

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-517806

(P2004-517806A)

(43) 公表日 平成16年6月17日(2004.6.17)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 37/02	4 C O 8 4
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 1/04	4 H O 4 5
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 7/00	A 6 1 P 7/00	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 198 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-507889 (P2002-507889)	(71) 出願人	391015708
(86) (22) 出願日	平成13年7月2日 (2001.7.2)		ブリistol-マイヤーズ スクイブ カン
(85) 翻訳文提出日	平成15年1月6日 (2003.1.6)		パニー
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/021204		B R I S T O L - M Y E R S S Q U I B
(87) 国際公開番号	W02002/002638		B C O M P A N Y
(87) 国際公開日	平成14年1月10日 (2002.1.10)		アメリカ合衆国 ニューヨーク州 101
(31) 優先権主張番号	60/215, 913		54 ニューヨーク パーク アベニュー
(32) 優先日	平成12年7月3日 (2000.7.3)		345
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062144
			弁理士 青山 稔
		(74) 代理人	100086405
			弁理士 河宮 治
		(74) 代理人	100068526
			弁理士 田村 恭生
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 可溶性 C T L A 4 分子を使用するリウマチ疾患の処置方法

(57) 【要約】

本発明は、内生 B 7 分子がそのリガンドと結合するのを遮断する可溶性 C T L A 4 分子を対象に投与することによる、リウマチ疾患を処置するための組成物および方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

B 7 分子と結合する可溶性 C T L A 4 変異分子の有効量を対象に投与する、リウマチ疾患の処置方法。

【請求項 2】

コルチコステロイド、非ステロイド抗炎症剤、シクロスポリン、プレドニゾン、アザチオプリン、メトトレキサート、TNF ブロッカーまたはアンタゴニスト、インフリキシマブ、炎症性サイトカインを標的とする生物薬剤、ヒドロキシクロロキン、スルファサラゾプリン、金塩、エタネルセプトおよびアナキンラからなる群の中から選ばれる免疫抑制剤の有効量をさらに投与する、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 3】

可溶性 C T L A 4 変異分子が、B 7 分子が T 細胞上の C T L A 4 および / または C D 2 8 と結合するのを阻害する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

可溶性 C T L A 4 変異分子が、T 細胞 / B 7 陽性細胞の相互作用を妨害する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

可溶性 C T L A 4 変異分子が、図 2 3 に示す + 1 0 4 位のロイシンが他のアミノ酸と置換している C T L A 4 の + 1 0 4 位の変異を含んでいる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

可溶性 C T L A 4 変異分子が、図 1 8 に示す + 1 位のメチオニンから始まり + 3 5 7 位のリジンまでの L 1 0 4 E I g である、請求項 5 記載の方法。

20

【請求項 7】

可溶性 C T L A 4 変異分子が、図 1 8 に示す - 1 位のアラニンから始まり + 3 5 7 位のリジンまでの L 1 0 4 E I g である、請求項 5 記載の方法。

【請求項 8】

可溶性 C T L A 4 変異分子が、図 2 3 に示す + 1 0 4 位のロイシンがグルタミン酸と置換している C T L A 4 の + 1 0 4 位における第 1 の変異、および

a . 図 2 3 に示す + 2 9 位のアラニンが他のアミノ酸と置換している C T L A 4 の + 2 9 位、

30

b . 図 2 3 に示す + 1 0 5 位のグリシンが他のアミノ酸と置換している C T L A 4 の + 1 0 5 位、

c . 図 2 3 に示す + 2 5 位のセリンが他のアミノ酸と置換している C T L A 4 の + 2 5 位、または

d . 図 2 3 に示す + 3 0 位のスレオニンが他のアミノ酸と置換している C T L A 4 の + 3 0 位、

における第 2 の変異を含んでいる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

可溶性 C T L A 4 変異分子が、

a . 図 1 9 に示す + 1 位のメチオニンから始まり + 3 5 7 位のリジンで終わる L 1 0 4 E A 2 9 Y I g 、

40

b . 図 2 0 に示す + 1 位のメチオニンから始まり + 3 5 7 位のリジンで終わる L 1 0 4 E A 2 9 L I g 、

c . 図 2 1 に示す + 1 位のメチオニンから始まり + 3 5 7 位のリジンで終わる L 1 0 4 E A 2 9 T I g 、または

d . 図 2 2 に示す + 1 位のメチオニンから始まり + 3 5 7 位のリジンで終わる L 1 0 4 E A 2 9 W I g 、である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 10】

可溶性 C T L A 4 変異分子が、

a . 図 1 9 に示す - 1 位のアラニンから始まり + 3 5 7 位のリジンで終わる L 1 0 4 E A

50

29 Y I g、

b. 図 20 に示す - 1 位のアラニンから始まり + 3 5 7 位のリジンで終わる L 1 0 4 E A 2 9 L I g、

c. 図 21 に示す - 1 位のアラニンから始まり + 3 5 7 位のリジンで終わる L 1 0 4 E A 2 9 T I g、または

d. 図 22 に示す - 1 位のアラニンから始まり + 3 5 7 位のリジンで終わる L 1 0 4 E A 2 9 W I g、である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 11】

L 1 0 4 E A 2 9 Y I g が A T C C P T A - 2 1 0 4 と命名される D N A 配列によってコードされている、請求項 9 または 10 記載の方法。

10

【請求項 12】

可溶性 C T L A 4 変異分子が、

a. 図 23 に示す + 1 0 4 位のロイシンがグルタミン酸と置換している C T L A 4 の + 1 0 4 位、

b. 図 23 に示す + 2 9 位のアラニンがチロシンと置換している C T L A 4 の + 2 9 位、および

c. 図 23 に示す + 2 5 位のセリンが他のアミノ酸と置換している C T L A 4 の + 2 5 位、における変異を含有している、請求項 1 記載の方法。

【請求項 13】

B 7 分子と結合する可溶性 C T L A 4 変異分子の有効量を対象に投与する、リウマチ疾患を処置するための方法であって、可溶性 C T L A 4 変異分子が、図 23 に示す + 1 0 4 位のロイシンがグルタミン酸と置換している C T L A 4 の + 1 0 4 位における変異および図 23 に示す + 2 9 位のアラニンがチロシンと置換している C T L A 4 の + 2 9 位における変異を含有している方法。

20

【請求項 14】

可溶性 C T L A 4 変異分子が L 1 0 4 E A 2 9 Y I g である、請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

L 1 0 4 E A 2 9 Y I g が図 19 に示す + 1 位のメチオニンから始まり + 3 5 7 位のリジンで終わる、請求項 14 記載の方法。

【請求項 16】

L 1 0 4 E A 2 9 Y I g が図 19 に示す - 1 位のアラニンから始まり + 3 5 7 位のリジンで終わる、請求項 14 記載の方法。

30

【請求項 17】

リウマチ疾患が慢性関節リウマチである、請求項 1 または 13 記載の方法。

【請求項 18】

関節腫脹、痛み、圧痛、朝のこわばり、構造的障害、血清 C 反応性タンパク質レベルの上昇、可溶性 I L - 2 r レベルの上昇、可溶性 I C A M - 1 レベルの上昇、可溶性 E - セレクチンレベルの上昇、および赤血球凝集率の上昇からなる群から選ばれるリウマチ疾患に付随する症状を緩解する方法であって、請求項 1 または 13 記載の方法によってリウマチ疾患に罹患した対象を処置する方法。

40

【請求項 19】

可溶性 C T L A 4 変異分子を局所的にまたは全身に投与する、請求項 1 または 13 記載の方法。

【請求項 20】

投与が、静脈内、筋肉内、皮下、移植可能ポンプ、連続注入、遺伝子治療、リボソームおよび経口投与からなる群から選ばれる、請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

可溶性 C T L A 4 変異分子の有効量が約 0 . 5 - 1 0 0 m g / k g 体重 (対象) である、請求項 1 または 13 記載の方法。

【請求項 22】

50

可溶性 C T L A 4 変異分子の有効量が 0 . 5 m g / k g 体重 (対象) である、請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 3】

可溶性 C T L A 4 変異分子の有効量が 2 m g / k g 体重 (対象) である、請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 4】

可溶性 C T L A 4 変異分子の有効量が 1 0 m g / k g 体重 (対象) である、請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 5】

対象が、ヒト、サル、類人類、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ウサギ、マウスおよびラットからなる群から選ばれる請求項 1 または 1 3 記載の方法。 10

【請求項 2 6】

製薬的に許容される担体および可溶性 C T L A 4 変異分子を含有する、リウマチ疾患を処置するための医薬組成物。

【請求項 2 7】

可溶性 C T L A 4 変異分子が、図 2 3 に示す + 1 0 4 位のロイシンがグルタミン酸と置換している C T L A 4 の + 1 0 4 位における変異および図 2 3 に示す + 2 9 位のアラニンがチロシンと置換している C T L A 4 の + 2 9 位における変異を含有している、請求項 2 6 記載の医薬組成物。

【請求項 2 8】

可溶性 C T L A 4 変異分子が L 1 0 4 E A 2 9 Y I g である、請求項 2 7 記載の医薬組成物。 20

【請求項 2 9】

L 1 0 4 E A 2 9 Y I g が図 1 9 に示す + 1 位のメチオニンから始まり + 3 5 7 位のリジンで終わる、請求項 2 8 記載の医薬組成物。

【請求項 3 0】

L 1 0 4 E A 2 9 Y I g が図 1 9 に示す - 1 位のアラニンから始まり + 3 5 7 位のリジンで終わる、請求項 2 8 記載の医薬組成物。

【請求項 3 1】

製薬的に許容される担体がイオン交換剤、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、ヒト血清アルブミンなどの血清アルブミン、緩衝物質、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物性脂肪酸の部分グリセリド混合物、リン酸緩衝化食塩水、水、乳液、塩類または電解液、コロイド状シリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロース基本物質、ポリエチレングリコール、滅菌水、錠剤、賦形剤、スクロース、グルコース、マルトース、香料および色素添加物、脂質組成物、および高分子化合物からなる群から選ばれる請求項 2 6 記載の医薬組成物。 30

【請求項 3 2】

リウマチ疾患に関連する病態生理学的変化を減少させる方法であって、請求項 1 または 1 3 記載の方法によってリウマチ疾患に罹患した対象を処置する方法。

【請求項 3 3】

リウマチ疾患に関連する病態生理学的変化が構造的障害の減少である、請求項 3 2 記載の方法。 40

【請求項 3 4】

B 7 分子と結合する可溶性 C T L A 4 変異分子の有効量を含有する、慢性関節リウマチを処置するためのキット。

【請求項 3 5】

可溶性 C T L A 4 変異分子が、図 2 3 に示す + 1 0 4 位のロイシンがグルタミン酸と置換している C T L A 4 の + 1 0 4 位における変異および図 2 3 に示す + 2 9 位のアラニンがチロシンと置換している C T L A 4 の + 2 9 位における変異を含有している、請求項 3 4 記載のキット。 50

【請求項 36】

可溶性 C T L A 4 変異分子が L 1 0 4 E A 2 9 Y I g である、請求項 35 記載のキット。

【請求項 37】

L 1 0 4 E A 2 9 Y I g が図 19 に示す + 1 位のメチオニンから始まり + 3 5 7 位のリジンで終わる、請求項 36 記載のキット。

【請求項 38】

L 1 0 4 E A 2 9 Y I g が図 19 に示す - 1 位のアラニンから始まり + 3 5 7 位のリジンで終わる、請求項 36 記載のキット。

【請求項 39】

コルチコステロイド、非ステロイド抗炎症剤、シクロスポリン、プレドニゾン、アザチオプリン、メトトレキサート、T N F ブロッカーまたはアンタゴニスト、インフリキシマブ、炎症性サイトカインを標的とする生物薬剤、ヒドロキシクロロキン、スルファサラゾプリン、金塩、エタネルセプトおよびアナキンラの中から選ばれる免疫抑制剤の有効量をさらに含む、請求項 34 記載のキット。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

明細書全体にわたり、種々の文献を引用している。これらの文献の開示事項はすべて、発明の属する分野の従来技術をより十分に説明するものとして、引用によって本明細書に含まれる。

【0002】

20

【技術分野】

本発明は一般に、リウマチ疾患の分野に属す。詳細には、本発明は、可溶性 C T L A 4 変異分子の有効量を対象に投与することによる、慢性関節リウマチなどのリウマチ疾患を処置するための方法および組成物に関する。

【0003】

【背景技術】

現在のところ、リウマチ疾患を治癒させることはできない。よって、その症状を処置するための治療剤が使用されている。そして、そのような治療剤の投与は長期に及び、治療効果は有害な副作用によって減じられることが多いのが通常である。

【0004】

30

リウマチ疾患は身体の筋骨格や結合組織に影響を与える一群の疾患を包含する。これらの疾患は、永久的な組織障害、変形、萎縮および能力障害を導くことが多い慢性の炎症を特徴とする。リウマチ疾患は関節、骨、軟部組織または脊髄を侵し (Mathies, M. 1983)、そして炎症性リウマチ、変性リウマチ、関節外リウマチまたはコラーゲン疾患に分類される。リウマチ疾患のなかには、対象の免疫応答の改変に起因する自己免疫疾患であるとして知られているものがある。

【0005】

慢性関節リウマチは進行性リウマチ疾患であり、先進国の約 2% の成人が罹患している (Utsinger, P. D., et al., 1985 Rheumatoid Arthritis, p. 140)。この疾患は、軟骨の破壊および骨侵食の原因となる持続的な炎症性滑膜炎を特徴としており、末梢関節の構造的変形を導く。慢性関節リウマチに付随する症状には、関節腫脹、関節圧痛、炎症、朝のこわばり、および特に屈曲の際の痛みがある。進行した段階にある関節炎を有する対象は、骨侵食を伴う関節破壊などの構造的障害に見舞われる (Principals of Internal Medicine, Harrison, 13th 版, 1648 - 1655 頁)。さらに、患者は、自己免疫反応に関連する血管炎に由来する皮膚、腎、心臓、肺、中枢神経系および眼の損傷など、他の種々の器官損傷の臨床的症状を示す場合がある。

40

【0006】

慢性関節リウマチに関連する他の症状には、赤血球凝集率の上昇や、血清 C 反応性タンパク質 (CRP) および / または可溶性 I L - 2 受容体 (I L - 2 r) のレベル上昇がある

50

。この赤血球凝集率は活動的慢性関節リウマチの患者では殆どすべてにおいて上昇する。血清C反応性タンパク質のレベルも上昇し、疾患活動度や進行性関節障害の可能性と相関している。さらに、活性化T細胞産物である可溶性IL-2受容体のレベルは活動的慢性関節リウマチの患者の血清および滑液中において増大している(Principals of Internal Medicine, Harrison, 13th版, 1650頁参照)。

【0007】

慢性関節リウマチは、T細胞および抗原提示細胞間における抗原非特異的な細胞間相互作用が絡むT細胞介在性自己免疫疾患と考えられている。一般に、T細胞応答の強度は、T細胞表面分子とそのリガンドとの相互作用によって引き起こされる共刺激応答に基づき決定される(Mueller, et al., 1989 Am. Rev. Immunol. 7: 445-480)。重要な共刺激シグナルは、T細胞表面受容体であるCD28およびCTLA-4とそれらのリガンド、例えば抗原提示細胞上のB7関連分子CD80(即ちB7-1)およびCD86(即ちB7-2)との相互作用によってもたらされる(Linsley, P.およびLedbetter, J. 1993 Ann. Rev. Immunol. 11: 191-212)。

10

【0008】

共刺激の無いT細胞活性化は、免疫系が刺激に対して非感応性となるアネルギー性T細胞応答を導く(Schwartz, R.H., 1992 Cell 71: 1065-1068)。

20

慢性関節リウマチはT細胞性免疫系疾患と考えられるので、それを処置するための新たな薬剤を開発する1つの戦略は内生CD28またはCTLA4とB7との間の相互作用を遮断することにより、Tリンパ球および抗原提示細胞間の共刺激シグナルを遮断する分子を同定することである。可能性ある分子には、野生型CTLA4(その配列は図23に示している)またはCD28よりも高い結合力でB7と結合するよう修飾した可溶性CTLA4分子などである。

【0009】

CD28およびCTLA4の可溶型は、CD28やCTLA4の可変(V)様細胞外ドメインを免疫グロブリン(Ig)定常ドメインと融合させ、CD28IgおよびCTLA4Igとすることにより構築されている。CTLA4Igのヌクレオチドおよびアミノ酸配列を図24に示し、ここではこのタンパク質は+1位のメチオニンまたは-1位のアラニンから始まり、+357位のリジンで終わっている。CTLA4IgはCD28Igよりも強くCD80陽性およびCD86陽性の両細胞と結合する(Linsley, P. et al., 1994 Immunity 1: 793-80)。多くのT細胞依存性免疫応答がインビトロおよびインビボの両方においてCTLA4Igによって遮断されることが見出されている(Linsley, P. et al. 1991b, 前掲、Linsley, P. et al., 1992a Science 257: 792-795; Linsley, P. 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)。

30

40

【0010】

B7などの天然のリガンドとの結合親和性を改変するため、可溶性CTLA4Ig融合分子は、その分子のCTLA4部分内のアミノ酸を変異して修飾されている。B7リガンドとの結合親和性または結合力を改変するために変異されるCTLA4の領域は、相補性決定領域1(米国特許6,090,914、5,773,253、5,844,095;同時継続の米国特許出願番号60/214,065;およびPeach et al. 1994 J. Exp. Med., 180: 2049-2058においてCDR-1と称されている)および相補性決定領域3(CDR-3)様領域などである(CDR-3は米国特許

50

6, 090, 914、5, 773, 253、5, 844, 095；同時継続の米国特許出願番号60/214, 065：およびPeach et al. 1994 J. Exp. Med., 180:2049-2058に記載されているCTLA4細胞外ドメインの保存領域である。CDR-3様領域はCDR-3領域を包含し、CDR-3モチーフの上流および/または下流までアミノ酸数個が延びている。) CDR-3様領域はすべてのCD28およびCTLA4ファミリーに高度に保存されているヘキサペプチドMYPPPYを含む。CTLA4のヘキサペプチドを介しおよびCD28 Ig内の選択した残基におけるアラニン走査突然変異により、CD80に対する結合性が減少または消滅されている(Peach et al. J. Exp. Med., 1994 180:2049-2058)

10

【0011】

CTLA4およびCD28の相同領域を交換することによりさらに修飾を施し、CTLA4 Ig分子が可溶化された。これらキメラCTLA4/CD28相同変異分子には、CTLA4およびCD28に共通するMYPPPYヘテロペプチドモチーフ、およびCTLA4とCD80との結合力の増大に寄与する領域としてのCTLA4のCDR-1およびCDR-3様領域における特定の非保存アミノ酸残基が同定された(Peach et al. J. Exp. Med., 1994 180:2049-2058)。

【0012】

CTLA4 Ig、上記のCTLA4変異分子またはキメラCTLA4/CD28相同変異体などの可溶性CTLA4分子は、リウマチ疾患を処置するための新たな一群を提供する

20

【0013】

慢性関節リウマチなどのリウマチ疾患に対する現在の処置は、メトトレキサート、シクロホスファミド、アザチオプリン、シクロスポリンA、および腫瘍壊死因子-(TNF)ブロッカーまたはアンタゴニストなどの非特異的細胞毒性免疫抑制剤を投与することを含む。これらの免疫抑制剤は対象の免疫系全体を抑制し、その長期使用は感染症の危険を増大させる。さらに、これらの薬剤は慢性関節リウマチの進行を遅らせるに過ぎず、治療を中断した後は加速度的に再発する。さらに、これら非特異的薬剤による長期療法は、特定の悪性度、腎不全、骨髄抑制、肺繊維症、悪性疾患、糖尿病および肝機能疾患の発達に対する傾向など、毒性の副作用を生じさせる。これらの薬剤はさらに、およそ2-5年後には有効性が徐々に消失する(Kelley's Textbook of Rheumatology, 6th版, 1001-1022頁)。

30

【0014】

また、非特異的な免疫抑制性の治療剤および抗炎症剤が症状の緩解のために使用されている。これらの薬剤は用量依存的であり、疾患の進行を予防するものでない。このような薬剤にはプレドニゾンおよびメチルプレドニゾンなどのステロイド化合物が含まれる。ステロイド類はその長期使用に付随する有意に毒性の副作用も有する(Kelley's Textbook of Rheumatology, 6th版, 829-833頁)。

【0015】

従って、慢性関節リウマチのための現在の処置はその効能が限られており、有意な毒性副作用を示し、長期に連続して使用できないものである。

40

このように、慢性関節リウマチなどのリウマチ疾患を処置するために有効かつより強力な、従来の方法や薬剤の不都合な点を回避している、自己免疫の病態生理学的メカニズムを標的とした処置が求められている。

【0016】

【発明の概要】

本発明は、B7陽性細胞上のB7分子に結合する可溶性CTLA4分子を対象に投与することにより、内生B7分子がT細胞上のCTLA4および/またはCD28と結合するのを阻害する、免疫系疾患を処置するための組成物および方法を提供する。本発明の方法にて使用される可溶性CTLA4分子にはCTLA4 Igおよび可溶性CTLA4変異分子

50

L 1 0 4 E A 2 9 Y I g が含まれる。

【 0 0 1 7 】

本発明はまた、ヒトにおいて B 7 陽性細胞を可溶性 C T L A 4 と接触させることにより、ヒトにおける T 細胞機能を阻害するが、T 細胞を枯渇（減少）させない方法を提供する。可溶性 C T L A 4 の例としては、C T L A 4 I g および可溶性 C T L A 4 変異分子、例えば L 1 0 4 E A 2 9 Y I g が含まれる。

【 0 0 1 8 】

本発明はまた、慢性関節リウマチと診断された対象に C T L A 4 I g および / または可溶性 C T L A 4 変異分子 L 1 0 4 E A 2 9 Y I g などの可溶性 C T L A 4 分子を投与する、慢性関節リウマチなどのリウマチ疾患を処置する（例えば、症状を減少させる）ための方法をも提供する。例えば、図 1 9 に示す + 1 位のメチオニンまたは - 1 位のアラニンから始まり + 3 5 7 位のリジンまでの C T L A 4 変異分子 L 1 0 4 E A 2 9 Y I g が本発明の方法に使用するのに好ましい。

