раніше Лінслеєм той факт, що для інгібування опосередкованих CD80 клітинних реакцій потрібно, приблизно, у 100 разів нижча концентрація CTLA41g, ніж для CD86-опосередкованих реакцій [Linsley et al. (Immunity. (1994), 1: 793-801]. Виходячи з цього, було зроблене припущення, що молекули розчинного мутантного CTLA4, які характеризуються більш високою авідністю у відношенні до CD86, ніж CTLA4 дикого типу, спроможні краще блокувати примування антиген-специфічних активованих клітин, ніж CTLA41g.

З цією метою молекули розчинного мутантного CTLA4, описаного у Прикладі 1, піддають скринінгу, застосовуючи нову методику, для того, щоб ідентифікувати деякі мутації в позаклітинній області CTLA4, що підвищують авідність зв'язування з CD80 і CD86. Така стратегія скринінгу дає ефективний метод безпосередньої ідентифікації мутантів із порівняно меншими "від"-швидкостями, що не потребує очищення білка або кількісного визначення, оскільки визначення "від"-швидкості не залежить від концентрації [O'Shannessy D. J., et al., (1993) Anal. Biochem. 212: 457-468].

Клітини COS трансфікують, використовуючи мініпрепарат очищеної плазмідної ДНК, і культивують протягом декількох днів. До біосенсорних чипів BIAcore (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden), покритих розчинними CD801g або CD861g, додають триденні кондиціоновані культурні середовища. Специфічне зв'язування і дисоціацію мутантних білків визначають за допомогою резонансу поверхневого плазмону [O'Shannessy et al., (1993) Anal. Biochem. 212: 457-468]. Всі експерименти проводять на біосенсорах BIAcore™ і BIAcore™ 2000 при температурі 25°C. Ліганди іммобілізують на сенсорних чипах NCM5 для пошуку сполук (Pharmacia), використовуючи стандартне зв'язування з N-етил-N'-(диметиламінопропіл)карбодіімід-N-гідроксисукцинімідом [Johnsson, B., et al., (1991) Anal. Biochem. 198: 268-277; Khilko, S. N., et al., (1993) J. Biol. Chem. 268: 15425-15434].

#### Методика скринінгу

Клітини COS, вирощені в 24-ямкових планшетах для тканинних культур транзитивно трансфікують за допомогою ДНК, що кодує мутантний CTLA41g. Через 3 дні збирають культурні середовища, що містять секретований розчинний мутантний CTLA41g.

Потік кондиціонованих COS-клітинних культурних середовищ пропускають через біосенсорні чипи BIAcore, дериватизовані при використанні CD801g або CD861g (як описано в [Greene et al., (1996) J. Biol. Chem. 271: 26762-26771], або мутантні молекули ідентифікують при "від"-швидкостях, менших за "від"-швидкості, що спостерігаються для CTLA41g дикого типу. Далі секвенують кДНК, що відповідають зразкам обраних середовищ, і одержують ДНК для здійснення транзиторної трансфекції COS-клітин у великих масштабах, за допомогою якої одержують мутантний білок CTLA41g після очищення від протеїну А культурного середовища.

Умови аналізу BIAcore і методика аналізу даних рівноважного зв'язування є такими, як описано в [Greene et al., (1996) J. Biol. Chem. 271: 26762-26771] і як подано в даному описі.

#### Аналіз даних BIAcore

Діаграму чутливості перед аналізом нормалізують до нульового рівня відгуку (RU). Для визначення фонових рівнів відгуку (RU) на основі великої різниці значень коефіцієнтів рефракції розчинів зразки пропускають через макет-дериватизовані проточні кювети. Константи рівноважної дисоціації ( $K_d$ ) розраховують із графіка залежності  $R_{eq}$  від  $C$ , де  $R_{eq}$  означає відгук (відповідь) у стаціонарному стані мінус відгук на макет-дериватизованому чипі, а  $C$  означає молярну концентрацію аналіту. Криві зв'язування аналізують, використовуючи програми для креслення нелінійних кривих (Prism, GraphPAD Software), що випускаються промисловістю.

Експериментальні дані спочатку наближують до моделі зв'язування одиночного ліганду з одиночним рецептором (1-сайтова модель, тобто проста ленгмюрова система  $A+B \rightleftharpoons AB$ ), і константи рівноважної асоціації ( $K_a = [A] \cdot [B] / [AB]$ ) обчислюють за допомогою рівняння  $R = R_{max} C / (K_d + C)$ . Потім наближують дані до найпростішої двосайтової моделі зв'язування ліганду (тобто до рецептора, що має два не взаємодіючих незалежних сайти зв'язування згідно з рівнянням  $R = R_{max1} \cdot C / (K_{d1} + C) + R_{max2} \cdot C / (K_{d2} + C)$ ).

Відповідність (придатність) цих двох моделей аналізують візуально, порівнюючи з експериментальними даними, і статистично, за допомогою F-критерію суми квадратів. Як найбільш відповідну вибирають найпростішу односайтову модель, якщо двосайтова модель не виявляє значно більшої відповідності ( $p < 0,1$ ).

Аналіз асоціації і дисоціації проводять за допомогою програми BIA evaluation 2.1 Software (Pharmacia). Константи швидкості асоціації  $k_{on}$  обчислюють у два способи, беручи до уваги як гомогенну односайтову взаємодію, так і паралельну двосайтову взаємодію. Для односайтової взаємодії значення  $k_{on}$  обчислюють за рівнянням  $R_t = R_{eq}(1 - \exp^{-k_s(t-t_0)})$ , де  $R_t$  означає відповідь (відгук) у даний момент часу  $t$ ;  $R_{eq}$  означає відгук (відповідь) у стаціонарному стані;  $t_0$  означає час у початковий момент ін'єкції; і  $k_s = dR/dt = k_{on} \cdot C_{k_{off}}$  і де  $C$  означає концентрацію аналіту, обчислену як функція мономерних сайтів зв'язування. Для двосайтових взаємодій значення  $k_{on}$  вираховують за рівнянням  $R_t = R_{eq1}(1 - \exp^{-k_{s1}(t-t_0)}) + R_{eq2}(1 - \exp^{-k_{s2}(t-t_0)})$ . Для кожної моделі значення  $k_{on}$

визначають за тангенсом кута нахилу (приблизно, за 70% максимальної асоціації) графіка залежності  $k_s$  від  $C$

Дані дисоціації аналізують відповідно до односайтової ( $AB=A+B$ ) і двосайтової ( $A_2B_2=A_2+B_2$ ) моделей, а константи швидкості ( $k_{off}$ ) вираховують, виходячи з найбільш відповідних кривих. Можна використовувати модель сайту зв'язування, за винятком тих випадків, коли залишки перевищують фон комп'ютера (2-10 RU, залежно від комп'ютера (EOM)), у цьому випадку застосовують модель сайту з двома зв'язуваннями. Півперіод займання рецептора обчислюють за допомогою співвідношення  $t_{1/2}=0,693/k_{off}$ .