10

【 0 0 1 9 】

本発明はまた、慢性関節リウマチと診断された対象に可溶性 C T L A 4 分子を投与する、構造的障害などの、リウマチ疾患に付随する病態生理学的変化を減少させるための方法をも提供する。

【 0 0 2 0 】

本発明はまた、製薬的に許容される担体および可溶性 C T L A 4 分子などの生物的に有効な物質を含有する、慢性関節リウマチなどの免疫系疾患を処置するための医薬組成物をも提供する。

20

【 0 0 2 1 】

免疫系疾患を治療するための医薬組成物を含むキットも本発明に含まれる。1つの態様では、1つまたはそれ以上の本発明の医薬組成物を含むキットを、免疫系疾患、例えば慢性関節リウマチの処置に使用する。例えば、医薬組成物は、B 7 陽性細胞上の B 7 分子に結合する可溶性 C T L A 4 変異分子の有効量を含むことにより、B 7 分子が T 細胞上の C T L A 4 および / または C D 2 8 と結合するのを阻害する。さらに、本発明のキットは、本発明の医薬組成物と一緒に使用される 1 つまたはそれ以上の免疫抑制剤を含むことができる。可能性ある免疫抑制剤には、コルチコステロイド、非ステロイド抗炎症剤（例えば、C o x 2 阻害剤）、シクロスポリン、プレドニゾン、アザチオプリン、メトトレキサート、T N F ブロッカーまたはアンタゴニスト、インフリキシマブ、炎症性サイトカインを標的とする生物薬剤、ヒドロキシクロロキン、スルファサラゾプリン、金塩、エタネルセプトおよびアナキンラがあるが、これらに限定されない。

30

【 0 0 2 2 】

本発明はさらに、慢性関節リウマチに付随する赤血球凝集率を減少させる方法をも提供する。

さらに、本発明は慢性関節リウマチに付随する血清の特定成分、例えば血清 C 反応性タンパク質、可溶性 I C A M - 1、可溶性 E - セレクチンおよび / または可溶性 I L - 2 r のレベルを減少させる方法をも提供する。

【 0 0 2 3 】

【 発明の詳しい説明 】

定義

本明細書に使用しているすべての科学および技術用語は、特に明記しない限り当技術分野にて普通に使用されている意義を有している。本明細書では、以下の用語またはフレーズはここに明記する意味を有する。

【 0 0 2 4 】

本明細書に使用する「リガンド」は、自身以外の分子を特異的に認識し結合する分子であり、例えば C T L A 4 に対するリガンドは B 7 分子である。

【 0 0 2 5 】

本明細書に使用する「野生型 C T L A 4 」または「非変異 C T L A 4 」は、図 2 3 に示す

40

(また米国特許 5,434,131、5,844,095、5,851,795 にも記載されている)天然に存在する全長 CTLA4、または B7 を認識し結合するか B7 を妨害し CD28 および / または CTLA4 (例えば、内生 CD28 および / または CTLA4) との結合を遮断するその一部または誘導体、のアミノ酸配列を有している。具体的態様では、野生型 CTLA4 の細胞外ドメインは +1 位のメチオニンから始まり、+124 位のアスパラギン酸で終わるか、または野生型 CTLA4 の細胞外ドメインは -1 位のアラニンから始まり、+124 位のアスパラギン酸で終わる。野生型 CTLA4 は、N 末端細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび C 末端細胞質ドメインを有する細胞表面タンパク質である。細胞外ドメインは B7 分子などの標的分子と結合する。細胞では、天然に存在する野生型 CTLA4 タンパク質は、シグナルペプチドを N 末端に含む未成熟ポリヌクレオチドとして翻訳される。未成熟ポリヌクレオチドは、シグナルペプチドの切断と除去を含む翻訳後プロセッシングを受け、未成熟型の N 末端とは異なる新たに生成される N 末端を含む CTLA4 切断産物が生成する。当業者であれば、新たに生成される CTLA4 切断産物の N 末端から 1 つまたはそれ以上のアミノ酸を除去する付加的な翻訳後プロセッシングが起こり得ることは理解されよう。あるいは、シグナルペプチドは完全には除去されず、通常の開始アミノ酸メチオニンよりも前から始まる分子が生成される場合もある。従って、成熟 CTLA4 タンパク質は +1 位のメチオニンまたは -1 位のアラニンから開始することができる。CTLA4 分子の成熟型には B7 と結合する細胞外ドメインまたはその一部が含まれる。

10

【0026】

本明細書に使用する「CTLA4 変異分子」は、1 つの変異または複数の変異を (好ましくは野生型 CTLA4 の細胞外ドメイン内に) 有する図 23 に示す野生型 CTLA4 またはその一部もしくは誘導体を意味する。CTLA4 変異分子は野生型 CTLA4 の配列と類似しているが同一でなく、しかし依然 B7 とは結合する配列を有している。変異には、保存的な構造または化学的性質 (例えばロイシンのイソロイシンとの置換) または非保存的な構造または化学的性質 (例えばグリシンのトリプトファンとの置換) を持つアミノ酸との 1 つまたはそれ以上のアミノ酸残基の置換、アミノ酸欠失、付加、フレームシフト、または断頭が含まれる。CTLA4 変異分子はその内部に CTLA4 でない分子を含むことができ、またはそれを結合することができる。さらなる CTLA4 変異分子には、米国特許出願番号 09/865,321、60/214,065 および 60/287,576、および米国特許第 6,090,914 号、第 5,844,095 号および第 5,773,251 号、並びに Peach, R. J., et al. in J Exp Med 180:2049-2058 (1994) に記載されているものが含まれる。CTLA4 変異分子は合成法または組換え法で調製することができる。

20

30

【0027】

本明細書に使用する「CTLA4 Ig」は、Ig テールが結合している野生型 CTLA4、または B7 を結合するその一部を含む可溶性融合タンパク質である。具体的な態様は、+1 位のメチオニンから始まって +124 位のアスパラギン酸で終わるかまたは -1 位のアラニンから始まって +124 位のアスパラギン酸で終わる野生型 CTLA4 の細胞外ドメイン (図 23 に示す)、+125 位の接合部アミノ酸残基グルタミン、および +126 位のグルタミン酸から +357 位のリジンまでを包含する免疫グロブリン部分を含む (CTLA4 Ig をコードする DNA はバージニア州 20110-2209 マナッサス・ユニバーシティバード 10801 の American Type Culture Collection (ATCC) に 1991 年 5 月 31 日、ブタペスト条約の下に寄託され、受託番号 ATCC 68629 が ATCC から付与されている; Linsley, P., et al., 1994 Immunity 1:793-80)。CTLA4 Ig を発現するチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞株、CTLA4 Ig-24 は 1991 年 5 月 31 日に ATCC 同定番号 CRL-10762 として寄託されている)。本発明の方法および / またはキットに使用される可溶性 CTLA4 Ig 分子はシグナル (リーダー) ペプチド配列を含んでも含まなくてもよい。本発明の方法および / またはキットでは、典

40

50

型的にはこの分子はシグナルペプチド配列を含まない。

【0028】

「L104EA29YIg」は、アミノ酸変化A29Y（29位のアラニンがチロシンアミノ酸残基と置換）およびL104E（+104位のロイシンがグルタミン酸アミノ酸残基と置換）を有する野生型CTLA4の細胞外ドメイン、またはB7分子と結合するその一部がIgテールと結合しているものを含む可溶性CTLA4変異分子である融合タンパク質である（図19に含まれる；L104EA29YIgをコードするDNAは2000年6月19日にATCC番号PTA-2104として寄託されている；米国特許出願番号09/579,927、60/287,576および60/214,065に継続中（これらは引用により本明細書に包含される））。本発明の方法および/またはキットに使用される可溶性L104EA29YIg分子はシグナル（リーダー）ペプチド配列を含んでも含まなくてもよい。本発明の方法および/またはキットでは、典型的にはこの分子はシグナルペプチド配列を含まない。

10

【0029】

本明細書に使用する「可溶性」とは細胞に結合または接合していない、即ち循環しているあらゆる分子、またはその断片もしくは誘導体を意味する。例えば、CTLA4、B7またはCD28はそれぞれCTLA4、B7またはCD28の細胞外ドメインに免疫グロブリン（Ig）部分を結合することにより可溶性にすることができる。または、CTLA4などの分子は、その膜貫通ドメインを除去することによって可溶性にすることができる。典型的には、本発明の方法に使用する可溶性分子はシグナル（リーダー）配列を含まない。

20

【0030】

本明細書に使用する「可溶性CTLA4分子」は、細胞表面に結合していない（即ち、循環している）CTLA4分子またはB7に結合するCTLA4分子の機能的部分を意味し、例えば、CTLA4の細胞外ドメインが免疫グロブリン（Ig）部分と融合しその融合分子が可溶性になっているCTLA4Ig融合タンパク質（例えばATCC68629）またはその断片および誘導体；生物学的に活性なまたは化学的に活性なタンパク質と融合または結合しているCTLA4の細胞外ドメインを有するタンパク質、例えばパピローマウイルスE7遺伝子産物とのもの（CTLA4-E7）、メラノーマ関連抗原p97とのもの（CTLA4-p97）またはHIVenvタンパク質とのもの（CTLA4-envgp120）またはその断片および誘導体；CD28/CTLA4Igなどの雑種（キメラ）融合タンパク質またはその断片および誘導体；膜貫通ドメインが除去されて可溶性にされているCTLA4分子（Oaks, M. K., et al., 2000 Cellulular Immunology 201:144-153）またはその断片および誘導体などがあるが、これらに限定されない。「可溶性CTLA4分子」はさらに、CTLA4結合活性を有する可溶性CTLA4変異分子、およびその断片、一部または誘導体を包含する。本発明の方法に使用される可溶性CTLA4分子はシグナル（リーダー）ペプチド配列を含んでも含まなくてもよい。本発明の方法では、典型的にはこの分子はシグナルペプチド配列を含まない。

30

【0031】

本明細書に使用する「CTLA4の細胞外ドメイン」は、B7分子などのCTLA4リガンドを認識し結合するCTLA4の一部である。例えば、CTLA4の細胞外ドメインは+1位のメチオニンから+124位のアスパラギン酸までを含む（図23）。あるいは、CTLA4のある細胞外ドメインは、-1位のアラニンから+124位のアスパラギン酸までを含む（図23）。細胞外ドメインにはB7分子を結合するCTLA4の断片または誘導体が包含される。図23に示すCTLA4の細胞外ドメインは、B7分子とのCTLA4分子の結合力を変化させる変異を含むことができる。

40

【0032】

本明細書に使用する「変異」とは、野生型分子のヌクレオチドまたはアミノ酸配列中の変化を意味し、例えば野生型CTLA4細胞外ドメイン中のDNAおよび/またはアミノ酸

50

配列の変化である。DNAの変異は、コドンを変化させてアミノ酸配列の変化を導くことができる。DNA変化は置換、欠失、挿入、代替スプライシング、または断頭であり得る。アミノ酸変化は、置換、欠失、挿入、付加、断頭、またはタンパク質のプロセッシングもしくは切断エラーであり得る。あるいは、当技術分野ではよく知られているように、ヌクレオチド配列の変異はアミノ酸配列のサイレント変異をもたらす場合がある。これに関連し、特定のヌクレオチドコドンは同じアミノ酸をコードする。例えばアミノ酸アルギニン(R)をコードするヌクレオチドコドンCGU、CGG、CGCおよびCGA、またはアミノ酸のアスパラギン酸(D)をコードするコドンGAUおよびGACが、その例である。従って、タンパク質は、ヌクレオチド配列の詳細は異なっているがそれでもなお同じ配列を持つタンパク質分子をコードする1つまたはそれ以上の核酸分子によってコードされ得る。アミノ酸のコード配列は以下の通りである。

10

【0033】

【表1】

アミノ酸	記号	1文字記号	コドン
アラニン	Ala	A	GCU, GCC, GCA, GCG
システイン	Cys	C	UGU, UGC
アスパラギン酸	Asp	D	GAU, GAC
グルタミン酸	Glu	E	GAA, GAG
フェニルアラニン	Phe	F	UUU, UUC
グリシン	Gly	G	GGU, GGC, GGA, GGG
ヒスチジン	His	H	CAU, CAC
イソロイシン	Ile	I	AUU, AUC, AUA
リジン	Lys	K	AAA, AAG
ロイシン	Leu	L	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG
メチオニン	Met	M	AUG
アスパラギン	Asn	N	AAU, AAC
プロリン	Pro	P	CCU, CCC, CCA, CCG
グルタミン	Gln	Q	CAA, CAG
アルギニン	Arg	R	CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
セリン	Ser	S	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
スレオニン	Thr	T	ACU, ACC, ACA, ACG
バリン	Val	V	GUU, GUC, GUA, GUG
トリプトファン	Trp	W	UGG
チロシン	Tyr	Y	UAU, UAC

20

30

40

変異分子は1つまたはそれ以上の変異を含むことができる。

50

【0034】

本明細書に使用する「非CTLA4タンパク質配列」または「非CTLA4分子」は、B7を結合せず、CTLA4がその標的に結合するのを妨害しない任意のタンパク質分子を意味する。一例として免疫グロブリン(Ig)定常領域またはその一部が挙げられるが、これらに限定されない。Ig定常領域は、好ましくは、ヒトまたはサルIg定常領域、例えばヒンジ、CH2およびCH3領域を含むヒトC(ガンマ)1である。Ig定常領域は、変異によってそのエフェクター機能を低下させることができる(米国特許第5,637,481号、第5,844,095号および第5,434,131号)。

【0035】

本明細書に使用する「断片」または「一部」はCTLA4分子の部分またはセグメントであり、好ましくはその標的、即ちB7分子を認識し結合するCTLA4の細胞外ドメインまたはその部分もしくはセグメントである。

【0036】

本明細書に使用する「B7」とは、B7ファミリー分子を意味し、例えば、CTLA4および/またはCD28を認識し結合できるB7-1(CD80)、B7-2(CD86)およびB7-3があるが、これらに限定されない。

本明細書に使用する「B7陽性細胞」はその細胞表面に1つまたはそれ以上の型のB7分子を発現している細胞である。

【0037】

本明細書に使用する「誘導体」は、その親分子の配列相同性と活性を保持している分子である。例えば、CTLA4の誘導体には、野生型CTLA4の細胞外ドメインと少なくとも70%のアミノ酸配列類似性を持ち、B7を認識し結合する可溶性CTLA4分子、例えばCTLA4Igまたは可溶性CTLA4変異分子L104EA29YIgが含まれる。

【0038】

本明細書に使用する、受容体、シグナルまたは分子を「遮断」または「阻害」とは、当業界にて認識されている試験によって検出されるような、受容体、シグナルまたは分子の活性化を妨害することを意味する。例えば、細胞性免疫応答の遮断は、リウマチ疾患に関連する症状の減少を測定することにより検出できる。遮断または阻害は部分的であっても全体であってもよい。

【0039】

本明細書に使用する「B7相互作用を遮断する」とは、B7のCD28および/またはCTLA4などのそのリガンドに対する結合を妨害することにより、T細胞およびB7陽性細胞の相互作用をブロック(遮断)することを意味する。B7相互作用を遮断する物質の例としては、CTLA4、CD28またはB7分子(例えばB7-1、B7-2)を認識し結合する抗体(またはその一部もしくは誘導体)などの分子;可溶性CTLA4などの分子の可溶型(またはその一部もしくは誘導体);CTLA4/CD28/B7介在性相互作用を解する細胞シグナルを妨害するよう設計されたペプチド断片または他の小分子があるが、これらに限定されない。好ましい態様では、遮断物質は、CTLA4Ig(ATCC68629)またはL104EA29YIg(ATCCPTA-2104)などの可溶性CTLA4分子、CD28Ig(ATCC68628)などの可溶性CD28分子、B7Ig(ATCC68627)などの可溶性B7分子、抗-B7モノクローナル抗体(例えば、ATCC HB-253、ATCC CRL-2223、ATCC CRL-2226、ATCC HB-301、ATCC HB-11341、および米国特許第6,113,898号にてAnderson et al.が、またはYokochi et al., 1982. J. Immun., 128(2)823-827にて開示しているモノクローナル抗体、抗-CTLA4モノクローナル抗体(例えば、ATCC HB-304、および引用文献82-83が開示しているモノクローナル抗体)および/または抗-CD28モノクローナル抗体(例えば、ATCC HB11944およびHansen(Hansen et al., 1980. Immunogenetics 10:247

10

20

30

40

50

- 260) または Martin (Martin et al., 1984. J. Clin. Immun., 4(1): 18-22) が記載している mAb 9.3) がある。

【0040】

本明細書に使用する「免疫系疾患」とは B 陽性細胞との T 細胞相互作用によって媒介される疾患を意味し、これには自己免疫疾患、移植片関連障害および免疫増生性疾患が含まれるが、これらに限定されない。免疫系疾患の例としては、移植片対宿主疾患 (GVHD) (例えば骨髄移植によって起こるもの、または寛容誘導をもたらすもの); 移植拒絶、慢性拒絶および組織または細胞 (例えば固形臓器、皮膚、島、筋、肝細胞、ニューロンなど) の同種移植もしくは異種移植に関係する免疫障害がある。免疫増生性疾患の例には、乾癬、T 細胞リンパ腫、T 細胞急性リンパ芽球性白血病、精巣血管中心性 T 細胞リンパ腫、10
 良性リンパ球性血管炎、狼蒼 (例: 狼蒼エリテマトーデス、ループス腎炎)、橋本甲状腺腫、原発性粘液水腫、グレーヴス病、悪性貧血、自己免疫性萎縮性胃炎、アジソン病、糖尿病 (例: インシュリン依存性糖尿病、I 型糖尿病、II 型糖尿病)、グッドパスチャー症候群、筋無力症、天疱瘡、クローン病、交感性眼炎、自己免疫性ブドウ膜炎、多発性硬化症、自己免疫性溶血性貧血、特発性血小板減少症、原発性胆汁性肝硬変、慢性活動性肝炎、潰瘍性大腸炎、シェーグレン症候群、リウマチ疾患 (例: 慢性関節リウマチ)、多発性筋炎、強皮症、および混合結合組織病などがあるが、これらに限定されない。

【0041】

本明細書に使用する「リウマチ疾患」は関節、骨、軟部組織または脊髄を侵す疾患を意味し (Mathies, M., 1983)、炎症性リウマチ、変性リウマチ、関節外リウマチおよびコラーゲン疾患を含む。さらに、リウマチ疾患には、慢性多発性関節炎、乾癬関節障害、強直性脊椎炎、慢性関節リウマチ、結節性動脈周囲炎、全身性エリテマトーデス、汎発性強皮症、関節周囲炎、上腕肩甲炎、ウラチカ関節炎 (arthritis urtica)、軟骨石灰化、皮膚筋炎、筋肉リウマチ、筋肉炎、および筋原症 (myogelosis) が挙げられるが、これらに限定されない。リウマチ疾患の中には、対象の免疫応答の改変に起因する自己免疫疾患であることが知られているものがある。20

【0042】

本明細書に使用する「遺伝子治療」は、核酸配列を細胞に移入し、その核酸によってコードされている遺伝子産物を細胞に発現させる遺伝子操作、により疾患を処置する方法を意味する。例えば、当業者に周知のように、核酸移入は、例えばリン酸カルシウム沈降法、30
 ジエチルアミノエチルデキストラン、ポリエチレングリコール (PEG)、エレクトロポレーション、直接注入、リポフェクション、またはウイルス注入など種々の手法により、目的の核酸を含む発現ベクターを細胞に *ex vivo* または *in vivo* にて挿入することによって行うことができる (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989); Kriegler M. Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (W.H. Freeman and Co, New York, 1993) および Mu, Methods in Enzymology (Academic Press, New York, 1993) これらは引用により本明細書に包含される)。あるいは、40
 目的の核酸配列は、例えば核酸を対象に直接投与する (Williams et al., 1991 PNAS 88: 2726-2730)、または核酸をウイルスベクターに挿入しそのウイルスを対象に感染させる (Battleman et al. 1993 J Neurosci 13: 94-951; Carroll et al. 1993 J Cell Biochem 17E: 241; Lebkowski et al. 米国特許第 5, 354, 678 号; Davison and Elliott, Molecular Virology: A Practical Approach (IRL Press, New York, 1993)) などの種々の方法によって種々のベクターにてインビボにおいて細胞に移入させることができる。インビボ移入のための他の方法には、核酸をリポソームに包囊させること、および対象に対してリポソームを直接移入することまたは血球 50

凝集性センダイウイルスと組合わせたリポソームを移入させることがある（米国特許第5,824,655号、引用によって本明細書に包含される）。トランスフェクトまたは感染細胞は、疾患または疾患の症状を改善するため、核酸にコードされるタンパク質産物を発現する。

【0043】

本明細書に記載の発明をさらに詳しく理解することができるように、以下に説明を行う。

本発明の組成物および方法

本発明は、B7を結合するリガンド、例えば可溶性CTLA4分子（例えばCTLA4 Igおよび/またはL104EA29YIg）およびB7を認識し結合するモノクローナル抗体（mAb）の有効量を対象に投与することによる、リウマチ疾患などの免疫系疾患を処置するための方法および組成物に関する。有効量は、B7陽性細胞上のB7分子と結合した場合にB7分子がCTLA4およびCD28などの内生リガンドを結合するのを阻害する可溶性CTLA4分子の量として規定される。

10

【0044】

好ましい態様では、免疫疾患はリウマチ疾患である。リウマチ疾患は次の特徴とする疾患である：(i)身体筋-骨または結合組織構造、特に関節や、筋肉、腱、軟骨、滑膜および線維性組織の炎症または変性、(ii)関節腫脹、関節圧痛、炎症、朝のこわばり、および/または痛み、または歩行運動の障害やこれら組織の機能障害を伴うこと、およびある場合には、リウマチ因子および他の炎症性の代替マーカーの血清学的証拠を伴うことがある。

20

【0045】

リウマチ疾患には慢性関節リウマチが含まれるが、これに限定されない。慢性関節リウマチの症状には関節腫脹、関節圧痛、炎症、朝のこわばり、および身体障害を導く痛みがある。関節炎が進行した対象は、構造的障害や消耗性の痛みを伴う。他の器官も自己免疫機構により障害を受けることがある。

【0046】

組成物

本発明は、可溶性CTLA4分子を含む、慢性関節リウマチなどの免疫疾患を処置するための組成物を提供する。さらに、本発明は、ヒトのB7陽性細胞を可溶性CTLA4と接触させることによる、ヒトにおけるT細胞機能を阻害するがT細胞を枯渇（減少）させない生物薬剤を含む組成物を提供する。可溶性CTLA4の例には、CTLA4 Igおよび可溶性CTLA4変異分子、例えばL104EA29YIgがある。

30

【0047】

変異型または野生型配列を有するCTLA4分子はCTLA4膜貫通セグメントを除去することにより可溶化することができる（Oaks, M. K., et al., 2000 Cellular Immunology 201: 144-153）。

【0048】

また、変異型または野生型配列を有する可溶性CTLA4分子は、CTLA4分子が非CTLA4分子部分、例えばCTLA4分子を可溶化する免疫グロブリン（Ig）分子と融合している融合タンパク質であることができる。例えば、CTLA4融合タンパク質には、CTLA4の細胞外ドメインが免疫グロブリン定常ドメインと融合した、CTLA4 Ig分子（図24）が含まれる（Linsley, P. et al., 1994 Immunity 1: 793-80）。

40

【0049】

臨床プロトコールには、免疫グロブリン領域は有害な免疫応答を対象において惹起させないのが好ましい。好ましい部分は、ヒトまたはサル免疫グロブリン定常領域などの免疫グロブリン定常領域である。適当な免疫グロブリン領域の一例は、Fc受容体などのエフェクター機能を媒介でき、補体依存性細胞毒性（CDC）を媒介でき、または抗体依存性細胞依存性細胞毒性（ADCC）を媒介できるヒンジ、CH2およびCH3領域を含むヒトC（ガンマ）1である。免疫グロブリン部分は1つまたはそれ以上の変異を含むことがで

50

き（例えば、CH₂ドメインなら、CDCまたはADCCなどのエフェクター機能が低下）、Fc受容体に対する免疫グロブリンの結合能力を増大または低下させることによりその変異によりリガンドに対する免疫グロブリンの結合能力が調整される。例えば、免疫グロブリンの変異には、ヒンジドメイン内のシステイン残基のいくつかまたはそのすべての変化、例えば+130、+136および+139位のシステインにおけるセリンとの置換（図24）が含まれる。免疫グロブリン分子は図24に示すように、さらに+148位のプロリンにおけるセリンとの置換も含むことができる。また、免疫グロブリン部分の変異には+144位のロイシンのフェニルアラニンとの置換、+145位のロイシンのグルタミン酸との置換、または+147位のグリシンのアラニンとの置換をも含むことができる。

10

【0050】

可溶性CTLA4分子または可溶性CTLA4変異分子に使用される非CTLA4部分のさらなるものには、p97分子、envgp120分子、E7分子、およびova分子（Dash, B et al., 1994 J. Gen. Virol. 75 (Pt 6): 1389-97; Ikeda, T., et al. 1994 Gene 138 (1-2): 193-6; Falk, K., et al., 1993 Cell. Immunol. 150 (2): 447-52; Fujisaka, K. et al., 1994 Virology 204 (2): 789-93）。他の分子も可能性がある（Gerard, C. et al. 1994 Neuroscience 62 (3): 721; Byrn, R. et al., 1989 63 (10): 4370; Smith, D. et al., 1987 Science 238: 1704; Lasky, L. 1996 Science 233: 209）。

20

【0051】

本発明の可溶性CTLA4分子はその分子のCTLA4部分の細胞外ドメインのN末端と連結したシグナルペプチド配列を含むことができる。シグナルペプチドは、オンコスタチンM（Malik et al., (1989) Molec. Cell. Biol. 9: 2847-2853）またはCD5（Jones, N.H. et al., (1989) Nature 323: 346-349）由来のシグナルペプチドまたはあらゆる細胞外タンパク質由来のシグナルペプチドなど、分子を分泌させるあらゆる配列であることができる。

30

【0052】

本発明の可溶性CTLA4分子はCTLA4の細胞外ドメインのN末端と連結したオンコスタチンMシグナルペプチド、およびCTLA4の細胞外ドメイン（野生型または変異型）のC末端と連結したヒト免疫グロブリン分子（例えば、ヒンジ、CH₂およびCH₃）を含むことができる。この分子は、-26位のメチオニンから-1位のアラニンまでのアミノ酸配列を含むオンコスタチンMシグナルペプチド、+1位のメチオニンから+124位のアスパラギン酸までのアミノ酸配列を含むCTLA4部分、+125位の連絡アミノ酸残基グルタミン、および+126位のグルタミン酸から+357位のリジンまでのアミノ酸配列を含む免疫グロブリン部分を含む。

40

【0053】

詳細には、以下に記載のように変異されたCTLA4配列を含む本発明の可溶性CTLA4変異分子は、変異CTLA4断片と融合したヒトIgC₁部分を含む融合分子である。

【0054】

1つの態様では、可溶性CTLA4変異分子は、細胞外ドメインに単一変異を含むCTLA4断片と融合したヒトIgC₁部分を含む。CTLA4の細胞外ドメインは+1位のメチオニンから+124位のアスパラギン酸を含む（例えば図23）。CTLA4の細胞外ドメインは-1位のアラニンから+124位のアスパラギン酸を含むことができる（例えば図23）。単一部位変異の例としては、+104位のロイシンが他のアミノ酸に変化している次のものが挙げられる：

50

【 0 0 5 5 】

【表 2】

単一部位変異	コドン変化
L 1 0 4 E I g	グルタミン酸GAG
L 1 0 4 S I g	セリンAGT
L 1 0 4 T I g	スレオニンACG
L 1 0 4 A I g	アラニンGCG
L 1 0 4 W I g	トリプトファンTGG
L 1 0 4 Q I g	グルタミンCAG
L 1 0 4 K I g	リジンAAG
L 1 0 4 R I g	アルギニンCGG
L 1 0 4 G I g	グリシンGGG

10

20

【 0 0 5 6 】

さらに、本発明は、I g C 1 部分に融合した、2つの変異を含むC T L A 4の細胞外ドメインを有する変異分子を提供する。これらの例としては、+ 1 0 4位のロイシンが他のアミノ酸（例えば、グルタミン酸）に変化し、+ 1 0 5位のグリシン、+ 2 5位のセリン、+ 3 0位のスレオニンまたは+ 2 9位のアラニンが他のアミノ酸に変化している次のものが挙げられる：

【 0 0 5 7 】

【表 3】

2部位変異	コドン変化
L 1 0 4 E G 1 0 5 F I g	フェニルアラニンTTC
L 1 0 4 E G 1 0 5 W I g	トリプトファンTGG
L 1 0 4 E G 1 0 5 L I g	ロイシンCTT
L 1 0 4 E S 2 5 R I g	アルギニンCGG
L 1 0 4 E T 3 0 G I g	グリシンGGG
L 1 0 4 E T 3 0 N I g	アスパラギンAAT
L 1 0 4 E A 2 9 Y I g	チロシンTAT
L 1 0 4 E A 2 9 L I g	ロイシンTTG
L 1 0 4 E A 2 9 T I g	スレオニンACT
L 1 0 4 E A 2 9 W I g	トリプトファンTGG

30

40

【 0 0 5 8 】

50

さらに、本発明は、I g C 1 部分に融合した、3つの変異を含むC T L A 4 の細胞外ドメインを有する変異分子を提供する。これらの例としては、+ 1 0 4 位のロイシンが他のアミノ酸（例えば、グルタミン酸）に変化し、+ 2 9 位のアラニンが他のアミノ酸（例えばチロシン）に変化し、そして+ 2 5 位のセリンが他のアミノ酸に変化している次のものが挙げられる：

【 0 0 5 9 】

【 表 4 】

3部位変異	コドン変化
L 1 0 4 E A 2 9 Y S 2 5 K I g	リジンAAA
L 1 0 4 E A 2 9 Y S 2 5 K I g	リジンAAG
L 1 0 4 E A 2 9 Y S 2 5 N I g	アスパラギンAAC
L 1 0 4 E A 2 9 Y S 2 5 R I g	アルギニンCGG

10

【 0 0 6 0 】

可溶性C T L A 4 変異分子は分子のC T L A 4 部分とI g 部分との間に位置する連絡アミノ酸残基を含むことができる。この連絡アミノ酸はグルタミンなどのアミノ酸であることができる。連絡アミノ酸は、当業界にて既知の分子または化学的合成法によって導入することができる。

20

【 0 0 6 1 】

本発明は、変異分子のC T L A 4 部分の細胞外ドメインのN末端と連結したシグナルペプチド配列を含むC T L A 4 変異分子を提供する。シグナルペプチドは、オンコスタチンM (Malik et al., (1989) Molec. Cell Biol. 9: 2847-2853) またはCD5 (Jones, N.H. et al., (1989) Nature 323: 346-349) 由来のシグナルペプチドまたは細胞外タンパク質由来のシグナルペプチドなど、変異分子を分泌させるあらゆる配列であることができる。

30

【 0 0 6 2 】

本発明は、L 1 0 4 E I g (図18に含まれる) またはL 1 0 4 S I g などの、C T L A 4 の細胞外ドメインに単一位点変異を含む可溶性C T L A 4 変異分子を提供する、ここに、L 1 0 4 E I g およびL 1 0 4 S I g はC T L A 4 配列が変異しており、+ 1 0 4 位のロイシンがそれぞれグルタミン酸またはセリンに置換している。単一位点変異分子はさらに、+ 1 位のメチオニンから+ 1 2 4 位のアスパラギン酸を含むC T L A 4 部分、+ 1 2 5 位の連絡アミノ酸残基グルタミン、および+ 1 2 6 位のグルタミン酸から+ 3 5 7 位のリジンまでを含む免疫グロブリン部分を含む。この変異分子の免疫グロブリン部分はさらに、+ 1 3 0、+ 1 3 6 および+ 1 3 9 位のシステインがセリンと置換し+ 1 4 8 位のプロリンがセリンに置換するように変異することができる。あるいは、単一位点可溶性C T L A 4 変異分子は、- 1 位のアラニンから+ 1 2 4 位のアスパラギン酸を含むC T L A 4 部分を含むことができる。

40

【 0 0 6 3 】

本発明は、L 1 0 4 E A 2 9 Y I g、L 1 0 4 E A 2 9 L I g、L 1 0 4 E A 2 9 T I g またはL 1 0 4 E A 2 9 W I g などの、C T L A 4 の細胞外ドメインに2部位変異を含む可溶性C T L A 4 変異分子を提供する、ここに、+ 1 0 4 位のロイシンはグルタミン酸に、+ 2 9 位のアラニンはそれぞれチロシン、ロイシン、スレオニンおよびトリプトファンに置換している。+ 1 位のメチオニンから+ 3 5 7 位のリジンで終わりさらにシグナル(リーダー)ペプチド配列を含むL 1 0 4 E A 2 9 Y I g、L 1 0 4 E A 2 9 L I g、L 1 0 4 E A 2 9 T I g およびL 1 0 4 E A 2 9 W I g の配列はそれぞれ、図19-22に示

50

す配列に含まれている。2部位変異分子はさらに、+1位のメチオニンから+124位のアスパラギン酸を含むCTLA4部分、+125位の連絡アミノ酸残基グルタミン、および+126位のグルタミン酸から+357位のリジンまでを含む免疫グロブリン部分を含む。この変異分子の免疫グロブリン部分はさらに、+130、+136および+139位のシステインがセリンと置換し+148位のプロリンがセリンに置換するように変異することができる。あるいは、これらの変異分子は、-1位のアラニンから+124位のアスパラギン酸を含むCTLA4部分を含むことができる。

【0064】

本発明は、L104EG105FIG、L104EG105WIGおよびL104EG105LIGなどの、CTLA4の細胞外ドメインに2部位変異を含む可溶性CTLA4変異分子を提供する、ここに、+104位のロイシンはグルタミン酸に、+105位のグリシンはそれぞれフェニルアラニン、トリプトファンおよびロイシンに置換している。この2部位変異分子はさらに、+1位のメチオニンから+124位のアスパラギン酸を含むCTLA4部分、+125位の連絡アミノ酸残基グルタミン、および+126位のグルタミン酸から+357位のリジンまでを含む免疫グロブリン部分を含む。この変異分子の免疫グロブリン部分はさらに、+130、+136および+139位のシステインがセリンと置換し+148位のプロリンがセリンに置換するように変異することができる。あるいは、これらの変異分子は、-1位のアラニンから+124位のアスパラギン酸を含むCTLA4部分を含むことができる。

10

【0065】

本発明は、+1位のメチオニンから+124位のアスパラギン酸を含むCTLA4部分、+125位の連絡アミノ酸残基グルタミン、および+126位のグルタミン酸から+357位のリジンまでを含む免疫グロブリン部分を含む2部位変異分子であるL104ES25RIGを提供する。CTLA4の細胞外ドメインを有する部分は、+25位のセリンがアルギニンに置換し、+104位のロイシンはグルタミン酸に置換するよう変異されている。あるいは、L104ES25RIGは、-1位のアラニンから+124位のアスパラギン酸を含むCTLA4部分を含むことができる。

20

【0066】

本発明は、L104ET30GIGおよびL104ET30NIGなどの、CTLA4の細胞外ドメインに2部位変異を含む可溶性CTLA4変異分子を提供する、ここに、+104位のロイシンはグルタミン酸に、+30位のスレオニンはそれぞれグリシンおよびアスパラギンに置換している。この2部位変異分子はさらに、+1位のメチオニンから+124位のアスパラギン酸を含むCTLA4部分、+125位の連絡アミノ酸残基グルタミン、および+126位のグルタミン酸から+357位のリジンまでを含む免疫グロブリン部分を含む。この変異分子の免疫グロブリン部分はさらに、+130、+136および+139位のシステインがセリンと置換し+148位のプロリンがセリンに置換するように変異することができる。あるいは、これらの変異分子は、-1位のアラニンから+124位のアスパラギン酸を含むCTLA4部分を含むことができる。

30

【0067】

本発明は、L104EA29YS25KIG、L104EA29YS25NIGまたはL104EA29YS25RIGなどの、CTLA4の細胞外ドメインに3部位変異を含む可溶性CTLA4変異分子を提供する、ここに、+104位のロイシンはグルタミン酸に置換しており、+29位のアラニンはチロシンに変化しており、+25位のセリンはそれぞれリジン、アスパラギンおよびアルギニンに変化している。3部位変異分子はさらに、+1位のメチオニンから+124位のアスパラギン酸を含むCTLA4部分、+125位の連絡アミノ酸残基グルタミン、および+126位のグルタミン酸から+357位のリジンまでを含む免疫グロブリン部分を含む。この変異分子の免疫グロブリン部分はさらに、+130、+136および+139位のシステインがセリンと置換し+148位のプロリンがセリンに置換するように変異することができる。あるいは、これらの変異分子は、-1位のアラニンから+124位のアスパラギン酸を含むCTLA4部分を含むことができ

40

50

る。

【0068】

可溶性CTLA4変異分子のさらなる態様には、B7を結合するキメラCTLA4/CD28相同変異分子が含まれる(Peachら, J. Exp. Med., 1994, 180: 2049-2058)。キメラCTLA4/CD28変異分子の例としては、HS1、HS2、HS3、HS4、HS5、HS6、HS4A、HS4B、HS7、HS8、HS9、HS10、HS11、HS12、HS13およびHS14(米国特許第5,773,253号)が挙げられる。

【0069】

本発明の好ましい態様は、CTLA4Ig(図24に示すように+1位のメチオニンから始まり+357位のリジンに終わる)および可溶性CTLA4変異体L104EA29YIg(図19に示すように+1位のメチオニンから始まり+357位のリジンに終わる)などの可溶性CTLA4分子である。本発明はさらに、本発明の可溶性CTLA4分子に相当するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子をも提供する。1つの態様では、核酸分子はDNA(例えばcDNA)またはそのハイブリッドである。CTLA4IgをコードするDNA(図24)は、1991年5月31日にバージニア州20110-2209マナッサス・ユニバーシティブルバード10801のAmerican Type Culture Collection(ATCC)に寄託され、受託番号ATCC68629がATCCから付与されている。L104EA29YIgをコードするDNA(図19に示す配列)は、2000年6月19日にATCCに寄託され、ATCC受託番号PTA-2104が付与されている。あるいは、核酸分子はRNAまたはそのハイブリッドである。

【0070】

さらに、本発明は、本発明のヌクレオチド配列を含むベクターも提供する。発現ベクターの例には、哺乳類宿主細胞用のベクター(例えばBPV-1、pHyg、pRSV、pSV2、pTK2(Maniatis); pIRES(Clontech); pRc/CMV2、pRc/RSV、pSFV1(Life Technologies); pVPackベクター、pCMVベクター、pSG5ベクター(Stratagene)、レトロウイルスベクター(例えばpFBベクター(Stratagene))、pCDNA-3(Invitrogen)またはそれらの修飾型、アデノウイルスベクター; アデノ随伴ウイルスベクター、パキウイルスベクター、酵母ベクター(例えばpSECベクター(Stratagene))などがあるが、これらに限定されない。

【0071】

また宿主ベクター系も提供する。宿主ベクター系は適切な宿主細胞に本発明のベクターを含んでなる。適切な宿主細胞の例としては原核生物細胞および真核生物細胞が挙げられるが、これらに限定されない。本発明を実施するには、真核生物が好ましい適切な宿主細胞である。真核生物細胞の例には、初代または不死化を問わず、動物細胞、酵母(例えばサッカロミセス・セレビシエ、シゾサッカロミセス・ボンベおよびピキア・パストリス)および植物細胞などがある。骨髄腫、COS細胞およびCHO細胞は、宿主として使用することができる動物細胞の例である。CHO細胞の具体例には、例えばDG44(Chasinら, 1986, Som. Cell. Molec. Genet. 12: 555-556; Kolkekar, 1997, Biochemistry 36: 10901-10909)、CHO-K1(ATCC No. CCL-61)、CHO-K1 Tet-On細胞株(Clontech)、ECACC 85050302と呼称されるCHO(CAMR(英国ウィルトシャー・ソールズベリー))、CHOクローン13(GEIMG(イタリア・ジェノバ))、CHOクローンB(GEIMG(イタリア・ジェノバ))、ECACC 93061607と呼称されるCHO-K1/SF(CAMR(英国ウィルトシャー・ソールズベリー))およびECACC 92052129と呼称されるRR-CHO-K1(CAMR(英国ウィルトシャー・ソールズベリー))などがある。植物細胞の代表例としては、タバコ(植物全体、細胞培養またはカルス)、トウモロコシ、ダイズおよ

びコメ細胞などがある。トウモロコシ、ダイズおよびコメ種子も利用できる。

【0072】

本発明のCTLA4変異分子は天然に存在するポリペプチドとして、または天然、合成、半合成または組換えを問わない供給源から単離することができる。従って、CTLA4変異ポリペプチド分子は、あらゆる種、特にウシ、ヒツジ、ブタ、ネズミ、ウマなどの哺乳類、好ましくはヒトから天然に存在するタンパク質として単離することができる。あるいは、CTLA4変異ポリペプチド分子は、原核生物または真核生物宿主細胞から発現する組換えポリペプチド、または化学的合成されたポリペプチドとして単離することができる。

【0073】

当業者であれば、単離されるCTLA4変異分子を得るための標準的な単離方法を容易に利用することができる。単離の性質や程度は単離する分子の目的とする用途および供給源に依存する。

【0074】

CTLA4変異分子およびその断片または誘導体は組換え法によって調製することができる。従って、野生型CTLA4分子をコードする単離ヌクレオチド配列を操作して変異を導入し、CTLA4変異ポリペプチド分子をコードするヌクレオチド配列を得ることができる。例えば、CTLA4変異分子をコードするヌクレオチド配列は、プライマーおよびPCR増幅を使用し、部位特異的突然変異によって調製できる。プライマーは、所望の変異を導入できるよう設計した個別の配列を含むことができる。あるいは、プライマーはランダム変異を導入するための無作為または半無作為配列を含むよう設計することができる。CTLA4変異ポリペプチドをコードするCTLA4変異ポリヌクレオチドを調製し単離するには、標準的な組換え法(「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」第2版、Sambrook, FritschおよびManiatisら編、(1989) Cold Spring Harbor Press)およびPCR手法(米国特許第4,603,102号)を利用できる。

【0075】

本発明は、医薬有効量の可溶性CTLA4分子を含む、免疫系疾患を処置するために使用される医薬組成物を包含する。特定の態様では、免疫系疾患は、CD28/CTLA4/B7相互作用によって媒介される。可溶性CTLA4分子は好ましくは、野生型配列を有する可溶性CTLA4分子、および/またはCTLA4の細胞外ドメインに1またはそれ以上の変異を持つ可溶性CTLA4分子である。医薬組成物は、可溶性CTLA4タンパク質分子および/またはこの分子をコードする核酸分子および/またはベクターを含むことができる。好ましい態様では、可溶性CTLA4分子は、図24または19のいずれかに示すCTLA4の細胞外ドメイン(それぞれCTLA4 IgまたはL104EA29Y)のアミノ酸配列を有する。さらに好ましくは、可溶性CTLA4変異分子は本明細書に開示するL104EA29Y Igである。本組成物はさらに、例えば薬物毒素、酵素、抗体またはコンジュゲート体など、他の治療薬を含んでもよい。

【0076】

当分野の標準的手法と同様、当業者に既知の許容される担体またはアジュバントとともに混合した本発明の分子を含む医薬組成物が提供される。本発明の医薬組成物は好ましくは、本発明の分子(例えばCTLA4 IgまたはL104EA29Yなどの可溶性CTLA4分子)と混合したときに本発明分子の活性を損なわず、かつ対象の免疫系と反応しない適切な材料である担体およびアジュバントを含む。適切な担体およびアジュバントの例としてはイオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、ヒト血清アルブミンなどの血清タンパク質、緩衝剤(リン酸塩、グリシンなど)、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物性脂肪酸の部分グリセリド混合物、リン酸緩衝化食塩水、水、エマルジョン(例えば水/油エマルジョン)、塩類または電解質(硫酸プロタミン、リン酸一水素ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイド状シリカ、三珪酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロース基本物質およびポリエチレング