Проточна цитометрія:

Мишачі mAb L307.4 (анти-CD80) були отримані від Becton Dickinson (San Jose, California), а IT2.2 (анти-B7-0, відомі також як CD86) - від Pharmingen (San Diego, California). З метою імунного забарвлення CD-80-позитивні і/або CD-86-позитивні CHO-клітини видаляють із посудин із культурами, інкубуючи у фізіологічному розчині з фосфатним буфером (PBS), що містить 10мМ ЕДТК (EDTA). Клітини CHO в кількості  $(1-10) \times 10^5$  спочатку інкубують із mAbs або зі злитими білками імуноглобуліну в DMEM, що містить 10% ембріональної бичачої сироватки (FBS), потім відмивають і інкубують із реагентами другої стадії кон'югованих із флуоресцеїнізотіоціанатом антитіл кози проти людського або мишачого імуноглобуліну (Tago, Burlingame, California). Клітини відмивають в останній раз і аналізують на сканері FACScan (Becton Dickinson).

SDS-PAGE аналіз і хроматографія за розміром молекул

Аналіз за методом електрофорезу в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (SDS-PAGE) проводять на Tris/Гліцин 4-20% акриламідному гелі (Novex, San Diego, CA). Аналітичні гелі забарвлюють Кумасі блакитним, зображення вологих гелів одержують за допомогою цифрового сканування. CTLA4lg (25мкг) і L104EA29Ylg (25мкг) аналізують шляхом хроматографії за розміром молекул на колонці TSK-GEL G300 SW<sub>XL</sub> (7,8×300мм, Tosohaas, Montgomeryville, PA), зрівноваженій забуференим фосфатом фізіологічним розчином, що містить 0,02%  $\text{NaN}_3$ , при швидкості потоку 1,0мл/хв.

CTLA4XC<sub>120S</sub> і L104EA29YXC<sub>120S</sub>

Одноланцюгову CTLA4XC<sub>120S</sub> одержують за методикою, описаною в [Linsley et al., (1995) J. Biol. Chem. 270: 15417-15424]. Як матрицю використовують плазмиду експресії онкостатину M CTLA 4 (OMCTLA4), "прямий" праймер,

GAGGTGATAAAGCTTCACCAATGGGTGTACTGCTCACACAG

вибирають так, щоб його послідовність співпадала з послідовностями вектора; а "обернений" праймер,

GTGGTGTATTGGTCTAGATCAATCAGAATCTGGGCACGGTTC

відповідає останнім семи амінокислотам (тобто амінокислотам 118-124) позаклітинної області CTLA4 і містить сайт рестрикції ферментом і термінальний кодон (TGA). Оборнений праймер визначає мутацію C120S (цистеїн на серині в положенні 120). Зокрема нуклеотидна послідовність GCA (нуклеотиди 34-36) зображеного вище оберненого праймера заміняється на одну з таких нуклеотидних послідовностей: AGA, GGA, TGA, CGA, ACT або GCT. Для фахівця цілком зрозуміло, що нуклеотидна послідовність GCA є оберненою комплементарною послідовністю до кодону TGC для цистеїну. Подібно цьому нуклеотидні послідовності AGA, GGA, TGA, CGA, ACT або GCT є оберненими комплементарними послідовностями до кодонів для серину. Продукти полімеразної ланцюгової реакції розщеплюють за допомогою HindIII/XbaI і спрямовано субклонують у вектор експресії  $\pi$ LN (Bristol-Myers Squibb Company, Princeton, NJ). L104EA29YXC<sub>120S</sub> готують аналогічним чином. Кожну конструкцію контролюють шляхом секвенування ДНК.

Ідентифікація і біохімічна характеристика мутантів із високою авідністю

Для мутагенезу відбирають двадцять чотири амінокислоти, і приблизно 2300 мутантних білків, що утворюються, аналізують на зв'язування з CD86lg за методом поверхневого плазмонного резонансу (SPR, як описано вище). Переважні ефекти мутагенезу на кожному сайті підсумовані в Таблиця II. Випадковий мутагенез деяких амінокислот у S25-R33, очевидно, не змінює зв'язування з лігандом. Мутагенез E31 і R33 і залишків M97-Y102, очевидно, призводить до ослаблення зв'язування з лігандом. Мутагенез залишків S25, A29 і T30, K93, L96, Y103, L104 і G105 призводить до білків і до уповільнених "до"-швидкостей і/або уповільнених "від"-швидкостей. Ці результати підтверджують попередні спостереження, згідно з якими залишки на ділянці S25-R33 і залишки на ділянці M97-Y102 або поруч з нею впливають на зв'язування з лігандом [Peach et al., (1994) J. Exp. Med. 180: 2049-2058].

Мутагенез сайтів S25, T30, K93, L96, Y103 і G105 дозволяє ідентифікувати деякі мутантні білки з уповільненими швидкостями "від" CD86lg. Проте, у цих прикладах повільна "від"-швидкість компенсується повільною "до"-швидкістю, у результаті чого утворюються мутантні білки із загальною авідністю до CD86lg, яка, очевидно, є аналогічною загальній авідності, що спостерігається у CTLA4lg дикого типу. Крім того, мутагенез K93 призводить до значної агрегації, яка може бути відповідальною за кінетичні зміни, що спостерігаються.

Випадковий мутагенез L104 із наступною COS-клітинною трансфекцією і SPR-скринінгом зразків культурних середовищ над іммобілізованим CD86lg дає шість зразків середовищ, що містять мутантні білки, що мають, приблизно, удвічі менші «від»-швидкості, ніж CTLA4lg дикого типу. У результаті секвенування відповідних кДНК цих мутантів знайдено, що кожна з них кодує мутацію лейцину на глутамінову кислоту (L104E). Очевидно, заміна лейцину на аспарагінову кислоту (L104D) не впливає на зв'язування CD86lg.

Далі мутагенез повторюють у кожному сайті, переліченому в Таблиці II; цього разу як PCR-темплат (матрицю) замість CTLA4lg дикого типу використовують L104E, згідно з описаним вище. SPR аналіз, також з використанням {іммобілізованого CD86lg, визначає шість препаратів культурного середовища, отриманих при мутагенезі аланіну 29, з білками, що мають "від"-швидкість, приблизно, у 4 рази меншу, ніж CTLA4lg дикого типу. Серед них два найповільніших являють собою заміну на тирозин (L104EA29Y), два є замінами на лейцин (L104EA29L), один із заміною на триптофан (L104EA29W) і один із заміною на треонін (L104EA29T). Очевидно, що не ідентифіковано ніяких мутантів із повільною "від"-швидкістю, коли випадково мутує один аланін 29 у CTLA4lg дикого типу.