10

20

30

40

50

リコールなど)が挙げられるが、これらに限定されない。他の担体には滅菌溶液、コート錠などの錠剤、カプセル剤を挙げることもできる。典型的には、このような担体は賦形剤、例えばデンプン、ミルク、糖(例えばスクロース、グルコース、マルトース)、ある種の粘土、ゼラチン、ステアリン酸またはその塩、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、植物性脂肪または油、ゴム、グリコールまたは他の既知の賦形剤を含む。このような担体には香料および着色料または他の成分を含めることもできる。このような担体を含む組成物は周知の通常の方法によって製剤化される。そのような組成物は例えばリポソームなどの様々な脂質組成物およびポリマーマイクロスフェアなどのポリマー組成物中に製剤化することもできる。

【0077】

方 法

本発明は、機能的なCTLA4 - およびCD28 - 陽性細胞とB7陽性細胞との相互作用を調節するための方法を提供する。この方法は、B7細胞を本発明の可溶性CTLA4分子と接触させ、可溶性CTLA4/B7複合体を生成し、この複合体が内生CTLA4および/またはCD28分子とB7分子との反応を妨害する。

【0078】

さらに、本発明は、ヒトにおいてB7陽性細胞を可溶性CTLA4と接触させることによる、ヒトにおけるT細胞機能を阻害するがT細胞を枯渇(減少)させない方法を提供する。可溶性CTLA4の例には、CTLA4Igおよび可溶性CTLA4変異分子、例えばL104EA29YIgがある。

【0079】

さらに本発明は、リウマチ疾患などの免疫系疾患を処置する方法も提供する。この方法では、免疫系疾患に関連する少なくとも1つの症状を緩解するに有用な量の、本発明可溶性CTLA4分子を含む治療用組成物を対象に投与する。さらに、本発明は、T細胞/B7陽性細胞相互作用を遮断することによりCD28と結合するB7などの共刺激シグナルによってT細胞刺激を遮断し、T細胞アネルギーまたは寛容性を導く、免疫系疾患のための長期療法を提供することができる。免疫系疾患には自己免疫疾患、免疫増生疾患、および移植片関連障害があるが、これらに限定されない。移植片関連疾患の例には、移植片対宿主疾患(GVHD)(例えば骨髄移植によって起こるもの、または寛容の誘導をもたらすもの)、移植拒絶、慢性拒絶および組織または細胞(例えば固形臓器、皮膚、島、筋、肝細胞、ニューロンなど)の同種移植もしくは異種移植に関係する免疫障害がある。免疫増生疾患の例には、乾癬、T細胞リンパ腫、T細胞急性リンパ芽球性白血病、精巣血管中心性T細胞リンパ腫、良性リンパ球性血管炎、および自己免疫疾患、例えば狼蒼(例:エリテマトーデス、ループス腎炎)、橋本甲状腺腫、原発性粘液水腫、グレーブス病、悪性貧血、自己免疫性萎縮性胃炎、アジソン病、糖尿病(例:インシュリン依存性糖尿病、I型糖尿病)、グッドパスチャー症候群、筋無力症、天疱瘡、クローン病、交感性眼炎、自己免疫性ブドウ膜炎、多発性硬化症、自己免疫性溶血性貧血、特発性血小板減少症、原発性胆汁性肝硬変、慢性活動性肝炎、潰瘍性大腸炎、シェーグレン症候群、リウマチ性疾患(例:慢性関節リウマチ)、多発性筋炎、強皮症、および混合結合組織病などがあるが、これらに限定されない。

【0080】

本発明の可溶性CTLA4分子はインビボにて阻害特性を示す。T細胞/B7陽性細胞相互作用、例えばT細胞/B細胞相互作用がT細胞とB7陽性細胞との接触の結果として起こっているような状態では、導入されたCTLA4分子が結合してB7陽性細胞、例えばB細胞に対する反応を起こすことにより、T細胞/B7陽性細胞相互作用が妨害、即ち阻害され、その結果、免疫応答が調節される。

【0081】

本発明は免疫応答をダウンレギュレート(下方調節)する方法を提供する。本発明の可溶性CTLA4分子による免疫応答のダウンレギュレーションは、既に進行中の免疫応答を阻害または遮断してもよいし、免疫応答の誘導を予防するものであってもよい。本発明の

10

20

30

40

50

可溶性CTLA4分子は、T細胞応答を抑制もしくはT細胞に特異的寛容を誘発することによって、またはその両方によって、例えばTリンパ球増殖やサイトカイン分泌などの活性化T細胞の機能を阻害することができる。さらに、CTLA4/CD28/B7経路を妨害する本発明の可溶性CTLA4分子はT細胞増殖および/またはサイトカイン分泌を阻害し、それにより組織破壊を低下させ、T細胞非応答性やアネルギーを誘導できる。

【0082】

本発明の好ましい態様は、可溶性CTLA4分子、L104EA29YIgを使用し、機能的CTLA4-およびCD28-陽性細胞とB7陽性細胞との相互作用を調節し、リウマチ疾患などの免疫系疾患を処置し、および/または免疫応答をダウンレギュレートする。本発明のL104EA29YIgは、+104位におけるロイシン(L)からグルタミン酸(E)、および+29位におけるアラニン(A)からチロシン(Y)への変化である少なくとも2つのアミノ酸変化を含む可溶性CTLA4変異分子である。L104EA29YIg分子は2つの特定の変異以上の変異をさらに含むことができる。

10

【0083】

好ましい態様では、有効量の可溶性CTLA4分子を対象に投与することにより、慢性関節リウマチなどのリウマチ疾患を処置する方法を包含する。治療組成物の有効量を投与することにより、疾患に付随する少なくとも1つの対象における症状を緩解、例えば関節腫脹、関節圧痛、炎症、朝のこわばり、および痛み、ならびに爾後に身体障害を低下させる構造的障害を減少させる。本発明の方法を使用すればさらに、慢性関節リウマチに付随する少なくとも1つ症状を減少、例えば赤血球凝集率、C反応性タンパク質、可溶性ICAM-1、可溶性Eセレクトインおよび/または可溶性IL-2rの血清レベルを減少させることができる。

20

【0084】

本発明によってもたらされる症状の緩解量は、臨床設定において症状緩解を測定し記録するのに確立されている許容された基準を用いて測定できる。症状緩解を測定するための許容された基準には、American College of Rheumatologyにより確立された基準に基づく評点(例えば、ACR20)、症状緩解の4つの測定値(CDER Guideline for the Clinical Evaluation of Anti-Inflammatory and Antirheumatic Drugs - FDA 1988)、および健康評価問診表(the Health Assessment Questionnaire)(HAQ)(Fries, J.F. et al., 1982, J. of Rheumatology 9:789-793)などがある。これら基準の一般的説明については、Guideline for Industry: Clinical Development Programs for Drugs, Devices, and Biological products for the Treatment of Rheumatoid Arthritis (RA), 1999 2月を参照のこと。

30

【0085】

本発明によって試験される対象には哺乳類対象、例えばヒト、サル、類人類、イヌ、ウシ、ウマ、ウサギ、マウスおよびラットがある。

40

【0086】

本発明は可溶性CTLA4分子を投与するための局所または全身の種々の方法を提供する。この方法には、静脈内、筋肉内、腹腔内、経口、吸入および皮下方法、ならびに移植可能ポンプ、連続注入、遺伝子治療、リポソーム、坐剤、局所接触、小胞、カプセル、および注入方法が含まれる。担体と複合化した治療物質は保存のため通常凍結乾燥し、投与前に水または緩衝化溶液を用いて中性pH(約pH7-9、例えばpH7.5)に再構成する。

当業界の標準的な方法のようにして、本発明の組成物は医薬的に許容される形態にて対象に投与すればよい。

【0087】

50

本発明を実施する方法は、本発明の可溶性 C T L A 4 分子を対象に投与し、B 7 陽性細胞と C D 2 8 - および / または C T L A 4 - 陽性細胞との相互作用を調節する。B 7 陽性細胞を、有効量の本発明可溶性 C T L A 4 分子またはその断片もしくは誘導体に接触させ、可溶性 C T L A 4 / B 7 複合体を形成させる。この複合体は内生 C T L A 4 および C D 2 8 分子と B 7 ファミリー分子との相互作用を妨害する。

【 0 0 8 8 】

可溶性 C T L A 4 分子は、対象の体内で内生 B 7 分子がそれぞれのリガンドと結合するのを遮断するのに十分な量および期間（例えば時間および / または複数回）対象に投与すればよい。内生 B 7 / リガンド結合の遮断により、B 7 陽性細胞と C D 2 8 - および / または C T L A 4 - 陽性細胞との相互作用が阻害される。

10

【 0 0 8 9 】

治療物質の用量は、例えば患部組織のタイプ、処置しようとする自己免疫疾患のタイプ、疾患の重症度、対象の健康状態、その薬剤による処置に対する反応性など（これらに限定されない）、多くの因子に依存する。従って、薬剤の用量は個々の対象および投与形式に依存して変動しうる。可溶性 C T L A 4 分子は 0 . 1 ~ 2 0 . 0 m g / k g - 患者体重 / 日、好ましくは 0 . 5 ~ 1 0 . 0 m g / k g / 日の量で投与することができる。

【 0 0 9 0 】

本発明はさらに、免疫系疾患を処置するために他の医薬物質とともに本発明の組成物を使用することを包含する。例えば、リウマチ疾患は、本発明の分子とともに次の免疫抑制剤で処置することができる；例えばコルチコステロイド、シクロスポリン（*Mathiesen 1989 Cancer Lett.*, 44(2): 151-156）、プレドニゾン、アザチオプリン、メトトレキセート（*R. Handschumacher 「第 53 章：免疫抑制に使用される薬物（Chapter 53: Drugs Used for Immunosuppression）」* 1264~1276 頁）、TNF ブロッカーまたはアンタゴニスト（*New England Journal of Medicine*, vol. 340: 253-259, 1999; *The Lancet* vol. 354: 1932-39, 1999, *Annals of Internal Medicine*, vol. 130: 478-486）、または炎症性サイトカインを標的とする他の生物薬剤、非ステロイド系抗炎症薬 / Cox-2 阻害剤、ヒドロキシクロロキン、スルファサラゾピリン、金塩、エタナーセプト、インフリキシマブ、ラパマイシン、ミコフェノール酸モフェチル、アザチオプリン、タクロリムス、バシリキシマブ、サイトキサン（*cytoxan*）、インターフェロン - 1 a、インターフェロン - 1 b、酢酸グラチラマー、塩酸ミトキサントロン、アナキンラ、および / または他生物製剤など。

20

30

【 0 0 9 1 】

可溶性 C T L A 4 分子（好ましくは L 1 0 4 E A 2 9 Y I g ）は、免疫応答を調節するために、以下の薬剤の 1 つまたはそれ以上と併用することもできる：可溶性 g p 3 9 （C D 4 0 リガンド（C D 4 0 L ）、C D 1 5 4、T - B A M、T R A P としても知られている）、可溶性 C D 2 9、可溶性 C D 4 0、可溶性 C D 8 0（例えば A T C C 6 8 6 2 7）、可溶性 C D 8 6、可溶性 C D 2 8（例えば 6 8 6 2 8）、可溶性 C D 5 6、可溶性 T h y - 1、可溶性 C D 3、可溶性 T C R、可溶性 V L A - 4、可溶性 V C A M - 1、可溶性 L E C A M - 1、可溶性 E L A M - 1、可溶性 C D 4 4、g p 3 9 と反応する抗体（例えば A T C C H B - 1 0 9 1 6、A T C C H B - 1 2 0 5 5 および A T C C H B - 1 2 0 5 6）、C D 4 0 と反応する抗体（A T C C H B - 9 1 1 0）、B 7 と反応する抗体（A T C C H B - 2 5 3、A T C C C R L - 2 2 2 3、A T C C C R L - 2 2 2 6、A T C C H B - 3 0 1、A T C C H B - 1 1 3 4 1 など）、C D 2 8 と反応する抗体（A T C C H B - 1 1 9 4 4 または *Martinet al. (J. Clin. Immun.* 4(1): 18-22, 1980) に記載されている m A b 9 . 3）、L F A - 1 と反応する抗体（例えば A T C C H B - 9 5 7 9 および A T C C T I B - 2 1 3）、L F A - 2 と反応する抗体、I L - 2 と反応する抗体、I L - 1 2 と反応する抗体、I F N - ガンマと反応する抗体、C D 2 と反応する抗体、C D 4 8 と反応する抗体、I C A M と反

40

50

応する抗体（例えば ICAM-1 (ATCC CRL-2252)、ICAM-2 および ICAM-3）、CTLA4 と反応する抗体（例えば ATCC HB-304）、Thy-1 と反応する抗体、CD56 と反応する抗体、CD3 と反応する抗体、CD29 と反応する抗体、TCR と反応する抗体、VLA-4 と反応する抗体、VCAM-1 と反応する抗体、LECAM-1 と反応する抗体、ELAM-1 と反応する抗体、CD44 と反応する抗体。ある態様では、モノクローナル抗体が好ましい。また他の態様では抗体断片が好ましい。当業者には容易に理解されるように、併用には、本発明の可溶性 CTLA4 分子と他の 1 つの免疫抑制剤を、可溶性 CTLA4 分子と他の 2 つの免疫抑制剤を、可溶性 CTLA4 分子と他の 3 つの免疫抑制剤などを含めることができる。最適な併用の組み合わせおよび用量は、当分野にて周知の方法を使って決定し、最適化することができる。

10

【0092】

具体的な併用の例には以下の組み合わせがある： L104EA29YIg および CD80 モノクローナル抗体 (mAb)；L104EA29YIg および CD86mAb；L104EA29YIg、CD80mAb および CD86mAb；L104EA29YIg および gp39mAb；L104EA29YIg および CD40mAb；L104EA29YIg および CD28mAb；L104EA29YIg、CD80 および CD86mAb ならびに gp39mAb；L104EA29YIg、CD80 および CD86mAb ならびに CD40mAb；ならびに L104EA29YIg、抗 LFA1mAb、および抗 gp39mAb 抗体。gp39mAb の具体例は MR1 である。当業者には他の組み合わせもすぐわかるだろう。

20

【0093】

本発明の可溶性 CTLA4 分子、例えば L104EA29YIg は唯一の活性物質として、または免疫調節療法に使用される他の薬物と共に、または他の抗炎症剤と共に使用し、例えば同種または異種移植片の急性または慢性拒絶または炎症もしくは自己免疫障害を処置または予防、または寛容を誘導することができる。例えば、本発明の可溶性 CTLA4 分子は、以下の薬物と併用することができる：カルシニューリン阻害剤、例えばシクロスポリン A または FK506、免疫抑制性マクロライド、例えばラパマイシンまたはその誘導体、例えば 40-O-(2-ヒドロキシ)エチルラパマイシン、リンパ球ホーミング剤、例えば FTY720 またはその類似体、コルチコステロイド、シクロホスファミド、アザチオプレン (azathioprene)、メトトレキサート、レフルノミドまたはその同族体、ミゾリピン、ミコフェノール酸、ミコフェノール酸モフェチル、15-デオキシシスバガリンまたはその同族体、免疫抑制性モノクローナル抗体、例えば白血球受容体、例えば MHC、CD2、CD3、CD4、CD11a/CD18、CD7、CD25、CD27、B7、CD40、CD45、CD58、CD137、ICOS、CD150 (SLAM)、OX40、4-1BB またはそれらのリガンドに対するモノクローナル抗体、または他の免疫調節化合物、例えば CTLA4/CD28-Ig、または他の接着分子阻害剤、例えばモノクローナル抗体もしくは LFA-1 アンタゴニスト、セレクチンアンタゴニストおよび VLA-4 アンタゴニストなどの低分子量阻害剤。本化合物は、CD40 およびそのリガンドを妨害する化合物、例えば CD40 に対する抗体および CD40-L に対する抗体と併用するのが特に有用である。

30

40

【0094】

本発明の可溶性 CTLA4 変異分子を、例えば上述したような他の免疫抑制/免疫調節または抗炎症療法とともに投与する場合、同時投与される免疫抑制剤、免疫調節剤または抗炎症性化合物の用量は当然、使用する併用薬のタイプ（例えばそれがステロイドかシクロスポリンか）、実際に使用する薬物、処置しようとする状態などに依存して変動する。

【0095】

上記の説明に従って、本発明はさらなる一側面として、遊離型または医薬的に許容できる塩形態の本発明の可溶性 CTLA4 分子、例えば CTLA4 Ig および/または L104EA29YIg の治療的有効量を、第2の医薬物質と一緒にまたは逐次的に同時投与することを含み、この第2の医薬物質が例えば上述の免疫抑制薬、免疫調節薬または抗炎症薬

50

であるような、上に定義した方法を提供する。さらに本発明は、免疫抑制薬、免疫調節薬または抗炎症薬を含む少なくとも1つの医薬組成物と同時にまたは逐次的に使用される遊離型または医薬的に許容できる塩形態の可溶性CTLA4分子を含む、上に定義した方法で使用される治療的組み合わせ、例えばキットも提供する。キットは投与のための指示書を含む。

【0096】

本発明はさらに、本発明の可溶性CTLA4変異分子を調製するための方法をも提供する。可溶性CTLA4変異分子の発現は原核生物細胞または真核生物細胞において行うことができる。

【0097】

原核生物細胞は最も一般的には種々の細菌株によって代表される。細菌はグラム陽性菌でもグラム陰性菌でもよい。典型的には、大腸菌などのグラム陰性細菌が好ましい。他の微生物株も使用できる。可溶性CTLA4変異分子をコードする配列は、大腸菌などの原核生物細胞において外来配列を発現できるように設計されたベクターに挿入することができる。これらのベクターは普通に使用される原核制御配列を含むことができる；この原核制御配列とは、本明細書では、リボソーム結合部位配列と共に転写開始用のプロモーターを含み、所望によりオペレーターを含んでもよいと定義され、例えば -ラクタマーゼ（ペニシリナーゼ）およびラクトース（lac）プロモーター系（Changら（1977）*Nature* 198:1056）、トリプトファン（trp）プロモーター系（Goedelら（1980）*Nucleic Acids Res.* 8:4057）およびラムダ誘導P_LプロモーターおよびN遺伝子リボソーム結合部位（Shimatakeら（1981）*Nature* 292:128）などといった一般に使用されるプロモーターを含む。

【0098】

このような発現ベクターは複製起点と、抗生物質に対する耐性を付与する -ラクタマーゼまたはネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子などの選択マーカーを含むものであり、それにより、ベクターは細菌中で複製でき、かつそのプラスミドを保有する細胞はアンピシリンまたはカナマイシンなどの抗生物質の存在下で生育した時に選択され得る。

【0099】

発現プラスミドは、様々な標準的方法により原核生物細胞に導入することができ、例えばCaCl₂ショック（Cohen（1972）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2110およびSambrookら編「*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*」第2版、Cold Spring Harbor Press（1989））およびエレクトロポレーションなどであることが、これらの限定されない。

【0100】

本発明を実施するには、真核生物細胞も適切な宿主細胞である。真核生物細胞の例には、初代または不死化動物細胞、酵母（例えばサッカロミセス・セレビスエ、シゾサッカロミセス・ボンベおよびピキア・パストリス）および植物細胞などがある。骨髓腫、COS細胞、CHO細胞は宿主として使用できる動物細胞の例である。CHO細胞の具体例には、例えばDG44（Chasinら、1986、*Som. Cell. Molec. Genet.* 12:555-556；Kolkekar、1997、*Biochemistry* 36:10901-10909）、CHO-K1（ATCC No. CCL-61）、CHO-K1 Tet-On細胞株（Clontech）、ECACC 85050302と称されるCHO（CAMR（英国ウィルトシャー・ソールズベリー））、CHOクローン13（GEIMG（イタリア・ジェノバ））、CHOクローンB（GEIMG（イタリア・ジェノバ））、ECACC 93061607と称されるCHO-K1/SF（CAMR（英国ウィルトシャー・ソールズベリー））およびECACC 92052129と称されるRR-CHOK1（CAMR（英国ウィルトシャー・ソールズベリー））などがある。植物細胞の代表例としては、タバコ（全草、細胞培養またはカルス）、トウモロコシ

10

20

30

40

50

、ダイズおよびコメ細胞などがある。トウモロコシ、ダイズおよびコメ種子も利用することができる。

【0101】

CTLA4変異分子をコードする核酸配列は、真核生物宿主にて外来配列を発現するように設計されたベクターに挿入することもできる。このベクターの調節要素は、使用する真核生物宿主に応じて様々である。

【0102】

発現ベクターにおいて普通に使用される真核生物制御配列は、哺乳類細胞に適合するプロモーターおよび制御配列であり、例えばCMVプロモーター(CDM8ベクター)およびトリ肉腫ウイルス(ASV)(LNベクター)などを含む。他の普通に使用されるプロモーターには、サルウイルス40(SV40)の初期および後期プロモーター(Fiersら(1973)Nature 273:113)、または他のウイルスプロモーター、例えばポリオマ、アデノウイルス2およびウシ乳頭腫ウイルス由来のものなどがある。hMTII(Karinら(1982)Nature 299:797-802)などの誘導プロモーターも使用できる。

10

【0103】

真核生物にてCTLA4変異分子を発現させるためのベクターはさらに、エンハンサー領域と呼ばれる配列を持ってよい。これらは遺伝子発現の最適化に重要であり、プロモーター領域の上流または下流に見いだされる。

【0104】

真核宿主細胞用の発現ベクターの例には、哺乳類宿主細胞用のベクター(例えばBPV-1、pHyg、pRSV、pSV2、pTK2(Maniatis); pIRES(Clontech); pRc/CMV2、pRc/RSV、pSFV1(Life Technologies); pVPackcベクター、pCMVベクター、pSG5ベクター(Stratagene)、レトロウイルスベクター(例えばpFBベクター(Stratagene))、pCDNA-3(Invitrogen)またはそれらの修飾型、アデノウイルスベクター; アデノ随伴ウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、酵母ベクター(例えばpSECベクター(Stratagene))などがあるが、これらに限定されない。

20

【0105】

CTLA4変異分子をコードする核酸配列は、真核生物宿主細胞のゲノムに組み込まれ、宿主ゲノムの複製と共に複製することができる。あるいは、CTLA4変異分子を保有するベクターに複製起点を含ませ、染色体外複製を可能にすることもできる。