Відносно молекулярну масу і стан агрегації очищеного L104E і L104EA29Ylg оцінюють у спосіб SDS-PAGE аналізу і хроматографією за розміром часток. L104EA29Ylg (~1мкг; доріжка 3) і L104Elg (~1мкг; доріжка 2),

очевидно, мають таку ж електрофоретичну рухливість, що і CTLA4Ig (~1мкг; доріжка 1) при наявності відновника (~50кДа; +βME; плюс 2-меркаптоетанол) і без відновлення (~100кДа; -βME) (Фіг.10А). Хроматографія за розміром часток показує, що L104EA29YIg (Фіг.10С), очевидно, має таку ж рухливість, що і димерний CTLA4Ig (Фіг.10В). Основні піки відповідають димеру білка, тоді як міnorний пік швидшого елюювання на Фіг.10В відповідає агрегатам із більш високою молекулярною масою. Приблизно 5,0% CTLA4Ig являють собою агрегати з більш високою молекулярною масою, але немає доказів щодо присутності агрегації L104EA29YIg або L104Elg. Отже, більш тривке зв'язування зі CD86, що спостерігається для L104Elg і L104EA29YIg, не можна віднести на рахунок агрегації, що викликається мутагенезом.

Аналіз рівноваги і кінетики зв'язування

Аналіз рівноваги і кінетики зв'язування здійснюють на очищених від протеїну А CTLA4Ig, L104Elg і L104EA29YIg за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (SPR). Результати подані в Таблиці І. Константи рівноважної дисоціації, що спостерігаються, ( $K_d$ ; Таблиця І) обчислюють на основі кривих зв'язування, отриманих в інтервалі концентрацій (5,0-200нМ). L104EA29YIg зв'язується з CD86Ig сильніше, ніж L104Elg і CTLA4Ig. Більш низьке значення  $K_d$  для L104EA29YIg (3,21нМ), ніж для L104Elg (6,06нМ) або CTLA4Ig (13,9нМ), указує на більш високу авідність зв'язування L104EA29YIg із CD86Ig. Більш низьке значення  $K_d$ , у L104EA29YIg (3,66нМ), ніж у L104Elg (4,47нМ) або CTLA4Ig (6,51нМ), указує на більш високу авідність зв'язування L104EA29YIg зі CD80Ig.

Кінетика зв'язування показує, що порівняльні "до"-швидкості зв'язування CTLA4Ig, L104Elg і L104EA29YIg зі CD80 є подібними одна одній, як і "до"-швидкості для CD86Ig (Таблиця І). Проте "від"-швидкості для цих молекул не є еквівалентними (Таблиця І). Порівняно з CTLA4Ig швидкість L104EA29YIg "від" CD80Ig є, приблизно, у 2 рази меншою, а швидкість "від" CD86Ig є меншою приблизно у 4 рази. L104E має "від"-швидкості, проміжні між L104EA29YIg та CTLA4Ig. Оскільки введення цих мутацій незначно впливає на "до"-швидкості, збільшення авідності до CD80Ig і до CD86Ig, що спостерігається для L104EA29YIg, насамперед викликано, очевидно, зменшенням "від"-швидкостей.

Щоб з'ясувати, викликане збільшення авідності L104EA29YIg до CD80Ig і до CD86Ig мутаціями, що впливають на те, як кожний мономер асоціюється в димер, чи структурними змінами у кожному мономері, що підвищують авідність, одержують одноланцюгові конструкції позаклітинних областей CTLA4 і L104EA29YIg із наступним мутагенезом цистеїну 120 на серин, як описано вище і в роботі [Linsley et al., (1995) J. Biol. Chem., 270: 15417-15424]. Як було показано за допомогою методу гель-фільтрації [Linsley et al., (1995), див. вище], очищені білки CTLA4X<sub>C120S</sub> і L104EA29YX<sub>C120S</sub> мономерними до того, як їхні властивості зв'язуватися з лігандами аналізуються за допомогою методу SPR. Результати показують, що афінність зв'язування обох мономерних білків із CD86Ig є, приблизно, у 35-80 разів меншою, ніж афінність зв'язування, що спостерігається у відповідних їхніх димерів (Таблиця І). Це підтверджує раніше опубліковані дані, котрими встановлено, що для високої авідності зв'язування з лігандом потрібна димеризація CTLA4 [Greene et al., (1996) J. Biol. Chem. 271: 26762-26771].

Афінність зв'язування L104EA29YX<sub>C120S</sub> як із CD80Ig, так і з CD86Ig є, приблизно, у 2 рази вищою, ніж афінність зв'язування з ними CTLA4X<sub>C120S</sub>. Збільшення афінності викликане більш ніж у 3 рази уповільненою швидкістю дисоціації від обох лігандов. Отже, найбільш імовірно, що сильніше зв'язування L104EA29YIg із лігандом викликано структурними змінами, які підвищують авідність і вводяться в кожний мономерний ланцюг, ніж змінами, які викликають димеризацію молекули.

Місце розташування і структурний аналіз мутацій, що підвищують звідність.

Структура позаклітинної IgV-подібної області CTLA4 нещодавно була визначена за допомогою ЯМР-спектроскопії [Metzler et al., (1997) Nature Struct. Biol., 4: 527-531]. Це дозволяє знайти точне місце розташування лейцину 104 і аланіну 29 у тримірній складці (Фіг.11А-В). Лейцин 104 розташований поруч із висококонсервативною амінокислотою послідовністю MYPPPY. Аланін 29 розташований біля С-кінця ділянки S25-R33, що є близькою до ділянки MYPPPY. Хоча між залишками цих двох ділянок існує значна взаємодія, безпосередньої взаємодії між L104 і A29 очевидно немає, хоча обидва вони містяться у білку частину сусіднього гідрофобного ядра. Вплив двох мутантів, що підвищують авідність, на структуру оцінюють за допомогою моделі. Мутація A29Y легко розташовується в кармані між ділянкою S25-R33 і ділянкою MYPPPY і може служити для стабілізації конформації ділянки MYPPPY.

У CTLA4 дикого типу L104 формує сильну гідрофобну взаємодію між L96 і V94 біля ділянки MYPPPY. З двох причин малоімовірно, що мутація глутамінової кислоти набуває конформації, аналогічної конформації L104. Перша полягає в тому, що без значних пертурбацій на ділянці S25-R33 є занадто мало місця для розташування більш довгого бічного ланцюга глутамінової кислоти, а друга - в тому, що великою є енергія, яка втрачається на те, щоб "нести" негативний заряд бічного ланцюга глутамінової кислоти в гідрофобній ділянці. Проте, дослідження моделей дозволяють передбачити, що бічний ланцюг глутамінової кислоти виштовхується на поверхню, де його заряд може стабілізуватися за рахунок сольватації. Така конформаційна зміна може легко розташовуватися біля G105 при мінімальному спотворенні інших залишків на цих ділянках.

Зв'язування мутантів із високою авідністю з клітинами CHO, що експресують CD80 або CD86

FACS-аналіз (Фіг.2) зв'язування CTLA4Ig і мутантних молекул з клітинами CD80+ і CD86+CHO, що стійко трансфектуються, здійснюють так, як подано в даному описі. CD80-позитивні і CD86-позитивні CHO клітини інкубують зі збільшуваними концентраціями CTLA4Ig, L104EA29YIg або L104Elg, а потім відмивають. Зв'язаний злитий білок імуноглобуліну виявляють за допомогою кон'югованих із флуоресцеїнізотіоціанатом антитіл кози проти людського імуноглобуліну.

Як показано на Фіг.2, CD80-позитивні або CD86-позитивні CHO клітини ( $1,5 \times 10^5$ ) інкубують із зазначеними концентраціями CTLA4Ig (темні квадрати), L104EA29YIg (кільця) або L104Elg (трикутники) протягом 2 годин при 23°C, відмивають і інкубують із кон'югованими з флуоресцеїнізотіоціанатом антитілами кози проти людського імуноглобуліну. Зв'язування в цілому з 5000 життєздатних клітин аналізують (одне єдине визначення) на FACScan і середнє значення інтенсивності флуоресценції (MFI) визначають по даних гістограм за допомогою PC-LYSYS. Дані коректують на фон флуоресценції, що вимірюється на клітинах, інкубованих

тільки з реагентом другої стадії (MFI=7). Контрольне L6 mAb (80мкг/мл) дає MFI<30. Ці результати є типовими для чотирьох незалежних експериментів.

Зв'язування L104EA29Ylg, L104Elg і CTLA4lg із людськими CD80-трансфікованими CHO-клітинами є приблизно еквівалентними (Фіг.2A). L104EA29Ylg і L104Elg зв'язуються міцніше зі CHO-клітинами, що стійко трансфікуються з людськими CD86, ніж CTLA4lg (Фіг.2B).

Функціональний аналіз:

Людські CD4-позитивні Т-клітини виділяють шляхом імуномагнітної негативної селекції [Linsley et al., (1992) J. Exp. Med. 176: 1595-1604]. Виділені CD4-позитивні Т-клітини стимулюють форбалміростатацетатом (PMA) плюс CD80-позитивні або CD86-позитивні CHO-клітини при наявності титрувальних концентрацій інгібітора. CD4-позитивні Т-клітини у кількості  $(8-10 \times 10^4/\text{ямку})$  культивують при наявності 1 нМ PMA у присутності або у відсутності опромінених стимуляторів CHO-клітин. Проліферативні відповіді вимірюють, додаючи 1мкКі/ямку [3H]тимідину протягом останніх 7 годин із 72 годин культивування. Інгібування Т-клітин, стимульованих за допомогою PMA плюс CD80-позитивні CHO, або CD86-позитивні CHO, здійснюють при використанні L104EA29Ylg і CTLA4lg. Результати подані на Фіг.3. L104EA29Ylg інгібує проліферацію оброблених PMA CHO-клітин сильніше, ніж CTLA4lg (Фіг.3A). L104EA29Ylg також є більш ефективним, ніж CTLA4lg, при інгібуванні проліферації оброблених PMA CD86-позитивних CHO-клітин. (Фіг.3B). Отже, L104EA29Ylg являє собою більш потужний інгібітор опосередкованої як CD80-, так і CD-86 співстимуляції Т-клітин.

На Фіг.4 показано інгібування за допомогою L104EA29Ylg і CTLA4lg аlostимульованих людських Т-клітин, отриманих так, як зазначено вище, і додатково аlostимульованих за використання лінії людських В-лімфобластоїдних клітин (LCL), названої PM, яка експресує CD80 і CD86 (кількість Т-клітин  $3,0 \times 10^4/\text{ямку}$  і PM  $8,0 \times 10^3/\text{ямку}$ ). Первинна аlostимуляція здійснюється протягом 6 днів, потім клітини витримують у пульсовому режимі з  $^3\text{H}$ -тимідином протягом 7 днів перед визначенням уведеної радіоактивної мітки.

Вторинну аlostимуляцію здійснюють таким чином. Через сім днів первинні аlostимульовані Т-клітини збирають над середовищем для фракціонування лімфоцитів (LSM) (ICN, Aurora, OH) і залишають на 24 години. Далі Т-клітини знову (удруге) стимулюють у присутності кількостей CTLA4lg і L104EA29Ylg, що титруються, при додаванні PM у тих же співвідношеннях, які зазначені вище. Стимуляцію проводять протягом 3 днів, після чого клітини витримують у пульсовому режимі з радіоактивною міткою і збирають так, як зазначено вище. Дія L104EA29Ylg на первинні аlostимульовані Т-клітини показана на Фіг.4A. Дія L104EA29Ylg на вторинні аlostимульовані Т-клітини показана на Фіг.4B. L104EA29Ylg інгібує проліферативну відповідь як первинних, так і вторинних Т-клітин краще, ніж CTLA4lg.

Для вимірювання продукування цитокінів (Фіг.5) ставлять дублікати планшетів для вторинної аlostимуляції. Через 3 дні культурні середовища аналізують, використовуючи набори ELISA (Biosource, Camarillo, CA), в умовах, що рекомендуються виробником. Результати вимірювань показують, що L104EA29Ylg більш ефективно, ніж CTLA4lg, блокує продукування Т-клітинами IL-2, IL-4 і  $\gamma$ -IFN цитокінів після вторинного алогенного подразника (Фіг.5A-C).

Дія L104EA29Ylg і CTLA4lg на реакцію лімфоцитів мавп у змішаній культурі (MLR) показана на Фіг.6. Моноядерні клітини периферичної крові (PBMCS;  $3,5 \times 10^4$  клітин/ямку від кожної мавпи) від 2 мавп очищають на середовищі для фракціонування лімфоцитів (LSM) і змішують з 2мкг/мл фітогематоглютиніну (PHA, ФГА). Клітини стимулюють протягом 3 днів, а потім протягом 16 годин витримують із радіоактивною міткою в пульсовому режимі перед збиранням. L104EA29Ylg інгібує проліферацію Т-клітин мавпи краще, ніж CTLA4lg.