30

【0106】

サッカロミセス・セレピシエにて核酸配列を発現させるには、内生の酵母プラスミド2μサークル由来の複製起点を使用することができる(Broach(1983)Meth. Enz. 101:307)。もう一つの選択肢として、自律的複製を促進する酵母ゲノム由来の配列を使用することもできる(例えばStinchcombら(1979)Nature 282:39)、Tschemperら(1980)Gene 10:157、およびClarkeら(1983)Meth. Enz. 101:300を参照のこと)。

40

【0107】

酵母ベクター用の転写制御配列としては例えば解糖系酵素を合成するためのプロモーターが挙げられる(Hessら(1968)J. Adv. Enzyme Reg. 7:149、Hollandら(1978)Biochemistry 17:4900)。当分野にて知られている他のプロモーターには、例えばCDM8ベクターに含まれるCMVプロモーター(ToyamaおよびOkayama(1990)FEBS 268:217-221)、3-ホスホグリセリン酸キナーゼのプロモーター(Hitzemanら(1980)J. Biol. Chem. 255:2073)および他の解糖系酵素のプロモーターなどがある。

50

【0108】

その他、誘導プロモーターもあり、これらは環境刺激または細胞の発育培地によって調節することができる。これらの誘導プロモーターには、例えば熱ショックタンパク質、アルコーレヒドロゲナーゼ2、イソチトクロームC、酸ホスファターゼ、窒素異化に関係する酵素、およびマルトースおよびガラクトース資化を担う酵素の遺伝子に由来するものなどがある。

【0109】

調節配列はコード配列の3'末端に置くこともできる。これらの配列はメッセンジャーRNAを安定化するように作用する。そのようなターミネーターはいくつかの酵母由来遺伝子および哺乳類遺伝子のコード配列に続く3'非翻訳領域に見いだされる。

10

【0110】

植物用ベクターおよび植物細胞には、アグロバクテリウムT_iプラスミド、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)およびトマトゴールデンモザイクウイルス(TGMV)などがあるが、これらに限定されない。

【0111】

哺乳類細胞宿主系の形質転換における一般的側面は、Axel(1983年8月16日発行の米国特許第4,399,216号)により開示された。哺乳類細胞は、例えばリン酸カルシウム存在下でのトランスフェクション、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどの方法、またはウイルスベクターによる形質導入(これらに限定されない)によって形質転換することができる。

20

【0112】

植物および酵母ゲノムに外来DNA配列を導入する方法としては、(1)機械的方法、例えば単一細胞またはプロトプラストへのDNAのマイクロインジェクション、DNAの存在下で細胞をガラスビーズと共にボルテックスする方法、またはDNAで覆ったタングステンまたは金球体を細胞またはプロトプラストに撃ち込む方法など、(2)ポリエチレングリコール処理または高圧電気パルスの印加(エレクトロポレーション)によって巨大分子に対して細胞膜を透過性により、DNAを導入する方法、または(3)リポソーム(cDNAを含むもの)を使って細胞膜に融合させる方法などが挙げられる。

【0113】

本発明のCTLA4変異分子を発現させれば、当分野にて周知の細胞溶解などの方法(例えば、音波処理、リゾチームおよび/または洗浄剤)によって収獲でき、そしてタンパク質の回収は標準的なタンパク質精製手段、例えばアフィニティークロマトグラフィーまたはイオン交換クロマトグラフィーなどを用いて実質的に純粋な産物を得ることによって行うことができる(R.Scopes「Protein Purification, Principles and Practice」第3版, Springer-Verlag(1994); Sambrook et al.(編), Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989))。CTLA4変異分子の発現は当分野にて知られた方法によって検出することができる。例えば、変異分子はSDS-PAGEゲルのクーマシー染色およびCTLA4を結合する抗体を使った免疫ブロッティングによっ

30

40

【0114】

本発明を説明し、当業者がそれを製造し使用する際の助けとなるように、以下に実施例を記載する。以下の実施例は本発明の範囲の限定を意図するものではない。

【0115】

実施例1

以下は、本発明のCTLA4分子をコードするヌクレオチド配列を作成するために使用される方法の説明である。

米国特許5,434,131、5,844,095、5,851,795に記載されているようにして、CTLA4Igをコードするプラスミドをまず構築し、CTLA4Ig分

50

子を発現することを示した。次いで、単一部位変異分子（例えば L 1 0 4 E I g）を C T L A 4 I g をコードする配列から作成し、発現し、種々の B 7 分子に対する結合動態について試験した。L 1 0 4 E I g ヌクレオチド配列（図 1 8 に示す配列に含まれる）を鋳型として使用し、2 部位 C T L A 4 変異配列（図 1 9 - 2 2 に示す配列に含まれる）を作成し、それをタンパク質として発現させ、結合動態について試験した。2 部位 C T L A 4 変異配列には L 1 0 4 E A 2 9 Y I g、L 1 0 4 E A 2 9 L I g、L 1 0 4 E A 2 9 T I g および L 1 0 4 E A 2 9 W I g が含まれる。3 部位変異体も作成した。

【0116】

C T L A 4 I g の構築

米国特許 5, 434, 131、5, 844, 095、5, 851, 795（これらは引用により本明細書に含まれる）に記載されているようにして、C T L A 4 および I g C ガンマ 1 ドメインを含有する C T L A 4 I g をコードする遺伝子構築物を作成した。C T L A 4 遺伝子の細胞外ドメインを、公開されている配列（D a r i a v a c h e t a l . , E u r . J o u r n . I m m u n o l . 1 8 : 1 9 0 1 - 1 9 0 5 (1 9 8 8)）に対応する合成オリゴヌクレオチドを用いて P C R によりクローニングした。

【0117】

C T L A 4 のシグナルペプチドは C T L A 4 遺伝子には同定されていないので、C T L A 4 推定配列の N 末端にオンコスタチン M (M a l i k e t a l . , M o l e c . C e l l . B i o l . 9 : 2 8 4 7 - 2 8 5 3 (1 9 8 9)) のシグナルペプチドを重複オリゴヌクレオチドを使用する 2 工程により融合した。第 1 工程では、オリゴヌクレオチド : C T C A G T C T G G T C C T T G C A C T C C T G T T T C C A A G C A T G G C G A G C A T G G C A A T G C A C G T G G C C C A G C C (これは C T L A 4 の N 末端の 7 アミノ酸が融合しているオンコスタチン M シグナルペプチド由来の C 末端の 15 アミノ酸をコードする) をフォワードプライマーとして、そして T T T G G G C T C C T G A T C A G A A T C T G G G C A C G G T T G (C T L A 4 受容体をコードするアミノ酸配列の 119 - 125 アミノ酸残基をコードし、B c I 制限酵素部位を含有する) をリバースプライマーとして用いた。この工程の鋳型は、H 3 8 細胞 (S a l a h u d i n 博士および G a l l o 博士から提供を受けた H T L V I I 感染 T 細胞白血病細胞株、N C I、ベセスダ、MD) 由来の全 R N A 1 μ g から合成した c D N A であった。この第 1 工程にて得られた P C R 産物の一部を、以下のプライマーを用いて再度複製した：オンコスタチン M シグナルペプチドの N 末端部分をコードし H i n d I I I 制限エンドヌクレアーゼ部位を含有する重複フォワードプライマー：C T A G C C A C T G A A G C T T C A C C A A T G G G T G T A C T G C T C A C A C A G A G G A C G C T G C T C A G T C T G G T C C T T G C A C T C、および同じリバースプライマー。この P C R の反応産物を H i n d I I I および B c I で消化し、得られた消化産物を、I g C (ガンマ) 1 のヒンジ、C H 2 および C H 3 領域に相当するアミノ酸配列をコードする配列を B c I / X b a I で切断した c D N A 断片とともに、H i n d I I I / X b a I 切断発現ベクター C D M 8 または H i n d I I I / X b a I 切断発現ベクター p i L N (L N としても知られている) 中に結合させた。

【0118】

C T L A 4 I g に相当するアミノ酸配列をコードする D N A は 1 9 9 1 年 5 月 3 1 日に A T C C にブタベスト条約の下に寄託され、A T C C 受託番号 6 8 6 2 9 が付与されている。

【0119】

C T L A 4 I g コドンベース変異誘発

C D 8 0 および / または C D 8 6 分子からの解離速度（「オフ」速度）が遅く、即ち結合能が向上している変異型 C T L A 4 I g 分子を同定するため、変異誘発およびスクリーニング方法を開発した。ここでは、C T L A 4 の細胞外ドメインの C D R - 1、C D R - 2 (C ' スtrand としても知られている) および / または C D R - 3 領域内の残基および / またはその付近に変異を施した (米国特許 6, 090, 914、5, 773, 253、

5, 844, 095; 同時継続の米国特許出願番号60/214, 065: および Peach et al., 1994 J. Exp. Med., 180: 2049-2058。CDR様領域はそれぞれのCDR領域を包含し、CDRモチーフの上流および/または下流までアミノ酸の数個が延びている)。キメラCD28/CTLA4融合タンパク質の研究(Peach et al., 1994 J. Exp. Med., 180: 2049-2058)、どのアミノ酸残基側鎖が溶媒に暴露されるかを予測するモデル、およびCD28とCTLA4の間で一定の位置にアミノ酸残基同一性または相同性が欠けていることに基づいて選択した。また、同定した残基と空間的に近い(5-20オングストローム単位)残基も本発明の一部であると考えられる。

【0120】

B7分子(例えばCD80、CD86)に対する親和性が変化している可溶性CTLA4変異分子を合成しスクリーニングするために、2工程法を採用した。これらの実験では、まず、CTLA4の細胞外ドメインの特定コドンにおける変異のライブラリーを作製し、次にBIACore解析によってそれらをスクリーニングし、B7に対する反応性が変化している変異体を同定した。BIACoreアッセイシステム(Pharmacia(ニュージャージー州ピスカタウェイ))では、検出器に配置されたデキストラン被覆センサーチップに対するCD80IgまたはCD86Igいずれかの共有結合が基本的に必要な表面プラズモン共鳴検出システムを使用する。次に、センサーチップを含むチャンバーに試験分子を注入し、結合する相補タンパク質の量を、センサーチップのデキストラン被覆側に物理的に結合している分子量の変化に基づいて評価することができ、分子量の変化は検出システムによって測定することができる。

【0121】

詳細には、鋳型としてCTLA4Igをコードする非変異(例えば野生型)DNA(米国特許第5, 434, 131号、第5, 844, 095号、第5, 851, 795号および第5, 885, 796号、ATCC受託番号68629)を使用し、単一部位変異ヌクレオチド配列を作製した。コドンの1位および2位は任意の塩基であってよいが3位はグアニンまたはチミンのみ(XXG/TまたはNNG/Tともいう)とすることにより、特定コドンのランダム変異誘発用の変異原オリゴヌクレオチドPCRプライマーを設計した。この方法でアミノ酸をコードする特定コドンを、20アミノ酸のそれぞれをコードするよう無作為に(ランダムに)変異させることができる。このXXG/T変異誘発により、20アミノ酸のそれぞれをコードする可能性ある32種類のコドンが得られる。CTLA4IgのCDR3様ループ(MYPPTY)付近に変異をコードするPCR産物をSaci/XbaIで消化し、同様に切断したCTLA4IgLN発現ベクター(図24に含まれる)にサブクローニングした。この方法を使用し、単一部位CTLA4変異分子L104Eig(図18に含まれる)を作製した。

【0122】

CTLA4IgのCDR1様ループ付近の変異誘発のため、PCRプライマー指定変異誘発法によって、まず、このループの5'側にサイレントなNheI制限部位を導入した。PCR産物をNheI/XbaIで消化し、同様に切断したCTLA4IgまたはL104Eig発現ベクターにサブクローニングした。この方法を使用し、2部位CTLA4変異分子L104EA29Yig(図19に含まれる)を作製した。具体的には、単一部位CTLA4変異分子L104Eigをコードする核酸分子を鋳型として使用し、2部位CTLA4変異分子L104EA29Yigを作製した。

【0123】

L104Eigを鋳型として使用する上述の変異誘発手法を繰り返し、L104EA29Yig(バージニア州20110-2209マナッサス・ユニバーシティブルバード10801のAmerican Type Culture Collection(ATCC))に2000年6月19日に寄託され、ATCC番号PTA-2104が付与されている)などのCTLA4変異分子をコードする2部位変異ヌクレオチド配列を作製した。この方法を使用し、CTLA4分子L104EA29Yig(図19に示す配列に含まれる)

10

20

30

40

50

、L104EA29LIg (図20に示す配列に含まれる)、L104EA29TIg (図21に示す配列に含まれる)、L104EA29WIG (図22に示す配列に含まれる)などの、種々の2部位変異ヌクレオチド配列を作製した。L104EA29YS25KIg、L104EA29YS25NIgおよびL104EA29YS25RIgをコードするなどの3部位変異体も作製した。

【0124】

可溶性CTLA4分子を核酸配列から発現させ、後述の実施例3に記載の第II相臨床試験に使用した。

当業者であれば、核酸配列の複製、特にPCR増幅による複製により、DNAストランドに塩基変化を容易に導入できることは理解されよう。しかし、コドンには縮重により同じアミノ酸をコードするものがあるので、ヌクレオチド変化が必ずしもアミノ酸変化に翻訳されるとは限らない。元来の、即ち野生型配列からのヌクレオチド変化はサイレント(即ち翻訳アミノ酸に変化を生じさせないもの)または明示的に本明細書に記載していないその他のものも、本発明の範囲内にある。

【0125】

実施例2

実施例1に記載の構築物から発現された単一部位および2部位変異CTLA4ポリペプチドであって、B7分子に対して非変異型CTLA4Ig分子より高い結合力を示すもの、を同定するために使用されるスクリーニング方法を以下に説明する。

【0126】

現在のインビトロおよびインビボ研究により、CTLA4Ig単独では抗原特異的活性化T細胞のプライミングを完全には遮断できないことが示されている。CTLA4IgとCD80またはCD86のいずれかに特異的なモノクローナル抗体とを用いてT細胞増殖の阻害を測定するインビトロ研究では、抗CD80モノクローナル抗体がCTLA4Ig阻害を増強しなかったことが示されている。しかし、抗CD86モノクローナル抗体は阻害を増強したことから、CTLA4IgはCD86相互作用の遮断にはあまり有効でないことがわかる。これらのデータは、CD80が媒介する細胞応答の阻害に必要なCTLA4Ig濃度はCD86が媒介する細胞応答の場合の約1/100低いことを示したLinsleyらによる初期の知見(Immunity(1994)1:793-801)を支持している。これらの知見に基づいて、CD86に対して野生型CTLA4より高い結合力を持つ可溶性CTLA4変異分子は、抗原特異的活性化細胞のプライミングをCTLA4Igよりも良好に遮断できると推測した。

【0127】

そこで、新しいスクリーニング法を用いて上記実施例1に記載の可溶性CTLA4変異分子をスクリーニングし、CD80およびCD86に対する結合力を向上させるCTLA4の細胞外ドメイン中の変異をいくつか同定した。「オフ」速度の決定は濃度に依存しないので、このスクリーニング方法は、「オフ」速度が遅くなっていると思われる変異体を、タンパク質精製または定量を行わずに直接同定するための効果的な方法になる(O'Shannessyら(1993)Anal. Biochem., 212:457-468)。

【0128】

個々のミニプレップ精製プラスミドDNAをCOS細胞にトランスフェクトし、数日間増殖させた。3日ならし培養培地を可溶性CD80IgまたはCD86Igで被覆したBIACoreバイオセンサーチップ(Pharmacia Biotech AB(スウェーデン・ウプサラ)に適用した。変異タンパク質の特異的結合および解離を、表面プラズモン共鳴によって測定した(O'Shannessy, D. J.ら(1993)Anal. Biochem., 212:457-468)。実験は全てBIACore(商標)またはBIACore(商標)2000バイオセンサーを使って25で行った。リガンドは標準的なN-エチル-N-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドN-ヒドロキシスクシンイミドカップリング法を使って研究用NCM5センサーチップ(Pharmac

10

20

30

40

50

i a) に固定化した (Johnsson, B. ら (1991) Anal. Biochem. 198: 268 - 277、Khilko, S. N. ら (1993) J. Biol. Chem. 268: 5425 - 15434)。

【0129】

スクリーニング法

24 ウェル組織培養平板で生育したCOS細胞に、変異型CTLA4 Igを一過性にトランスフェクトした。3日後に、分泌された可溶性変異CTLA4 Igを含む培養培地を収集した。

【0130】

CD86 IgまたはCD80 Igで誘導体化したBIAcoreバイオセンサーチップにCOS細胞ならし培養培地を流し (Greene ら, 1996, J. Biol. Chem. 271: 26762 - 26771 に記載されているようにして)、野生型CTLA4 Igに見られる「オフ」速度より遅い「オフ」速度を持つ変異分子を同定した。選択した培地試料に対応するDNAを配列決定し、より多くのDNAを調製して、COS細胞の一過性トランスフェクションを大規模に行い、培養培地のプロテインA精製によってそこからCTLA4 Ig変異タンパク質を調製した。

【0131】

BIAcore解析条件および平衡結合データ解析はJ. Greene ら, 1996, J. Biol. Chem. 271: 26762 - 26771 および米国特許出願09/579,927 および60/214,065 (これらは引用により本明細書に包含される) に記載されているようにして行った。

【0132】

BIAcoreデータ解析

分析に先立ってセンサーグラムの基準線をゼロ応答単位 (RU) に標準化した。試料をモック誘導化フローセルに流し、溶液間のバルク屈折率差によるバックグラウンド応答単位 (RU) 値を測定した。平衡解離定数 (K_d) は $R_{e,q}$ 対 C のプロットから計算した (ここに、 $R_{e,q}$ は (定常状態応答) - (モック誘導化チップでの応答) であり、C は分析物のモル濃度である)。結合曲線は市販の非線形カーブフィッティングソフトウェア (Prism、GraphPAD Software) を使って解析した。

【0133】

実験データは、まず単一受容体への単一リガンド結合のモデル (1部位モデル、即ち単純なラングミュア系、 $A + B \rightleftharpoons AB$) にあてはめ、平衡結合定数 ($K_d = [A] \cdot [B] / [AB]$) を式: $R = R_{max} \cdot C / (K_d + C)$ から計算した。次に、データを、リガンド結合の最も簡単な2部位モデル (即ち、式: $R = R_{max1} \cdot C / (K_{d1} + C) + R_{max2} \cdot C / (K_{d2} + C)$) で表される2つの相互作用しない独立した結合部位を持つ受容体) にあてはめた。

【0134】

これら2つのモデルの適合度を、実験データとの比較によって視覚的に、また平方和のF検定によって統計的に解析した。2部位モデルの方が適合度が有意に高くない場合 ($p < 0.1$)、より単純な1部位モデルをベストフィットとして選択した。

【0135】

結合および解離解析は、BIAevaluation 2.1ソフトウェア (Pharmacia) を使って行った。結合速度定数 k_{on} は均一な単一部位相互作用および並行2部位相互作用の両方を仮定して2つの方法で計算した。単一部位相互作用の場合、式: $R_t = R_{e,q} (1 - \exp^{-k_s (t - t_0)})$ [式中、 R_t は時刻 t における応答、 $R_{e,q}$ は定常状態応答、 t_0 は注入を開始した時刻、そして $k_s = dR / dt = k_{on} \cdot C - k_{off}$ (ここに、C はモノマー結合部位に関して計算した分析物の濃度である)] に従って k_{on} 値を計算した。2部位相互作用の場合は、式: $R_t = R_{e,q1} (1 - \exp^{-k_{s1} (t - t_0)}) + R_{e,q2} (1 - \exp^{-k_{s2} (t - t_0)})$ に従って k_{on} 値を計算した。各モデルについて、 k_s 対 C のプロットの傾き (最大結合の約70%まで) の

10

20

30

40

50

計算値から k_{on} の値を決定した。

【0136】

解離データは単一部位モデル ($AB = A + B$) または2部位モデル ($A_i B_j = A_i + B_j$) に従って解析し、速度定数 (k_{off}) をベストフィット曲線から計算した。誤差が機械のバックグランド (機械によって $2 - 10 RU$) より大きい場合 (この場合は2結合部位モデルを使用) を除いて、上記結合部位モデルを使用した。受容体占有の半減期は、 $t_{1/2} = 0.693 / k_{off}$ の関係を使って計算した。

【0137】

フローサイトメトリー

マウスモノクローナル抗体 L307.4 (抗 CD80) は Becton Dickinson (カリフォルニア州サンホゼ) から購入し、IT2.2 (抗 B7-0 [CD86とも呼ばれる]) は Pharmingen (カリフォルニア州サンディエゴ) から購入した。免疫染色のため、 $10 mM$ EDTA を含むリン酸緩衝化食塩水 (PBS) 中でインキュベートすることにより、CD80 陽性および/または CD86 陽性 CHO 細胞を培養器から取り出した。CHO 細胞 ($1 - 10 \times 10^5$ 個) をまずモノクローナル抗体または免疫グロブリン融合タンパク質と共に 10% ウシ胎仔血清 (FBS) を含む DMEM 中でインキュベートした後、洗浄し、フルオレセインイソチオシアネート結合ヤギ抗マウスまたは抗ヒト免疫グロブリン第2工程試薬と共にインキュベートした (Tago (カリフォルニア州バーリングゲーム))。細胞に最終洗浄を施し、FACSscan (Becton Dickinson) で解析した。

【0138】

SDS-PAGE およびサイズ排除クロマトグラフィー

SDS-PAGE はトリス/グリシン $4 - 20\%$ アクリルアミドゲル (Novex (カリフォルニア州サンディエゴ)) で行った。分析用ゲルはクーマシーブルーで染色し、デジタルスキャンングによって湿ゲルの画像を得た。 0.02% NaN_3 を含むリン酸緩衝化食塩水で平衡化した TSK-GEL G300 SW_{xL} カラム ($7.8 \times 300 mm$ 、Tosohhaas (ペンシルバニア州モントゴメリービル)) を使用し、 $1.0 ml / 分$ の流速で、CTLA4 Ig ($25 \mu g$) および L104EA29Y Ig ($25 \mu g$) をサイズ排除クロマトグラフィーによって分析した。