Таблиця I

Константи рівноваги та уявні кінетичні константи  
(середнє значення±стандартне відхилення по трьох експериментах)

Імобілізований білок	Аналіт	$k_{on} (x \cdot 10^5) M^{-1} S^{-1}$	$k_{off} (x \cdot 10^{-3}) S^{-1}$	$K_d$ nM
CD80lg	CTLA4lg	$3,44 \pm 0,29$	$2,21 \pm 0,18$	$6,51 \pm 1,08$
CD80lg	L104Elg	$3,02 \pm 0,05$	$1,35 \pm 0,08$	$4,47 \pm 0,36$
CD80lg	L104EA29Ylg	$2,96 \pm 0,20$	$1,08 \pm 0,05$	$3,66 \pm 0,41$
CD80lg	CTLA4X <sub>C120S</sub>	$12,0 \pm 1,0$	$230 \pm 10$	$195 \pm 25$
CD80lg	L104EA29YX <sub>C120S</sub>	$8,3 \pm 0,26$	$71 \pm 5$	$85,0 \pm 2,5$
CD86lg	CTLA4lg	$5,95 \pm 0,57$	$8,16 \pm 0,52$	$13,9 \pm 2,27$
CD86lg	L104Elg	$7,03 \pm 0,22$	$4,26 \pm 0,11$	$6,06 \pm 0,05$
CD86lg	L104EA29Ylg	$6,42 \pm 0,40$	$2,06 \pm 0,03$	$3,21 \pm 0,23$
CD86lg	CTLA4X <sub>C120S</sub>	$16,5 \pm 0,5$	$840 \pm 55$	$511 \pm 17$
CD86lg	L104EA29YX <sub>C120S</sub>	$11,4 \pm 1,6$	$300 \pm 10$	$267 \pm 29$

Таблиця II

Вплив мутагенезу CTLA4lg на зв'язування з CD86lg у перелічених сайтах  
визначають за методом SPR (ППР), описаним вище. Переважний ефект показаний знаком «+»

Сайт мутагенезу	Ефекти мутагенезу		
	Відсутність видимої дії	Мала «до»-швидкість/ мала «від»-швидкість	Знижене зв'язування з лігандом
S25		+	
P26	+		
G27	+		

K28	+		
A29		+	
T30		+	
E31			+
R33			+
K93		+	
L96		+	
M97			+
Y98			+
P99			+
P100			+
P101			+
Y102			+
Y103		+	
L104		+	
G105		+	
I106	+		
G107	+		
Q111	+		
Y113	+		
I115	+		

Для фахівця у даній галузі зрозуміло, що даний винахід може бути втілений в інших формах, окрім розглянутих вище, не відхиляючись при цьому від його суті й основних ознак. Отже, викладені вище конкретні варіанти винаходу слід розглядати як такі, що ілюструють, але не обмежують його.

# SEQUENCE LISTING

<110> BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

<120> SOLUBLE CTLA4 MUTANT MOLECULES AND USES THEREOF

<130> D0028PCT/30436.57W01

<140> PCT/US01/17139

<141> 2001-03-23

<150> 60/287,576

<151> 2000-05-26

<150> 60/214,065

<151> 2000-06-26

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Oncostatin M  
CTLA4 (OMCTLA4) Forward Primer

<400> 1

gaggtgataa agcttcacca atgggtgtac tgctcacaca g 41

<210> 2

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Oncostatin M  
CTLA4 (OMCTLA4) Reverse Primer

<400> 2

gtggtgtatt ggtctagatc aatcagaatc tgggcacggt tc 42

<210> 3

<211> 1152

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:L104EA29YIg

<400> 3

atgggtgtac tgctcacaca gaggacgctg ctgagtcctg tccttgcaact cctgtttcca 60  
agcatggcga gcatggcaat gcacgtggcc cagcctgctg tggactaggc cagcagccga 120  
ggcatgcta gctttgtgtg tgagtatgca tctccaggca aatatactga ggtccgggtg 180  
acagtgtctt gccaggctga cagccagggt actgaagtct gtgcggcaac ctacatgatg 240  
gggaatgagt tgaccttctt agatgattcc atctgcacgg gcacctccag tggaaatcaa 300  
gtgaacctca ctatccaagg actgagggcc atggacacgg gactctacat ctgcaagggt 360  
gagctcatgt acccaccgcc atactacgag ggcataggca acggaaccca gatttatgta 420  
attgatccag aaccgtgccc agattctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 480  
acatccccac cgtccccagc acctgaactc ctggggggat cgtcagtcct cctcttcccc 540  
ccaaaaccca aggacacctt catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 600  
gacgtgagcc acgaagacct tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggt 660  
cataatgcca agacaagacc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 720  
gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggctctc 780



```

aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 840
gaaccacagg tgtacacccct gcccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 900
ctgacctgcc tggatcaaagg cttctatccc agcgacatcg cctgtgagtg ggagagcaat 960
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1020
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1080
tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1140
ccgggtaaat ga 1152

```

<210> 4  
 <211> 383  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: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> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:L104EIg

<400> 5  
 atgggtgtac tgctcacaca gaggacgctg ctcagtctgg tccttgact cctgtttcca 60  
 agcatggcga gcatggcaat gcacgtggcc cagcctgctg tggtagctgg cagcagccga 120  
 ggcattgcta gctttgtgtg tgagtatgca tctccaggca aagccactga ggtccgggtg 180  
 acagtgtctt ggccaggctga cagccagggt actgaagtct gtgcggcaac ctacatgatg 240  
 gggaaatgagt tgaccttctt agatgatctc atctgcacgg gcacctccag tggaaatcaa 300  
 gtgaacctca ctatccaagg actgagggcc atggacacgg gactctacat ctgcaagggtg 360  
 gagctcatgt acccaccgcc atactacgag ggcattagca acggaaccca gatttatgta 420  
 attgatccag aaccgtgccc agattctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 480  
 acatccccac cgtccccagc acctgaactc ctggggggat cgtcagttct cctcttcccc 540  
 ccaaaaccca aggacacctt catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 600  
 gacgtgagcc acgaagacct tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg 660  
 cataatgcca agacaaagcc gctggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 720  
 gtcctcaccg tcttgacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagt caaggctctc 780  
 aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 840  
 gaaccacagg tttacacctt gcccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccagggtcagc 900  
 ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagt ggagagcaat 960  
 gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgctc tggactccga cggctctctc 1020  
 ttctcttaca gcaagctcac cgtggacaag agcagggtgc agcaggggaa cgtcttctca 1080  
 tgcctcgtga tgcattgagg tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctcctgtctc 1140  
 ccgggtaaat ga 1152

<210> 6  
 <211> 383  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:L104EIg

<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> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:CTLA4Ig

<400> 7

```
atgggtgtac tgctcacaca gaggacgctg ctcagtctgg tccttgcaact cctgtttcca 60
agcatggcga gcatggcaat gcacgtggcc cagcctgctg tggactggc cagcagccga 120
ggcatcgcta gctttgtgtg tgagtatgca tctccaggca aagccactga ggtccgggtg 180
acagtgcctc ggcaggctga cagccagggt actgaagtct gtgcggcaac ctacatgatg 240
gggaatgagt tgaccttcct agatgattcc atctgcacgg gcacctccag tggaaatcaa 300
gtgaacctca ctatccaagg actgagggcc atggacacgg gactctacat ctgcaagggt 360
gagctcatgt acccaccgcc atactacctg ggcataggca acggaaccca gatttatgta 420
attgatccag aaccgtgccc agattctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 480
acatctccac cgtcccccag acctgaactc ctgggtggat cgtcagtcct cctcttcccc 540
ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtgggt 600
gacgtgagcc acgaagacc ttgagtcagg ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggt 660
cataatgcca agacaagacc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg ggtggtcagc 720
gtcctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggctccc 780
aacaaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 840
gaaccacagg tgtacacctt gcccccattc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 900
ctgacctgcc tggtaaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 960
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtag tggactccga cggctccttc 1020
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1080
tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1140
ccgggtaaat ga 1152
```