【0139】

CTLA4X_{C120S} および L104EA29YXC_{120S}

一本鎖 CTLA4X_{C120S} を先に記述されているようにして調製した (Linsley ら (1995) J. Biol. Chem., 270: 15417 - 15424)。簡単に述べると、オンコスタチン M CTLA4 (OMCTLA4) 発現プラスミドを鋳型として使用し、ベクター中の配列に適合するようにフォワードプライマー:

G A G G T G A T A A A G C T T C A C C A A T G G G T G T A C T G C T C A C A C A G

を選択した。またリバースプライマー:

G T G G T G T A T T G G T C T A G A T C A A T C A G A A T C T G G G C A C G G T T C

は、CTLA4 の細胞外ドメインの最後の7アミノ酸 (即ちアミノ酸 118 - 124) に相当し、制限酵素部位および停止コドン (TGA) を含んでいる。リバースプライマーは C120S (120位におけるシステインからセリンへの) 変異を指定している。具体的には、上記リバースプライマーのヌクレオチド配列 GCA (ヌクレオチド 34 - 36) を以下のヌクレオチドの一つと置き換える: AGA、GGA、TGA、CGA、ACT または GCT。当業者に理解されるように、ヌクレオチド配列 GCA はシステインのコドン TGC の逆相補配列である。同様に、ヌクレオチド配列 AGA、GGA、TGA、CGA、ACT または GCT はセリンのコドンの逆相補配列である。ポリメラーゼ連鎖反応産物を HindIII / XbaI で消化し、発現ベクター LN (Bristol-Myers Squibb Company (ニュージャージー州プリンストン)) に特定の向きで

10

20

30

40

50

サブクローニングした。各構築物をDNA配列決定によって確認した。

【0140】

高結合変異体の同定および生化学的特徴づけ

24のアミノ酸を変異誘発用を選択し、得られた約2300の変異型タンパク質を、表面プラズモン共鳴法(SPR;上記の方法)によりCD86Ig結合に関して検定した。各部位での変異誘発の主な効果を以下の第II表に要約する。CDR-1領域(S25-R33)中のアミノ酸の一部にはランダム変異を施してもリガンド結合は明らかに変化しなかった。E31およびR33ならびに残基M97-Y102の変異誘発はリガンド結合の低下をもたらした。残基S25、A29およびT30、K93、L96、Y103、L104およびG105の変異誘発は「オン」速度の低下および/または「オフ」速度の低下をもたらした。これらの結果は、CDR-1(S25-R33)領域中の残基およびM97-Y102中またはその近傍にある残基がリガンド結合に影響するという先の知見(Peachら(1994) *J. Exp. Med.*, 180:2049-2058)を裏付けている。

10

【0141】

部位S25、T30、K93、L96、Y103およびG105の変異誘発によって、「オフ」速度がCD86Igより遅い変異体がいくつか同定された。しかしこれらの例では、遅い「オフ」速度が遅い「オン」速度と相殺し、CD86Igに対する全体結合力は野生型CTLA4Igで見られる結合力と見かけ上同じ程度の変異体であった。また、K93の変異誘発はかなりの凝集をもたらしたが、これも観察された動態変化の原因になっている可能性がある。

20

【0142】

L104にランダム変異誘発を行った後、COS細胞のトランスフェクションおよび固定化CD86Igに対する培養培地試料のSPRによるスクリーニングを行ったところ、「オフ」速度が野生型CTLA4Igのおよそ1/2しかない変異タンパク質を含む6つの培地試料が得られた。これら変異体の対応するcDNAを配列決定したところ、いずれもロイシンからグルタミン酸への変異(L104E)をコードすることがわかった。ロイシン104からアスパラギン酸への置換(L104D)はCD86Ig結合に影響を及ぼさなかった。

30

【0143】

次に、今度はPCR鑄型として上記の野生型CTLA4IgではなくL104Eを使用し、第II表に列挙した各部位で、変異誘発を繰り返した。再び固定化CD86Igを使ってSPR解析を行ったところ、アラニン29の変異誘発により、「オフ」速度が野生型CTLA4Igのおよそ1/4しかないタンパク質を含む培養培地試料が6つ同定された。最も遅い2つはチロシン置換(L104EA29Y)、2つはロイシン(L104EA29L)、1つはトリプトファン(L104EA29W)、そして1つはスレオニン(L104EA29T)だった。野生型CTLA4Igのアラニン29を単独でランダムに変異させても、遅い「オフ」速度を持つ変異体は同定されないようだった。

【0144】

精製したL104EおよびL104EA29YIgの相対分子量および凝集状態をSDS-PAGEおよびサイズ排除クロマトグラフィーによって評価した。L104EA29YIg(約1μg;レーン3)およびL104E Ig(約1μg;レーン2)は、還元条件(約50kDa;+ME;+2-メルカプトエタノール)でも非還元条件(約100kDa;-ME)でも、CTLA4Ig(約1μg;レーン1)と見かけ上同じ電気泳動移動度を持っていた(図25A)。サイズ排除クロマトグラフィーにより、L104EA29YIg(図25C)は二量体CTLA4Ig(図25B)と見かけ上同じ移動度を持つことが証明された。主要ピークはタンパク質二量体に相当し、図25Bで速く溶出するマイナーピークは高分子量凝集体に相当する。CTLA4Igの約5.0%は高分子量凝集体として存在したが、L104EA29YIgまたはL104E Igの凝集を示す証拠は認められなかった。従って、L104E IgおよびL104EA29Y Igに見られた

40

50

CD86 Ig への強い結合は、変異誘発が誘発した凝集に起因するものではないと考えられる。

【0145】

平衡結合解析および速度論的結合解析

プロテインAで精製したCTLA4 Ig、L104E IgおよびL104EA29Y Ig に対し、表面プラズモン共鳴法(SPR)を使って、平衡結合解析および速度論的結合解析を行った。結果を以下の第I表に示す。観察された平衡解離定数(K_d ; 第I表)はある濃度範囲(5.0 - 200 nM)にわたって作成した結合曲線から計算した。L104EA29Y IgはL104E IgまたはCTLA4 Igより強くCD86 Igに結合する。L104EA29Y Igの K_d (3.21 nM)がL104E Ig(6.06 nM)またはCTLA4 Ig(13.9 nM)より低いことは、L104EA29Y Igの方がCD86 Igに対して高い結合力を持つことを示している。L104EA29Y Igの K_d (3.66 nM)がL104E Ig(4.47 nM)またはCTLA4 Ig(6.51 nM)より低いことは、L104EA29Y Igの方がCD80 Igに対して高い結合力を持つことを示している。

10

【0146】

速度論的結合解析により、CD80に対するCTLA4 Ig、L104E IgおよびL104EA29Y Ig結合の比較上の「オン」速度は同じくらいであり、CD86 Igに関する「オン」速度も同様であることがわかった(第I表)。しかし、これらの分子の「オフ」速度は等しくなかった(第I表)。CTLA4 Igと比較すると、L104EA29Y IgのCD80 Igからの「オフ」速度は約2倍遅く、CD86 Igからの「オフ」速度は約4倍遅かった。L104Eの「オフ」速度はL104EA29Y IgとCTLA4 Igの間だった。これらの変異の導入は「オン」速度に有意な影響を与えなかったので、L104EA29Y Igで観察されたCD80 IgおよびCD86 Igに対する結合力の増大は、主として「オフ」速度の低下によると思われる。

20

【0147】

CD86 IgおよびCD80 Igに対するL104EA29Y Igの結合力の増大が、各単量体が二量体として会合する仕方に変異が影響を与えたためかどうか、あるいは結合力を増大させる構造変化が各単量体に導入されたためかどうかを決定するため、CTLA4およびL104EA29Y細胞外ドメインの1本鎖構築物を、上述のように、そしてLinsleyら(1995) J. Biol. Chem., 270: 15417 - 15424に記載のように、システイン120のセリンへの変異誘発によって作製した。精製したタンパク質CTLA4 $X_{C_{120S}}$ およびL104EA29Y $X_{C_{120S}}$ が単量体であることをゲル透過クロマトグラフィーによって明らかにした後(Linsleyら(1995)前掲)、それらのリガンド結合特性をSPRによって解析した。その結果、CD86 Igに対する両単量体タンパク質の結合親和性はそれぞれの二量体で観察される結合親和性のおよそ35 - 80分の1であることがわかった(第I表)。これは、高結合力リガンド結合にはCTLA4の二量化が必要であることを示す先に公表されたデータ(Greeneら(1996) J. Biol. Chem., 271: 26762 - 26771)を裏付けている。

30

40

【0148】

L104EA29Y $X_{C_{120S}}$ はCD80 IgおよびCD86 Igの両者に対してCTLA4 $X_{C_{120S}}$ より約2倍高い親和性で結合した。この親和性の増大は、どちらのリガンドからも解離速度が約1/3に低下したためだった。従って、L104EA29Yによる強いリガンド結合は、分子の二量化という変化があったからではなく、おそらく結合力を増大させる構造変化が各単量体の鎖に導入されたためであろう。

【0149】

結合力を増大させる変異の位置および構造解析

最近、CTLA4の細胞外IgV様ドメインの解析構造がNMR分光法によって決定された(Metzlerら(1997) Nature Struct. Biol., 4: 52

50

7 - 531)。これにより、三次元フォールドにおけるロイシン104およびアラニン29の正確な位置特定が可能になった(図26の左および右図)。ロイシン104は高度に保存されたMYPPPYアミノ酸配列の近くに位置する。アラニン29は、MYPPPY領域に空間的に隣接するCDR-1(S25-R33)領域のC末端近くに位置する。これら2つの領域の基礎をなす残基間には有意な相互作用があり、L104とA29はどちらもタンパク質内の隣接する疎水コアの一部を構成しているもののL104とA29の間には直接的な相互作用はないようである。結合力を増大させる2つの変異が構造にもたらす結果をモデリングによって評価した。A29Y変異はCDR1(S25-R33)領域とMYPPPY領域の間の溝に容易に収納され、MYPPPY領域のコンフォメーションを安定化する役割を果たしうる。野生型CTLA4では、L104はMYPPPY領域に近いL96およびV94と強い疎水相互作用を形成する。グルタミン酸変異がL104に似たコンフォメーションをとることは2つの理由からまずあり得ない。第1に、CDR-1(S25-R33領域)に有意な摂動を加えずに構造上長いグルタミン酸側鎖を収容するには空間が不十分である。第2に、グルタミン酸側鎖の負電荷を疎水領域に埋め込むとエネルギー損失が大きい。むしろモデリング研究によれば、グルタミン酸側鎖は表面に飛びだし、表面ではその電荷が溶媒和によって安定化されることが予測される。このようなコンフォメーション変化は、当該領域中の他の残基に最小限の歪みしか与えずに、G105によって容易に調整されうる。

10

【0150】

CD80またはCD86を発現するCHO細胞への高結合力変異体の結合

20

安定にトランスフェクトされたCD80+およびCD86+CHO細胞へのCTLA4Igおよび変異分子結合のFACS解析(図27)を本明細書に記載するようにして行った。CD80陽性およびCD86陽性CHO細胞を様々な濃度のCTLA4Ig、L104EA29YIgまたはL104EIgと共にインキュベートした後、洗浄した。結合した免疫グロブリン融合タンパク質をフルオレセインイソチオシアネート結合ヤギ抗ヒト免疫グロブリンを使用して検出した。

【0151】

図27に示すように、CD80陽性またはCD86陽性CHO細胞(1.5×10^5 個)を、表示した濃度のCTLA4Ig(黒四角)、L104EA29YIg(丸)またはL104EIg(三角)と共に23で2時間インキュベートし、洗浄し、フルオレセインイソチオシアネート結合ヤギ抗ヒト免疫グロブリン抗体と共にインキュベートした。合計5,000個の生細胞への結合をFACSscanで解析し(単回測定)、PC-LYSY Sを使ってデータヒストグラムから平均蛍光強度(MFI)を測定した。第2段階試薬のみと共にインキュベートした細胞で測定されたバックグラウンド蛍光(MFI=7)に対して、データを補正した。対照L6モノクローナル抗体($80 \mu\text{g/ml}$)はMFI<30を示した。これらは4回の独立した実験の結果である。

30

【0152】

ヒトCD80トランスフェクトCHO細胞に対するL104EA29YIg、L104EIgおよびCTLA4Igの結合はほぼ同等である(図27A)。L104EA29YIgおよびL104EIgはヒトCD86を安定にトランスフェクトしたCHO細胞に対して、CTLA4Igよりも強く結合する(図27B)。

40

【0153】

機能アッセイ

ヒトCD4陽性T細胞を免疫磁気ネガティブ選択法によって単離した(Linsleyら(1992)J. Exp. Med. 176:1595-1604)。単離したCD4陽性T細胞を、滴定濃度の阻害剤の存在下にホルバール(phorbol)ミリステートアセテート(PMA)およびCD80陽性またはCD86陽性CHO細胞で刺激した。CD4陽性T細胞($8-10 \times 10^4$ 個/ウエル)を1nM PMAの存在下で、照射CHO細胞刺激因子と共にまたは同刺激因子なしで培養した。72時間培養の最後の7時間にわたって $1 \mu\text{Ci}$ /ウエルの[3H]チミジンを添加することにより、増殖応答を測定した

50

。PMA + CD80陽性CHOまたはCD86陽性CHO刺激T細胞に対するL104EA29YIgおよびCTLA4Igによる阻害を行った。結果を図28に示す。L104EA29YIgはCD80陽性PMA処理CHO細胞の増殖をCTLA4Igよりも強く阻害した(図28A)。L104EA29YIgはCD86陽性PMA処理CHO細胞の増殖の阻害にも、CTLA4Igより有効だった(図28B)。従って、L104EA29YIgは、T細胞のCD80媒介性共刺激およびCD86媒介性共刺激のどちらについても、より強力な阻害剤である。

【0154】

図29は、上で調製したアロ刺激ヒトT細胞をCD80およびCD86を発現するPMと呼ばれるヒトBリンパ芽球腫細胞株(LCL)でさらにアロ刺激し、その細胞のL104EA29YIgおよびCTLA4Igによる阻害を示している(3.0 × 10⁴個/ウエルのT細胞および8.0 × 10³個/ウエルのPM)。一次アロ刺激を6日間行った後、細胞に³H-チミジンを7時間パルスし、次いで放射ラベルの取込みを測定した。

10

【0155】

二次アロ刺激は以下のようにして行った。7日間一次アロ刺激したT細胞をリンパ球分離培地(LSM)(ICN(オハイオ州オーロラ))上に収集し、24時間休止させた。次に、滴定量のCTLA4IgまたはL104EA29YIgの存在下、上と同じ比率のPMを加えることにより、T細胞を再び(二次)刺激した。3日間刺激した後、細胞に放射標識をパルスし、上記のようにして収獲した。一次アロ刺激T細胞に対するL104EA29YIgの効果を図29Aに示す。二次アロ刺激T細胞に対するL104EA29YIgの効果を図29Bに示す。L104EA29YIgは一次、二次共にT細胞増殖応答をCTLA4Igよりも強く阻害する。

20

【0156】

サイトカイン産生(図30)を測定するために、一对の二次アロ刺激平板を用意した。3日後にELISAキット(Biosource(カリフォルニア州カマリロ))を使用し製造者の推奨する条件で培養培地をアッセイした。L104EA29YIgは、二次アロ刺激後のT細胞のIL-2、IL-4およびIFNγサイトカイン産生の遮断に関して、CTLA4Igよりも強力であることがわかった(図30A-C)。

【0157】

サル混合リンパ球反応(MLR)に対するL104EA29YIgおよびCTLA4Igの効果を図31に示す。2匹のサルの末梢血単核細胞(PBMC;各サルから3.5 × 10⁴細胞/ウエル)をリンパ球分離培地(LSM)で精製し、2 μg/mlのフィトヘマグルチニン(PHA)と混合した。細胞を3日間刺激した後、放射標識を16時間パルスし、次いで収獲した。L104EA29YIgはサルT細胞増殖をCTLA4Igよりも強く阻害した。

30

【0158】

平衡定数および見かけの速度定数を以下の表に示す(値は3回の異なる実験から得た平均 ± 標準偏差である)：

【表5】

第I表

40

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

10

20

【 0 1 5 9 】

以下に挙げる部位でのCTLA4Igの変異誘発によるCD86Ig結合に対する効果を上述のSPRによって決定した。主な効果を「+」記号で示す。

【表6】

第II表

30

変異 誘発部位	変異誘発の効果		
	明白な 効果なし	遅い「オン」速度/ 遅い「オフ」速度	リガンド 結合の減少
S25		+	
P26	+		
G27	+		
K28	+		
A29		+	
T30		+	
E31			+
R33			+
K93		+	
L96		+	
M97			+
Y98			+
P99			+
P100			+
P101			+
Y102			+
Y103		+	
L104		+	
G105		+	
I106	+		
G107	+		
Q111	+		
Y113	+		
I115	+		

10

20

30

40

50

【 0 1 6 0 】

実施例 3

可溶性 C T L A 4 変異分子 L 1 0 4 E A 2 9 Y I g (L E A 2 9 Y または L E A としても

知られる)またはCTLA4Igをヒト患者に投与し、関節腫脹、関節圧痛、炎症、朝のこわばり、および痛みの低下など、慢性関節リウマチに関連する少なくとも1つの症状を緩解させる第2相試験について、以下説明する。ここに使用するCTLA4Ig分子は図24に示すように、+1位のメチオニン(または-1位のアラニン)から始まって+357位のリジンで終わる。CTLA4Ig分子の1態様をコードするDNAはATCC68629として寄託されている。ここに使用するL104EA29YIg分子は図19に示すように、+1位のメチオニン(または-1位のアラニン)から始まって+357位のリジンで終わる。L104EA29YIg分子の1態様をコードするDNAはATCCPTA2104として寄託されている。

【0161】

さらに、以下の説明は、L104EA29YIgまたはCTLA4Igをヒト患者に投与し、赤血球凝集率、およびC反応性タンパク質および/またはIL-2受容体の血清レベルの低下など、慢性関節リウマチに関連する少なくとも1つの生物学的代替マーカーを緩解させる説明である。

【0162】

患者コホート

男性54名および女性160名の計214名の患者が本試験に参加した(図1A、1B)。基準線の患者は、平均疾患期間が3.4(±2.0)年であり、少なくとも1つの疾患改変性抗リウマチ薬(DMARD)を要求している。安定な非ステロイド抗炎症薬(NSAIDs)またはステロイド(<10mg/日)の投薬は許し、DMARDの併用は禁じた。患者を処置群ごとに25-32名の群に無作為に振り分けた。32名の患者にはプラセボを、92名の患者にはL104EA29YIgを、90名の患者にはCTLA4Igを投与した。以下のプロトコールガイドラインに従い57日まで中止しなかった患者には、1、15、29および57日目の計4回静脈注射した。すべての患者を1、15、29、43、57、71および85日目に評価した。投与量はL104EA29YIgについて0.5、2.0または10.0mg/kg(図1A-1EにおいてそれぞれLEA.5、LEA2およびLEA10と表示)またはCTLA4Igについて0.5、2.0または10.0mg/kg(図1A-1EにおいてそれぞれCTLA.5、CTLA2およびCTLA10と表示)であった。

【0163】

すべての対象について、可能性ある有害事象をリストした問診表に答えてもらうことにより注射周囲の有害事象と安全度全体をモニターした。注射後24時間以内に起こり得る可能性ある有害事象について患者に質問した。さらに、患者には経験した有害事象を自発的に報告するよう奨励した。医師は、患者からの研究試料について血液化学および血液学の異常を規定通りにモニター、例えばサイトカイン(TNF、IL-6)、トリプターゼおよび補体などの炎症応答メディエーターのレベルを評価した。最初の終了点は、85日目におけるACR20に適合した被験者の割合であった。

【0164】

試験材料の保存

CTLA4IgおよびL104EA29YIgはそれぞれ、CTLA4Ig200mg/バイアル、またはL104EA29YIg100mg/バイアル、を含む単一使用ガラスバイアルとして供給した。注射の前に、CTLA4IgおよびL104EA29YIgを注射用滅菌水(SWFI)で終濃度25mg/mlにまで希釈した。

【0165】

投与プロトコール

すべての注射は1時間の静脈内投与で行った(図1-17)。すべての対象には試験治療の注射を少なくとも1回行った。

- 1群: 32名の患者、CTLA4IgまたはL104EA29YIg適合プラセボ;
- 2群: 26名の患者、CTLA4Ig0.5mg/kg用量;
- 3群: 32名の患者、CTLA4Ig2.0mg/kg用量;

10

20

30

40

50

- 4群： 32名の患者、CTLA4Ig10.0mg/kg用量；
 5群： 32名の患者、L104EA29YIg0.5mg/kg用量；
 6群： 29名の患者、L104EA29YIg2.0mg/kg用量；
 7群： 31名の患者、L104EA29YIg10.0mg/kg用量。

【0166】

臨床モニターリング

注射投与前に、疾患活動度の基準症状について患者を評価した。この基準評価には、関節腫脹、関節圧痛、炎症、朝のこわばり、患者および医師により評価される疾患活動度、および健康問診表により評価される能力障害（図1Cにおける身体機能スコアとして報告される）、ならびに痛み（図1A-1D）が含まれた。さらに、基準評価には、赤血球凝集率（ESR）、およびC反応性タンパク質（CRP）および/または可溶性IL-2受容体（IL-2r）の血清レベル（図1Cおよび1D）が含まれた。

10

【0167】

臨床応答試験はアメリカン カレッジ オブ リューマトロジ（ACR）により確立された基準を基本とした。圧痛および腫脹関節カウントが20%改善し、患者および医師の疾患変化全体、痛み、能力障害および急性期反応体などの、測定される残りの症状の5つのうち3つにおいて20%改善が認められれば、その対象はACR20基準を満足している（Felson, D.T., et al., 1993 Arthritis and Rheumatism 36:729-740; Felson, D.T., et al., 1995 Arthritis and Rheumatism 38:1-9）。

20

【0168】

生物マーカー

疾患活動度の可能性ある生物マーカー（リウマチ因子、CRP、ESR、IL-2r、可溶性ICAM-1、可溶性E-セレクトインおよびMMP-3）も評価した。有効なエンザイムイムノアッセイ（EIA）法を使用し、IL-2sR、sICAM-1、sE-セレクトインおよびMMP-3の血清濃度を測定した。TNF およびIL-6は要すれば、注射前と注射後2時間に評価した。