<210> 8

<211> 383

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: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
```

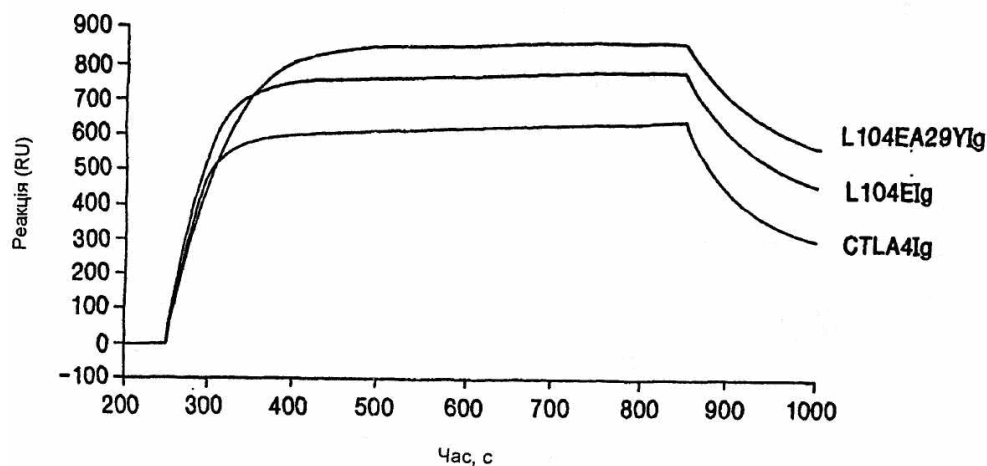
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 180 185 190  
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 195 200 205  
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 210 215 220  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val 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> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

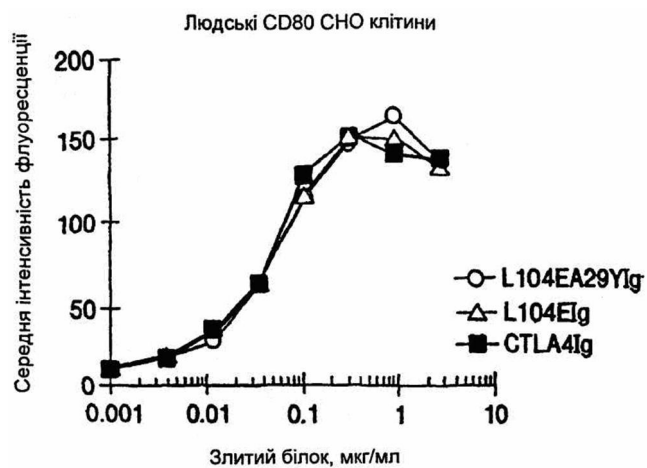
<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:MYPPPY amino acid sequence

<400> 9  
 Met Tyr Pro Pro Pro Tyr  
 1 5

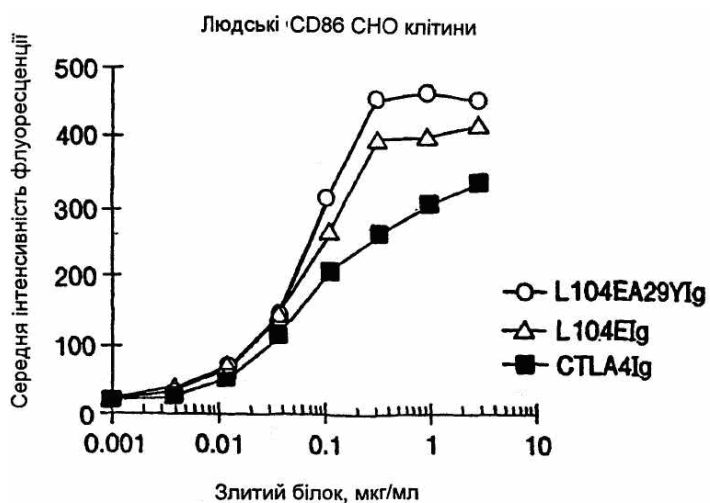
Рівноважне зв'язування з CD86Ig



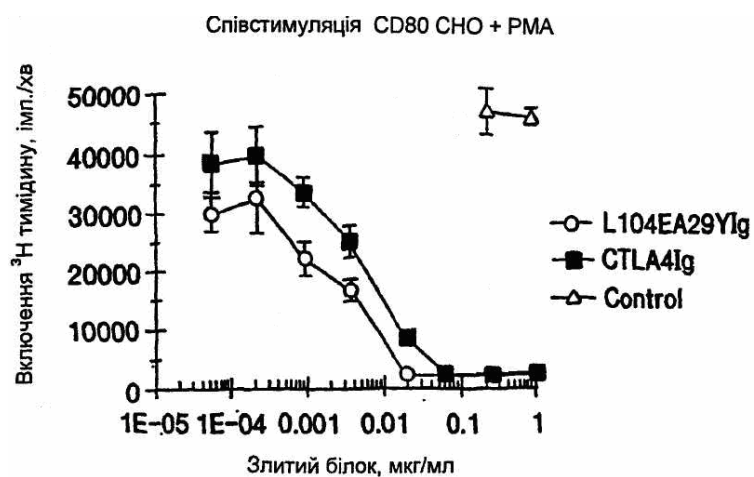
Фіг. 1



Фіг. 2А

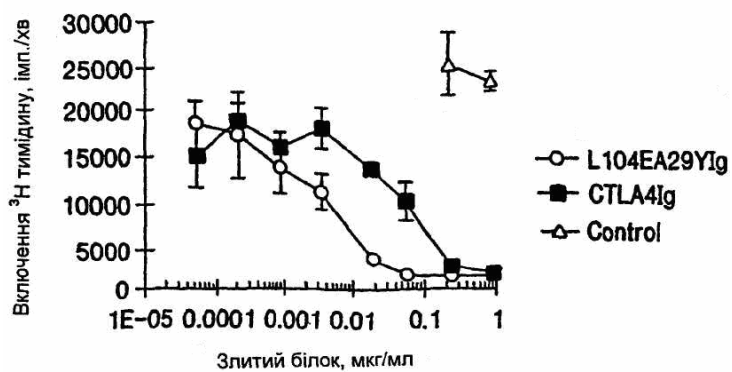


Фіг. 2В



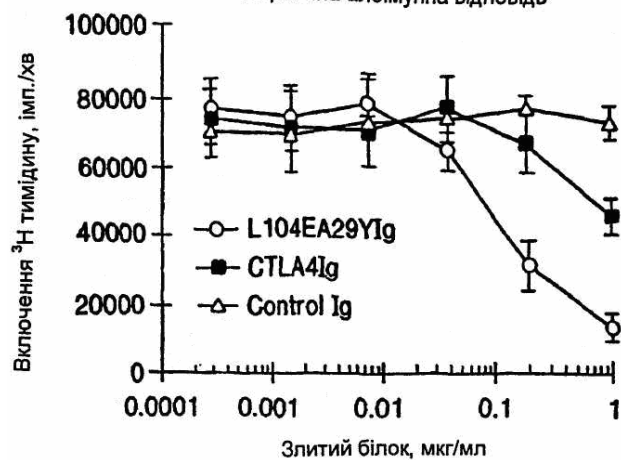
Фіг. 3А

Співстимуляція CD86 CHO + PMA



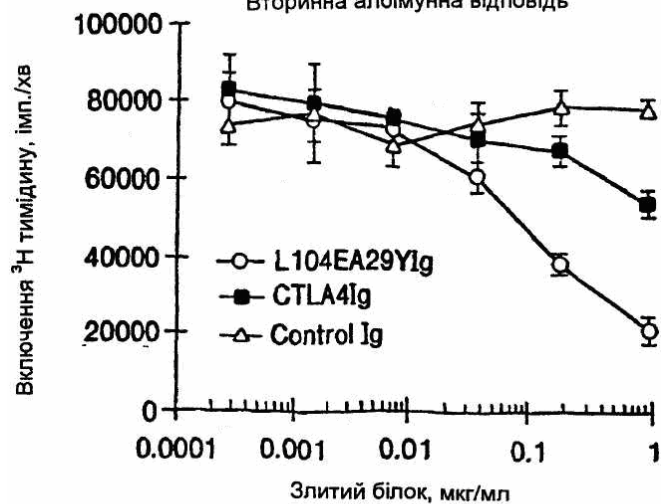
Фіг. 3В

Первинна алоімунна відповідь

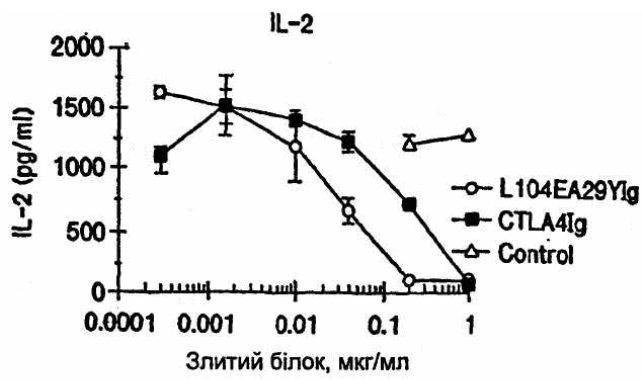


Фіг. 4А

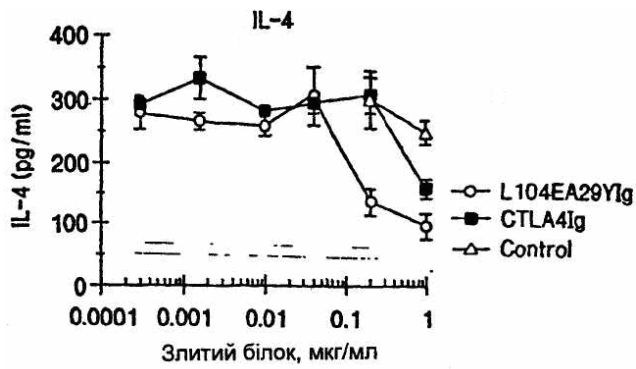
Вторинна алоімунна відповідь



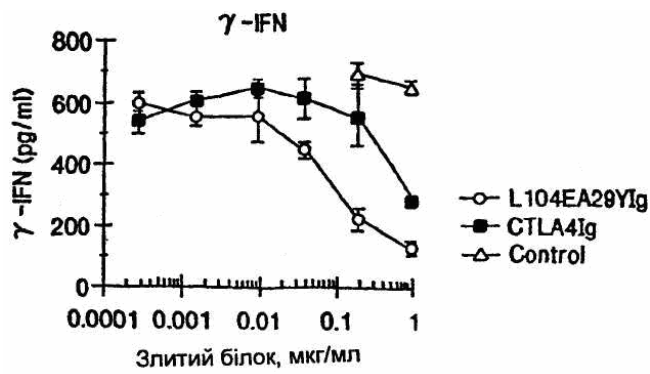
Фіг. 4В



Фіг.5А



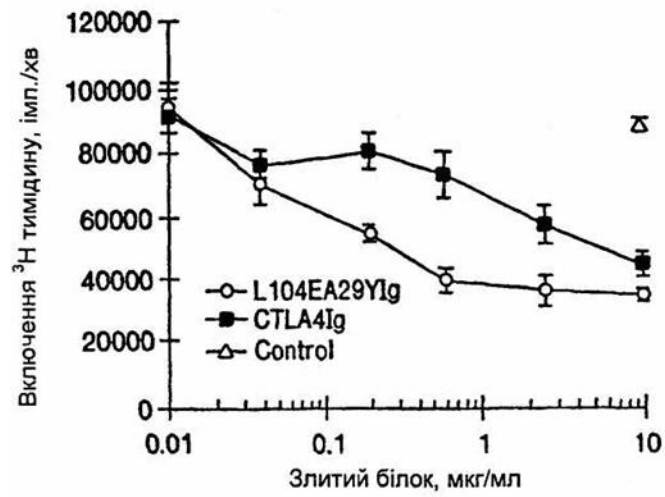
Фіг.5В



Фіг.5С



Інгібування РНА-індукованої проліферації мавпячих Т-клітин



Фіг. 6

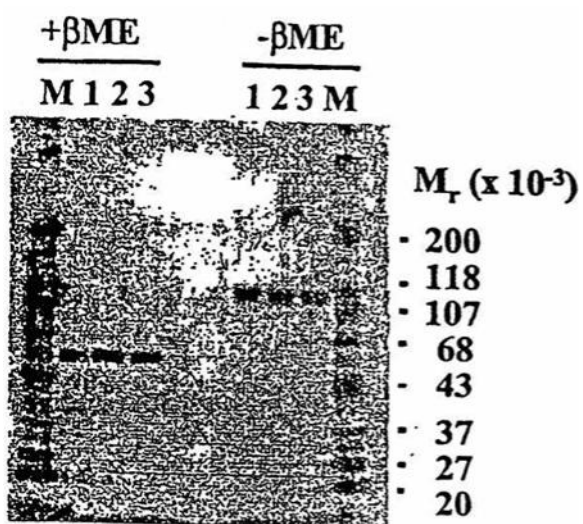
ATGGGTGTA CTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTGCACTCCTGTTTCCA	-19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P--	-7
AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCOGA	+42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--	+14
+1	
GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAATATACTGAGGTCCGGGTG	+102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--Y--T--E--V--R--V--	+34
ACAGTGCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG	+162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--	+54
GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAATCAA	+222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--	+74
GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG	+282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--	+94
GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACGAGGGCATAAGCAACGGAACCCAGATTTATGTA	+342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--	+114
ATTGATCCAGAACCGTGCCAGATTCTGATCAGGAGCCAAATCTTCTGACAAAACCTCAC	+402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--	+134
ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGATCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC	+462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P--	+154
CCAAAACCCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTG	+522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--	+174
GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG	+582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V--	+194
CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC	+642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--	+214
GTCTCTACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC	+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
GAACCAAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGC	+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
GGGCAGCCGGAGAACTACAAGACCAAGCCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTCCTTC	+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
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT	+1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--	+354
CCGGGTAAATGA	
P--G--K--*	

ATGGGTGTA	CTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTGCACTCCTGTTTCCA	-19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P--		-7
AGCATGGCGAGCATGGCAATGCAOGTGGCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCOGA		+42
S--M--A--S--M--A--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--		+14
	+1	
GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAAGCCACTGAGGTCCGGGTG		+102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--A--T--E--V--R--V--		+34
ACAGTGCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG		+162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--		+54
GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAATCAA		+222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--		+74
GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG		+282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--		+94
GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACGAGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA		+342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--		+114
ATTGATCCAGAACCGTGCCCGAGATTCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAATCAC		+402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--		+134
ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGATCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC		+462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P--		+154
CCAAAACCCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTG		+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
CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC		+642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--		+214
GTCCTCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC		+702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--		+234
AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA		+762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--		+254
GAACCAAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC		+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
GGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC		+942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--		+314
TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA		+1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S--		+334
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT		+1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--		+354
CCGGGTAAATGA		
P--G--K--*		

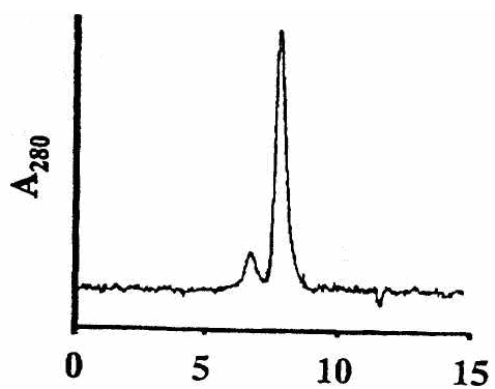
Fig. 8

ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCTTGCACTCCTGTTTCCA	-19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P--	-7
AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCOGA	+42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--	+14
+1	
GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAAGCCACTGAGGTCCGGGTG	+102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--A--T--E--V--R--V--	+34
ACAGTGCCTCGGAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG	+162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--	+54
GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA	+222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--	+74
GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCRTGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG	+282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--	+94
GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACCTGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA	+342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--L--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--	+114
ATTGATCCAGAACCGTGCCAGATTCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCAC	+402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--	+134
ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGTGGATCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC	+462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P--	+154
CCAAAACCCAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTG	+522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--	+174
GACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG	+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
GTCTCACCCTCTGCAACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC	+702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--	+234
AACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA	+762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--	+254
GAACACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGC	+822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--	+274
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT	+882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--	+294
GGGCAGCCGGAGAACTACTAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTC	+942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--	+314
TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA	+1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S--	+334
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCTGTCT	+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--*	

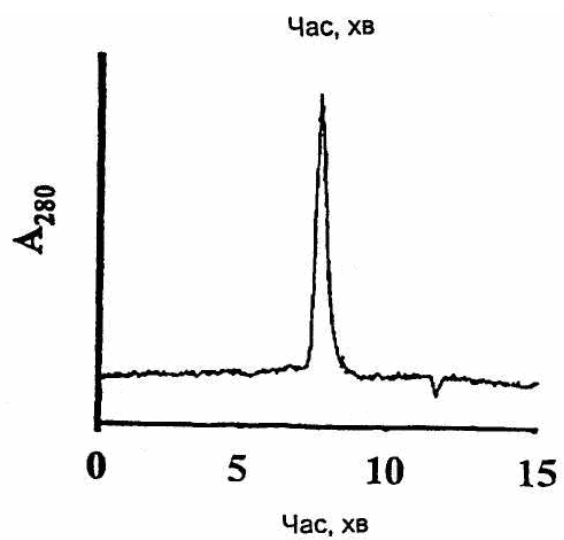
Фиг. 9



Фиг. 10А



Фиг. 10В



Фиг. 10С



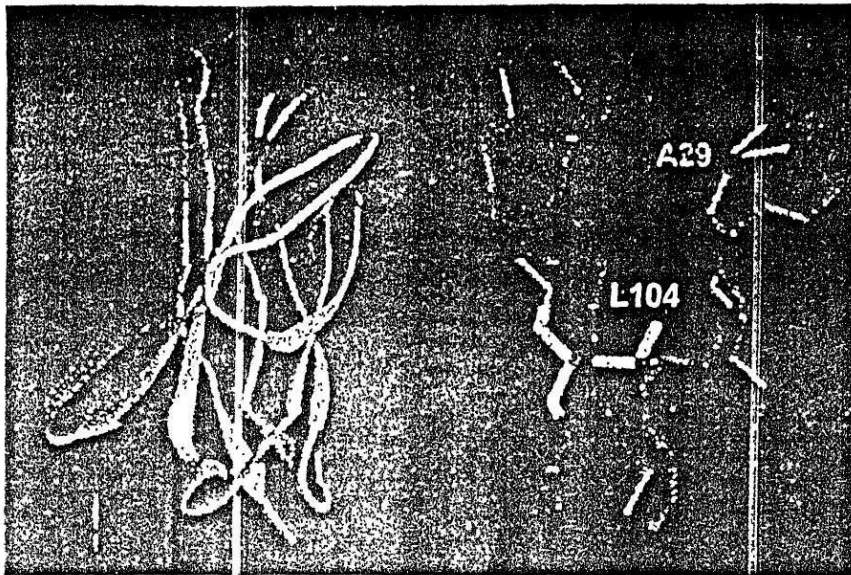


Fig. 11

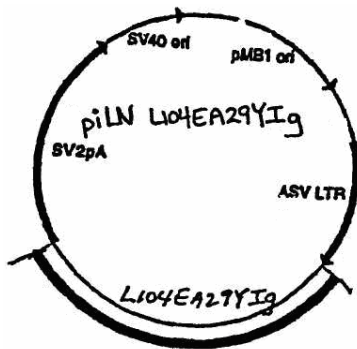


Fig. 12