【0169】

IL-2sR、sICAM-1およびsE-セレクトインは、R & D Systems, Inc.（ミネアポリス, MN）から市販されている比色EIAキットを用いて測定した。定量の下限および上限はそれぞれ、312-20,000pg/ml、40-907ng/mlおよび10-206ng/mlであった。検定間変動係数はそれぞれ、4.48-8.4%、3.8-5.0%および5.5-9.0%であった。キット製造元の説明によると、正常血清値はそれぞれ676-2,132pg/mlであった。

30

【0170】

MMP-3はAmersham Pharmacia Biotech（ピスパッタウエイ, NJ）から市販されている比色EIAキットを用いて測定した。定量の下限および上限は30-7,680ng/mlであった。検定間変動係数は6.3-10.6%であった。キット製造元の説明によると、正常血清値は28-99ng/mlであった。

【0171】

IL-6およびTNFは、R & D Systems, Inc.（ミネアポリス, MN）から市販されている比色EIAキットを用いて測定した。定量の下限および上限はそれぞれ、0.3-3,000pg/mlおよび0.7-7,000pg/mlであった。検定間変動係数はそれぞれ、3.1-5.7%および6.4-20.7%であった。キット製造元の説明によると、正常血清値は<0.3-12pg/mlおよび<0.7-7.5pg/mlであった。

40

【0172】

抗体試験

1日目の投与前、および15、29、57、85および169日目に血清試料を入手し、薬物特異的な抗体を評価した。投与分子の免疫グロブリン（Ig）部分に対する事前の高

50

い力価のため、I g 定常領域を含まない L E A 2 9 Y および C T L A 4 I g に対する特異的抗体の形成も評価した。

【0173】

96 ウェルイムロン I I E L I S A 平板 (D y n e x , C h a n t i l l y , パージニア) を C T L A 4 I g 、 I g 定常領域を含まない C T L A 4 I g 、 L E A 2 9 Y または I g 定常領域を含まない L E A 2 9 Y のそれぞれリン酸緩衝食塩水 (P B S) 中 2 、 4 、 2 または 1 μ g / m l で被覆し、2 - 8 にて一晩インキュベートした。得られた平板を、0.05% T w e e n 2 0 を含有する P B S で洗浄し、1% ウシ血清アルブミン (B S A) を含む P B S で 3 7 にて1時間ブロッキングした。次いで、平板を洗浄し、試験血清の連続希釈液または品質維持 (Q C) 血清を適当なウェルに加え、3 7 にて2時間インキュベートした。血清は、0.25% B S A および 0.05% T w e e n 2 0 を 1 : 1 0 希釈率で含む P B S で3倍に希釈した。平板を洗浄し、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗 - ヒトカップおよびラムダ (S o u t h e r n B i o t e c h n o l o g y A s s o c i a t e s , I n c . , パーミングハム , アラバマ) 抗体カクテルを加えた。3 7 にて1時間インキュベートした後、平板を洗浄し、ジエタノールアミン緩衝液中、1 m g / m l パラ - ニトロフェニル ホスフェートを各ウェルに加えた。2 5 にて30分経過後、3 N 水酸化ナトリウムで反応を停止させ、吸光度を記録した (二波長 : 4 0 5 n m および 5 5 0 n m) 。結果は、平板バックグランド吸光度の平均よりも5倍高いまたは同等の吸光度読み値を与える最高希釈率の逆数として規定される、終点力価 (E P T) で表した。平板バックグランドは、血清不存在下において記録される吸光度測定値として測定した。値は、投与前の E P T 値と比較して少なくとも2連続希釈率 (9 倍) またはそれよりも大きい場合、血清転換について陽性と判断した。C T L A 4 I g - または L E A 2 9 Y のいずれかに特異的な抗体について陽性である血清 Q C 試料は、免疫したサルから調製した。適当な Q C 試料を各分析期間に検定した。Q C 試料が検定の許容基準内にある場合のみ、分析を行った。

10

20

【0174】

C T L A 4 I g および L 1 0 4 E A 2 9 Y I g は一般に、すべての投与量において十分に寛容性であった。注射周囲の有害事象はすべての投与群にわたり、頭痛を除き、類似していた。85日目における患者の頭痛応答は 0.5、2.0 および 10.0 m g / k g において用量依存的にそれぞれ、C T L A 4 I g 処置患者では 23%、44% および 53% と増大し、L 1 0 4 E A 2 9 Y I g 処置患者では 34%、45% および 61% と増大した。対照的に、プラセボを投与した患者では 31% が頭痛を経験した。

30

【0175】

関節炎発赤や他の有害事象のために臨床試験を中断した患者のパーセンテージは図2に要約している。プラセボ投与患者はより高いパーセンテージで関節炎発赤により処置を中断した。C T L A 4 I g 処置患者は投与量の増大に伴い処置の中断率が減少した。L 1 0 4 E A 2 9 Y I g で処置した患者は僅かな患者しか処置を中断しなかった。これらの結果は、C T L A 4 I g に対する用量依存的な逆の応答が良好であり、L 1 0 4 E A 2 9 Y I g 治療ではより強力な治療応答であることを示している。

40

【0176】

C T L A 4 I g 、 L 1 0 4 E A 2 9 Y I g またはプラセボで処置した患者の85日目における A C R - 2 0 、 - 5 0 および - 7 0 応答を図3Aにまとめている。同様に、図3BおよびCは95%信頼区間をもった A C R - 2 0 応答を説明している。これらの応答は明らかに用量依存的であり、10 m g / 患者 k g 体重において明確な有意な応答性を示している。

【0177】

C T L A 4 I g 、 L 1 0 4 E A 2 9 Y I g またはプラセボでの処置に対して応答しない患者と比較し腫脹および圧痛関節カウントが減少している患者パーセンテージを図4AおよびBに示す。治療応答は用量依存的であった。両化合物ともに2および10 m g / k g 群においては、パーセンテージが大きな患者は 20、50、70 および 100% の改善を示

50

している。

【0178】

患者および医師により評価される疾患活動度の平均スコア単位である痛みがCTLA4 Ig、L104EA29Y Igまたはプラセボにより減少した患者のパーセンテージを図5 A、B、CおよびDに示す。リカートスケール(Likertスケール)によりモニターした治療応答は明らかに用量依存的であり、85日目においてプラセボと比較して活動処置群のほうが良好であった。リカートスケールは、症状を分類するための形容詞を使用した、確立されている言語による評価スケールである(The American College of Rheumatology Core Set of Disease Activity Measures for Rheumatoid Arthritis Clinical Trials: Arthritis and Rheumatism 6月1993, 36(6):729-740)。

10

【0179】

CTLA4 Ig、L104EA29Y Igまたはプラセボによる処置により、少なくとも2単位が基準線と変化した疾患活動度の患者および医師評価を図6 AおよびBに示す。応答は明らかに用量依存的であり、有効薬物が高用量なほどより顕著に改善を示す。

【0180】

CTLA4 Ig、L104EA29Y Igまたはプラセボで処置した患者におけるC反応性タンパク質(CRP)レベルの減少%を図7 AおよびBに示す。応答は明らかに用量依存的であり、2および10 mg/kg薬物処置群において明りょうな減少をみた。さらに、図7 Bは、その相違がプラセボと比較して95%信頼区間をもって極めて有意であることを示した。図7 Cは85日目における基準線からの血清レベルの変化を示している。

20

【0181】

CTLA4 Ig、L104EA29Y Igまたはプラセボで処置した患者における血清可溶性IL-2受容体の量を図8に示す。可溶性IL-2受容体レベルの減少は明らかに用量依存的である。

【0182】

CTLA4 Ig、L104EA29Y Igまたはプラセボで処置した患者における血清可溶性ICAM-1および可溶性E-セレクトインの量を図33に示す。可溶性ICAM-1および可溶性E-セレクトインレベルの減少は明らかに用量依存的である。

30

【0183】

CTLA4 Igまたはプラセボで処置した患者における経時的な圧痛関節カウントの中央値および平均値を図9 AおよびBに示す。基準線からの差異(例えば圧痛関節の減少)は明らかに、プラセボまたは0.5 mg/kg群よりも2および10 mg/kg処置群において重要である。

【0184】

CTLA4 Igまたはプラセボで処置した患者における経時的な腫脹関節カウントの中央値および平均値を図10 AおよびBに示す。基準線からの差異(例えば腫脹関節の減少)は明らかに、プラセボまたは0.5 mg/kg群よりも2および10 mg/kg処置群において重要である。

40

【0185】

CTLA4 Igまたはプラセボで処置した患者における経時的な痛み評価スコアの平均値を図11に示す。基準線からの差異(例えば痛みの減少)は明らかに、プラセボまたは0.5 mg/kg群よりも2および10 mg/kg処置群において重要である。

【0186】

CTLA4 Igまたはプラセボで処置した患者における疾患活動度の患者または医師評価スコアの平均値を図12 AおよびBに示す。基準線からの差異(例えば疾患活動度の減少)は明らかに、プラセボまたは0.5 mg/kg群よりも2および10 mg/kg処置群において重要である。

【0187】

50

L 1 0 4 E A 2 9 Y I g (図では L E A と表示) またはプラセボで処置した患者における経時的な圧痛関節カウントの中央値および平均値を図 1 3 A および B に示す。基準線からの差異(例えば圧痛関節の減少)は明らかに用量依存的である。

【0188】

L 1 0 4 E A 2 9 Y I g (図では L E A と表示) またはプラセボで処置した患者における経時的な腫脹関節カウントの中央値および平均値を図 1 4 A および B に示す。基準線からの差異(例えば腫脹関節の減少)は明らかに、プラセボまたは 0.5 mg/kg 群よりも 2 および 10 mg/kg 処置群において重要である。

【0189】

L 1 0 4 E A 2 9 Y I g (図では L E A と表示) またはプラセボで処置した患者における経時的な痛み評価スコアの平均値を図 1 5 に示す。基準線からの差異(例えば痛みの減少)は明らかに、用量依存的である。 10

【0190】

L 1 0 4 E A 2 9 Y I g (図では L E A と表示) またはプラセボで処置した患者における疾患活動度の患者または医師評価スコアの平均値を図 1 6 A および B に示す。基準線からの差異(例えば疾患活動度の減少)は明らかに、用量依存的である。

【0191】

C T L A 4 I g、L 1 0 4 E A 2 9 Y I g またはプラセボにより処置した患者における 8 5 日目の、H A Q により評価した身体障害における改善パーセンテージを図 1 7 に示す(健康評価問診表(the Health Assessment Questionnaire) (H A Q); F r i e s, J. F. e t a l., 1 9 8 2, J. o f R h e u m a t o l o g y 9: 7 8 9 - 7 9 3)。このパラメータにより、明らかな用量依存的な完全が認められる。 20

【0192】

可溶性 I L - 2 r および C 反応性タンパク質レベルの基準線からの変化は両処置群ともに用量依存的であった。処置後、可溶性 I L - 2 r レベルは 0.5、2.0 および 10.0 mg/kg において、C T L A 4 I g について - 2%、- 10% および - 22% であり、L 1 0 4 E A 2 9 Y I g について - 4%、- 18% および - 32% であり、これに対しプラセボは + 3% であった。C 反応性タンパク質レベルは 0.5、2.0 および 10.0 mg/kg において、C T L A 4 I g について + 12%、- 15% および - 32% であり、L 1 0 4 E A 2 9 Y I g について + 47%、- 33% および - 47% であり、これに対しプラセボは + 20% であった(図 7 A)。 30

【0193】

通常 of 血液学的試験、化学研究試験、医師知見または生命徴候評価などの臨床的に顕著な知見は、高用量の両薬物における I g A および I g G レベルの若干の抑制を除き、何ら見出されなかった。いずれの治療も薬物特異的な抗体を誘導しなかったことは注目に値する。

【0194】

実施例 4

L 1 0 4 E A 2 9 Y I g をヒト患者に投与し、骨または関節侵食などの構造的障害を低下または予防するための第 2 相試験を、信頼のおける放射線撮影スケールを用いて以下説明する。構造的障害の低下または予防の改善は臨床パラメータにより測定される臨床改善度に匹敵する。 40

【0195】

C T L A 4 I g または L 1 0 4 E A 2 9 Y I g を処置する前に、幾人かのヒト患者の骨構造の状態をモニターする。これらの患者には、C T L A 4 I g または L 1 0 4 E A 2 9 Y I g を 0.5 - 20 mg/kg で 2 週または 1 2 週毎に長期にわたり投与し(単独または他の薬物と共に)、治療改善度を経時的に維持させる。患者の手足の放射線撮影を、F D A ガイドラインが推奨する前もって決めた間隔、6 ヶ月および次いで毎年、行う。6 および 1 2 ヶ月後に長期モニターを行い、C T L A 4 I g または L 1 0 4 E A 2 9 Y I g によ 50

る処置が骨悪化の進行を低下させているかを決定し、次いで毎年行う。放射線撮影は当業界の標準的手法に従い、X線および/または磁気共鳴画像法(MRI)などによって行い患者をモニターする(Larsen, A. K. および M. Eek 1977 Acta. Radiol. Diag. 18: 481-491; Sharp, J. T., et al., 1985 Arthritis and Rheumatism 28: 1326-1335)。放射線撮影データの結果は、関節空間の狭窄および/または新たな侵食の防止を伴って骨侵食および軟骨障害の進行を遅らせるなどの、構造的障害の予防について評価する。

【図面の簡単な説明】

【図1A】患者コホートの人口統計データである。人口統計データには後述の実施例3に記載している性別、種族および疾患期間が含まれる。 10

【図1B】患者コホートの人口統計データである。人口統計データには後述の実施例3に記載している性別、年齢、体重、および患者や医師によって評価された疾患活動度が含まれる。

【図1C】後述の実施例3に記載している患者コホートの人口統計データである。人口統計データには疾患活動度、赤血球凝集率(ESR)、身体機能(問診表によって評価された身体障害)、およびC反応性タンパク質(CRP)が含まれる。

【図1D】後述の実施例3に記載している患者コホートの人口統計データである。人口統計データには関節腫脹、関節圧痛、朝のこわばり、および痛みが含まれる。

【図1E】後述の実施例3に記載している患者コホートの人口統計データである。人口統計データには処置前が含まれる。 20

【図2】後述の実施例3に記載している理由によって85日目に中断した概要である。

【図3A】後述の実施例3に記載している85日目のACR応答である：ACR-20、-50および-70応答。

【図3B】後述の実施例3に記載している、プラセボ応答を含む85日目のACR-20応答である：95%信頼限界のACR-20応答。

【図3C】後述の実施例3に記載している85日目のACR-20応答である：ACR-20応答における95%信頼区間の差異。

【図4A】後述の実施例3に記載している85日目における関節腫脹および圧痛カウントの基本(20%改善)臨床応答の患者パーセンテージ：基本臨床応答、ACR-20。 30

【図4B】後述の実施例3に記載している85日目における関節腫脹および圧痛カウントの臨床応答の患者パーセンテージ(改善パーセンテージ)：改善パーセンテージの臨床応答の変化。

【図5A】後述の実施例3に記載している85日目における痛み応答の患者パーセンテージ(基準線からの平均単位変化によるリッカートスケール(Likert scale)に基づく)：基準線からの痛みスケール変化。

【図5B】後述の実施例3に記載している85日目における患者の全体疾患変化の患者パーセンテージ(基準線からの平均単位変化によるリッカートスケールに基づく)：患者全体疾患活動度変化。

【図5C】後述の実施例3に記載している85日目における医師の全体疾患変化の患者パーセンテージ(基準線からの平均単位変化によるリッカートスケールに基づく)：医師全体疾患活動度変化。 40

【図5D】後述の実施例3に記載している85日目における痛みの患者パーセンテージ(基準線からの平均単位変化によるリッカートスケールに基づく)：基準線からの痛み変化。

【図6A】後述の実施例3に記載している85日目における基準線からの2単位範囲の疾患活動度の変化の患者の全体評価：疾患活動度の改善。

【図6B】後述の実施例3に記載している85日目における基準線からの2単位範囲の疾患活動度の変化の医師の全体評価：疾患活動度の改善。

【図7A】後述の実施例3に記載している85日目におけるC反応性タンパク質(CRP) 50

) レベルの減少パーセンテージ：基準線からのCRPレベルの減少パーセンテージ。

【図7B】後述の実施例3に記載している85日目におけるC反応性タンパク質(CRP)レベルの減少の差異：95%信頼区間をもつCRPレベルの減少パーセンテージの差異

。

【図7C】後述の実施例3に記載している85日目におけるC反応性タンパク質(CRP)レベルの減少の平均：基準線からの平均変化。

【図8】後述の実施例3に記載している85日目における可溶性IL-2受容体レベルの基準線からの平均変化の減少。

【図9A】後述の実施例3に記載している、関節圧痛に対するCTLA4Igの経時的効果：基準線からの差異の中央値。

10

【図9B】後述の実施例3に記載している、関節圧痛に対するCTLA4Igの経時的効果：基準線からの差異の中央値。

【図10A】後述の実施例3に記載している、関節腫脹に対するCTLA4Igの経時的効果：基準線からの差異の中央値。

【図10B】後述の実施例3に記載している、関節腫脹に対するCTLA4Igの経時的効果：基準線からの差異の平均。

【図11】後述の実施例3に記載している、基準線からの痛み評価平均差異に対するCTLA4Igの経時的効果。

【図12A】後述の実施例3に記載している、基準線からの疾患活動度平均差異の患者評価に対するCTLA4Igの経時的効果。

20

【図12B】後述の実施例3に記載している、基準線からの疾患活動度平均差異の医師評価に対するCTLA4Igの経時的効果。

【図13A】後述の実施例3に記載している、関節圧痛に対するL104EA29YIgの経時的効果：基準線からの差異の中央値。

【図13B】後述の実施例3に記載している、関節圧痛に対するL104EA29YIgの経時的効果：基準線からの差異の中央値。

【図14A】後述の実施例3に記載している、関節腫脹に対するL104EA29YIgの経時的効果：基準線からの差異の中央値。

【図14B】後述の実施例3に記載している、関節腫脹に対するL104EA29YIgの経時的効果：基準線からの差異の平均。

30

【図15】後述の実施例3に記載している、痛み評価に対するL104EA29YIgの経時的効果：基準線からの経時的平均変化。

【図16A】後述の実施例3に記載している、基準線からの疾患活動度平均差異の患者評価に対するL104EA29YIgの経時的効果。

【図16B】後述の実施例3に記載している、基準線からの疾患活動度平均差異の医師評価に対するL104EA29YIgの経時的効果。

【図17】後述の実施例3に記載しているCTLA4IgおよびL104EA29YIg処置による85日目における基準線と比較した、健康評価問診表(HAQ)により評価した患者の身体障害における改善パーセンテージ。

【図18】後述の実施例1に記載しているL104EIgのヌクレオチドおよびアミノ酸配列。

40

【図19】後述の実施例1に記載しているL104EA29YIgのヌクレオチドおよびアミノ酸配列。

【図20】後述の実施例1に記載しているL104EA29LIgのヌクレオチドおよびアミノ酸配列。

【図21】後述の実施例1に記載しているL104EA29TIgのヌクレオチドおよびアミノ酸配列。

【図22】後述の実施例1に記載しているL104EA29WIGのヌクレオチドおよびアミノ酸配列。

【図23】CTLA4受容体のヌクレオチドおよびアミノ酸配列。

50

【図24】CTLA4 Igのヌクレオチドおよびアミノ酸配列。

【図25】CTLA4 Ig (レーン1)、L104E Ig (レーン2)、およびL104EA29Y Ig (レーン3A)のSDSゲル(図25A)、ならびにCTLA4 Ig (図25B)およびL104EA29Y Ig (図25C)のサイズ排除クロマトグラフィー。

【図26】左図および右図： NMRスペクトロスコピーによって測定された解析像から得られた、CTLA4細胞外Ig V様折り畳みのリボンダイアグラム。図26の右図はCDR-1 (S25-R33領域)およびMYPPPY領域の拡大図であり、結合力を増大する変異L104およびA29の位置と側鎖配向性を示している。

【図27】AおよびB： 後述の実施例2に記載している、ヒトCD80 - またはCD-86トランスフェクトCHO細胞に対するL104EA29Y Ig、L104E IgおよびCTLA4 Igの結合を示すFACSアッセイ。 10

【図28】AおよびB： 後述の実施例2に記載している、ヒトCD80 - 陽性およびCD-86陽性CHO細胞の増殖阻害を示すグラフ。

【図29】AおよびB： 後述の実施例2に記載している、初代および二次アロ刺激T細胞の増殖阻害において、CTLA4 IgよりもL104EA29Y Igが効果的であることを示すグラフ。

【図30】A-C： 後述の実施例2に記載している、アロ刺激ヒトT細胞のIL-2 (図30A)、IL-4 (図30B)および - インターフェロン (図30C) サイトカイン産生阻害において、CTLA4 IgよりもL104EA29Y Igが効果的であることを示すグラフ。 20

【図31】後述の実施例2に記載している、フェトヘムアグルチニン (PHA) - 刺激サルT細胞の増殖阻害において、CTLA4 IgよりもL104EA29Y Igが効果的であることを示すグラフ。

【図32】L104EA29Y Ig、L104E Igおよび野生型CTLA4 IgのCD86 Igに対する平衡結合分析を示すグラフ。

【図33】AおよびB： 後述の実施例3に記載している85日目における基準線からの可溶性ICAM-1および可溶性E-セレクトリンレベルの減少。

人口統計-1-

【図 1 A】

	プラセボ N=32	CTLA.5 N=26	CTLA.2 N=32	CTLA.10 N=32	LEA.5 N=32	LEA.2 N=29	LEA.10 N=31	合計 N=214
性別								
男性	6 (19%)	4 (15%)	9 (28%)	10 (31%)	9 (28%)	9 (31%)	7 (23%)	54 (25%)
女性	26 (81%)	22 (85%)	23 (72%)	22 (69%)	23 (72%)	20 (69%)	24 (77%)	160 (75%)
種族								
白人	30 (94%)	23 (88%)	30 (94%)	30 (94%)	29 (91%)	25 (86%)	27 (87%)	194 (91%)
黒人	2 (6%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (3%)	3 (10%)	3 (10%)	2 (6%)	9 (4%)
その他	0 (0%)	3 (12%)	2 (6%)	1 (3%)	2 (6%)	1 (3%)	2 (6%)	11 (5%)
疾患期間								
<2年	12 (38%)	5 (19%)	8 (25%)	12 (38%)	10 (31%)	10 (34%)	11 (35%)	68 (32%)
2-5年	14 (44%)	11 (42%)	18 (56%)	13 (41%)	14 (44%)	14 (48%)	12 (39%)	96 (45%)
5-7年	6 (19%)	8 (31%)	6 (19%)	6 (19%)	5 (17%)	7 (23%)	7 (23%)	44 (21%)
>7年	0 (0%)	2 (8%)	0 (0%)	1 (3%)	2 (6%)	0 (0%)	1 (3%)	6 (3%)
疾患期間 (年)	N	32	26	32	32	29	31	214
Mean	Mean	3.2	4.2	3.3	3.4	3.7	3.1	3.4
Sd	Sd	2	2	1.7	2.1	2	1.8	2.2
Min	Min	0.3	0.2	0.4	0	0.7	0.4	0
Max	Max	7	7.5	6.8	7.3	7.6	7.1	7.6

FIG. 1A

人口統計-疾患-

【図 1 C】

	プラセボ N=32	CTLA.5 N=26	CTLA.2 N=32	CTLA.10 N=32	LEA.5 N=32	LEA.2 N=29	LEA.10 N=31	合計 N=214
疾患 活動度 (医師)	N	32	26	32	32	29	31	214
Mean	Mean	3.6	3.5	3.5	3.7	3.4	3.5	3.5
Sd	Sd	0.7	0.6	0.8	1	0.6	0.7	0.7
Min	Min	2	3	2	2	2	3	2
Max	Max	5	5	5	5	5	5	5
赤血球 濃集率 (ESR)	N	32	26	32	32	29	30	213
Mean	Mean	43.3	35.2	41.6	36.3	29.8	39.3	38.1
Sd	Sd	29.4	22.5	27.4	27.9	24.2	24.6	26.8
Min	Min	2	4	3	0	6	10	0
Max	Max	116	90	94	98	110	102	116
身体機能 (スコア)	N	32	26	31	32	29	31	213
Mean	Mean	16.8	15.5	16.2	17.1	15.3	16.1	16.2
Sd	Sd	5.4	4.2	5.5	5.7	3.7	3.8	4.8
Min	Min	8	8	8	8	8	9	8
Max	Max	32	23	26	28	24	26	32
C反応性 タンパク質 (CRP)	N	30	23	31	31	28	31	205
Mean	Mean	56.7	26.4	48	33.6	28.1	37.5	40.1
Sd	Sd	62.7	30.3	47.3	46	39.1	35.2	48.6
Min	Min	2	5	3	3	3	3	2
Max	Max	248	115	198	182	200	135	333

FIG. 1C

【図 1 B】

	プラセボ N=32	CTLA.5 N=26	CTLA.2 N=32	CTLA.10 N=32	LEA.5 N=32	LEA.2 N=29	LEA.10 N=31	合計 N=214
性別								
男性	6 (19%)	4 (15%)	9 (28%)	10 (31%)	9 (28%)	9 (31%)	7 (23%)	54 (25%)
女性	26 (81%)	22 (85%)	23 (72%)	22 (69%)	23 (72%)	20 (69%)	24 (77%)	160 (75%)
年齢	N	32	26	32	32	29	31	214
Mean	Mean	48.3	46.9	46.2	51.5	49.3	50.8	48.4
Sd	Sd	11.7	12.2	13.4	11.5	8.8	10.7	11.3
Min	Min	22	25	21	24	27	24	21
Max	Max	66	64	64	66	66	64	66
体重 (kg)	N	32	26	32	32	29	31	214
Mean	Mean	72.9	70.6	72.7	70	68.9	71.7	71
Sd	Sd	13.5	17.4	14.4	16.7	12.8	15.8	14.6
Min	Min	46.7	45	50	40.1	48	39.2	39.2
Max	Max	98.2	101.3	99	101.3	95	99	101.3
疾患 活動度 (患者)	N	32	26	32	32	29	31	215
Mean	Mean	3.6	3.6	3.7	3.6	3.5	3.6	3.6
Sd	Sd	0.9	0.9	0.9	0.9	0.8	0.7	0.8
Min	Min	2	2	2	2	2	2	2
Max	Max	5	5	5	5	5	5	5

FIG. 1B

【図 1 D】

	プラセボ N=32	CTLA.5 N=26	CTLA.2 N=32	CTLA.10 N=32	LEA.5 N=32	LEA.2 N=29	LEA.10 N=31	合計 N=214
関節 圧痛 (スコア)	N	32	26	32	32	29	31	214
Mean	Mean	32.1	32.5	32.1	29.4	30.7	30.6	30.4
Sd	Sd	14.8	14.8	15	14.6	12	13.3	12.9
Min	Min	12	14	11	12	12	12	11
Max	Max	63	64	68	68	63	59	68
関節 腫脹 (スコア)	N	32	26	32	32	29	31	214
Mean	Mean	23.9	18.6	26.9	22.7	22.6	19.9	21.9
Sd	Sd	10	6.3	11.4	12.7	7.6	8.9	10
Min	Min	10	10	10	10	10	10	10
Max	Max	51	33	53	58	40	44	58
痛み (スコア)	N	32	26	32	32	29	31	214
Mean	Mean	3.5	3.4	3.5	3.5	3.3	3.5	3.5
Sd	Sd	0.9	0.6	0.6	1	0.7	0.8	0.8
Min	Min	2	2	2	2	2	3	2
Max	Max	5	5	5	5	5	5	5
朝の こわばり (分)	N	31	26	32	31	29	30	211
Mean	Mean	156.6	211.5	145.2	149.5	160.3	147.5	160.5
Sd	Sd	121.5	370.6	102.1	148.7	152.3	258.3	198.1
Min	Min	30	0	5	35	0	15	0
Max	Max	600	1440	420	720	600	1440	1440

FIG. 1D

【 図 1 E 】

人口統計—処置前—

	プラセボ N=32	CTLA.5 N=26	CTLA.2 N=32	CTLA.10 N=32	LEA.5 N=32	LEA.2 N=29	LEA.10 N=31	合計 N=214
エタネルセプト	Yes 0 (0%)	Yes 0 (0%)	Yes 0 (0%)	Yes 0 (0%)	Yes 0 (0%)	Yes 0 (0%)	Yes 0 (0%)	Yes 0 (0%)
	No 32 (100%)	No 26 (100%)	No 32 (100%)	No 32 (100%)	No 32 (100%)	No 29 (100%)	No 31 (100%)	No 214 (100%)
メトトレキサート	Yes 23 (72%)	Yes 22 (85%)	Yes 26 (81%)	Yes 24 (75%)	Yes 24 (75%)	Yes 21 (72%)	Yes 28 (90%)	Yes 168 (79%)
	No 9 (28%)	No 4 (15%)	No 6 (19%)	No 8 (25%)	No 8 (25%)	No 8 (28%)	No 3 (10%)	No 46 (21%)
その他のDMARD	Yes 28 (86%)	Yes 23 (88%)	Yes 25 (78%)	Yes 26 (81%)	Yes 28 (86%)	Yes 24 (83%)	Yes 25 (81%)	Yes 179 (84%)
	No 4 (13%)	No 3 (12%)	No 7 (22%)	No 6 (19%)	No 4 (13%)	No 5 (17%)	No 6 (19%)	No 35 (16%)
C-ステロイド	Yes 31 (97%)	Yes 26 (100%)	Yes 29 (91%)	Yes 27 (84%)	Yes 27 (84%)	Yes 28 (97%)	Yes 24 (77%)	Yes 192 (90%)
	No 1 (3%)	No 0 (0%)	No 3 (9%)	No 5 (16%)	No 5 (16%)	No 1 (3%)	No 7 (23%)	No 22 (10%)
NSAIDs	Yes 27 (84%)	Yes 20 (77%)	Yes 30 (94%)	Yes 29 (91%)	Yes 26 (81%)	Yes 25 (86%)	Yes 25 (77%)	Yes 181 (85%)
	No 5 (16%)	No 6 (23%)	No 2 (6%)	No 3 (9%)	No 6 (19%)	No 4 (14%)	No 7 (23%)	No 33 (15%)
その他	Yes 30 (94%)	Yes 22 (85%)	Yes 29 (91%)	Yes 30 (94%)	Yes 31 (97%)	Yes 29 (100%)	Yes 29 (94%)	Yes 200 (95%)
	No 2 (6%)	No 4 (15%)	No 3 (9%)	No 2 (6%)	No 1 (3%)	No 0 (0%)	No 2 (6%)	No 14 (7%)

FIG. 1E

【 図 3 A 】

85日目のACR応答

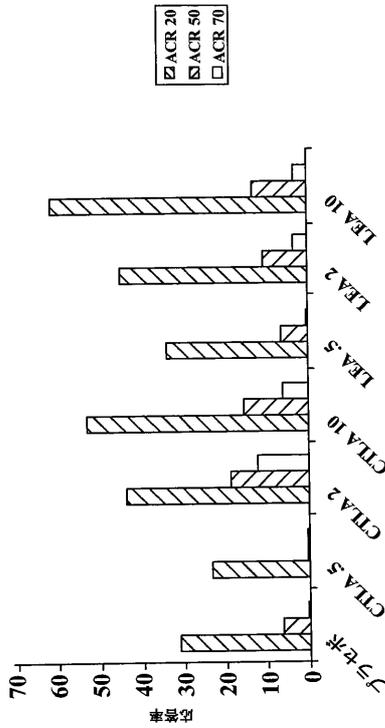


FIG. 3A

【 図 2 】

理由によって85日目またはそれ以前に中断した概要

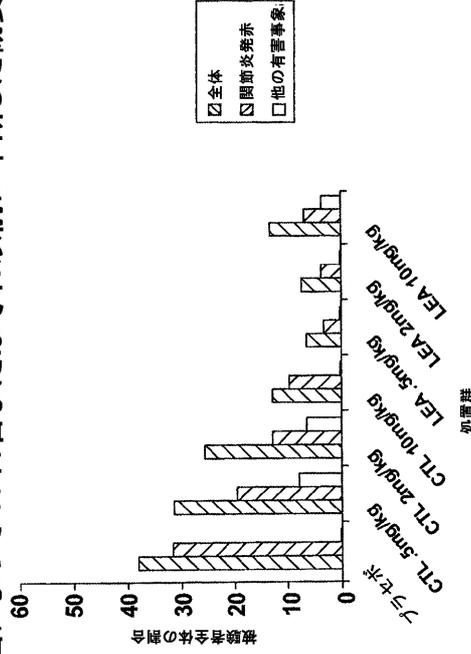


FIG. 2

【 図 3 B 】

95%信頼区間をもった85日目のACR—20応答

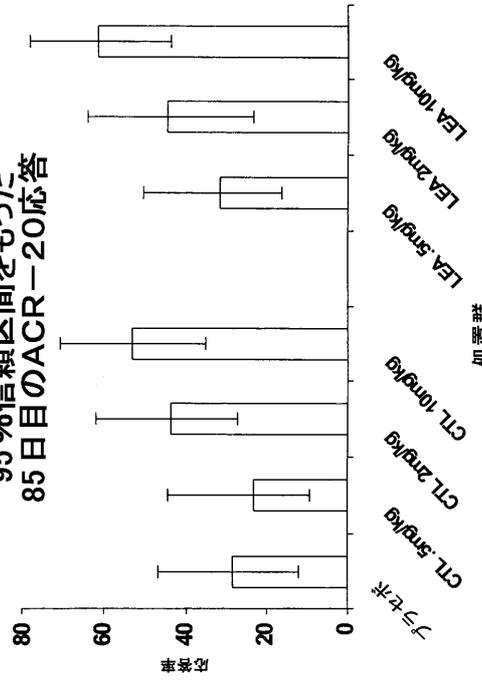
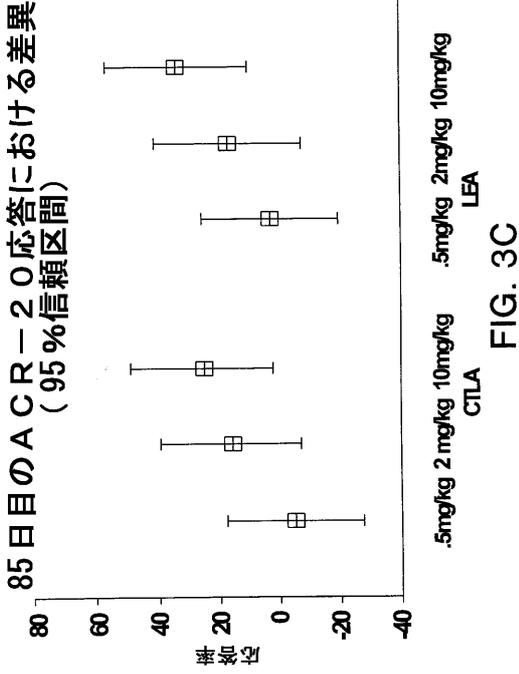


FIG. 3B

【 図 3 C 】



【 図 4 A 】

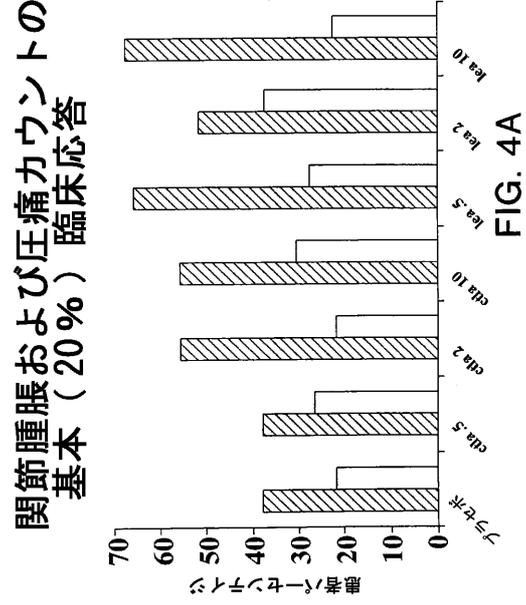


FIG. 4A

【 図 4 B 】

85日目における臨床応答

関節腫脹および圧痛カウントの腫床応答の改善パーセンテージの変化

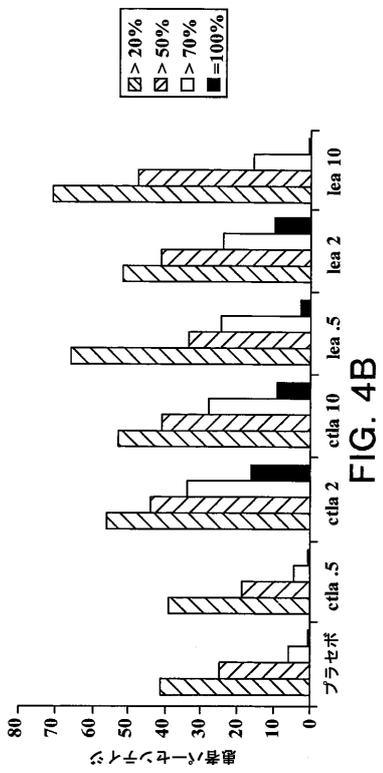


FIG. 4B

【 図 5 A 】

痛み

(リッカートスケール単位変化)

基準線からの痛みスコア変化

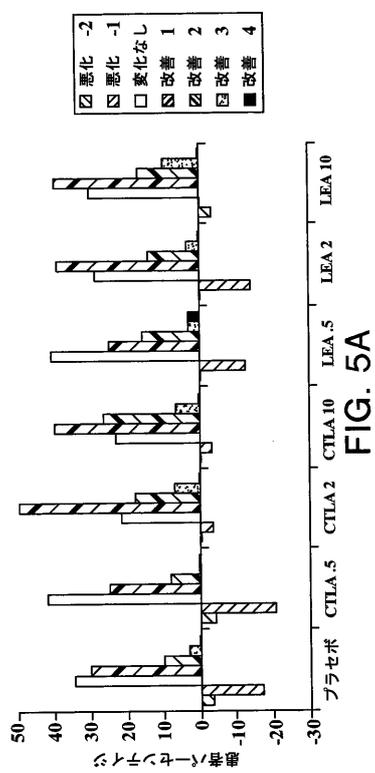
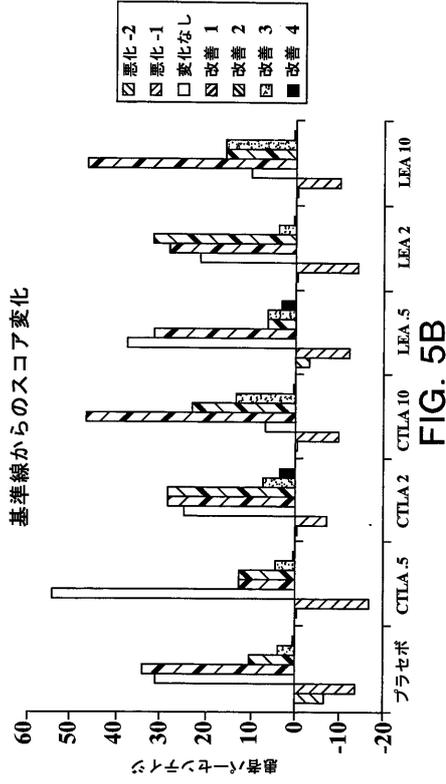


FIG. 5A

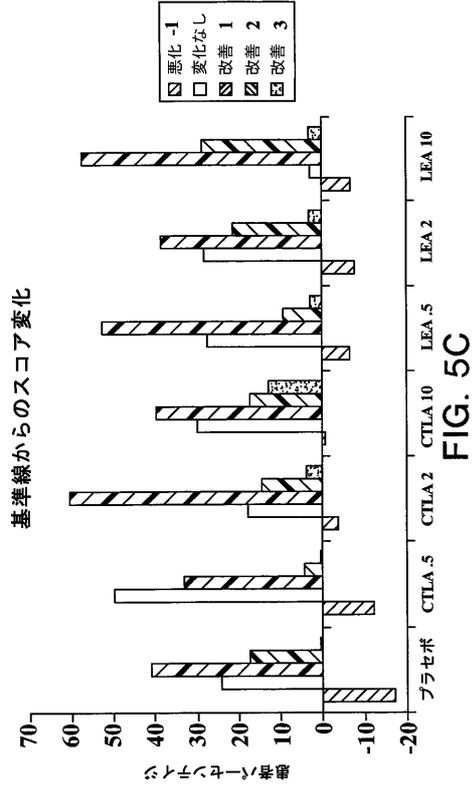
【 図 5 B 】

患者の全体疾患変化 (リッカートスケール単位変化)



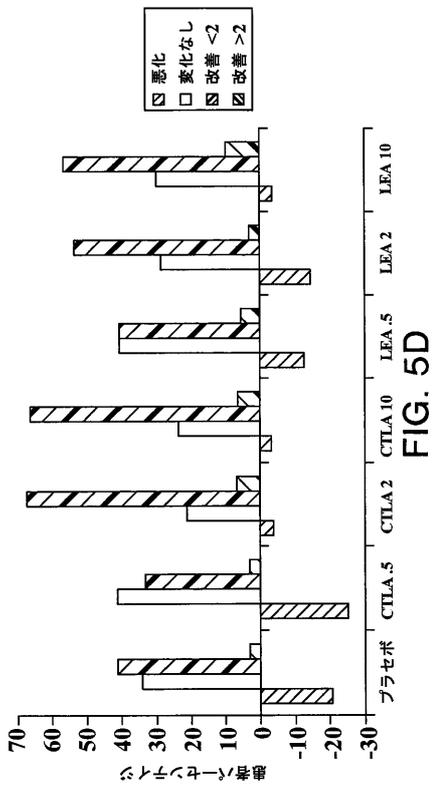
【 図 5 C 】

医師の全体疾患変化 (リッカートスケール単位変化)



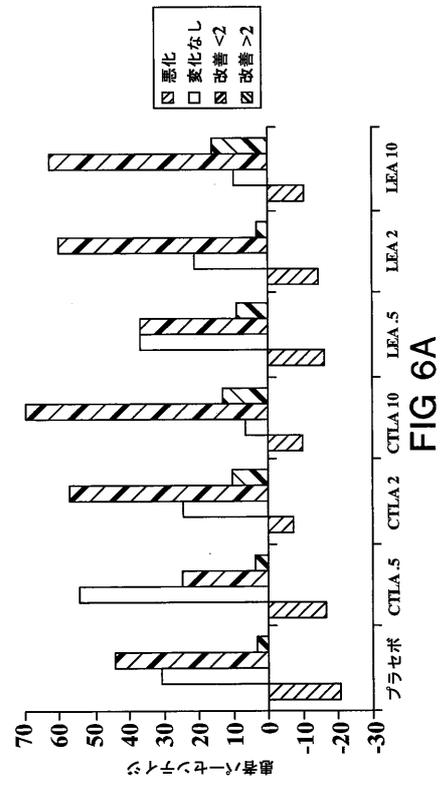
【 図 5 D 】

痛み —基準線からの変化—

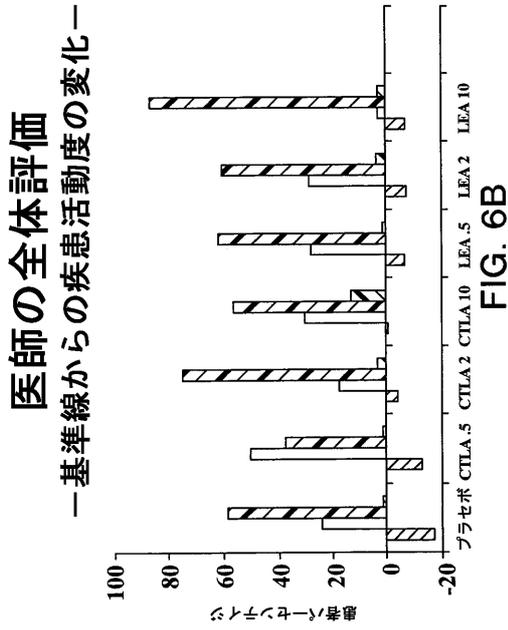


【 図 6 A 】

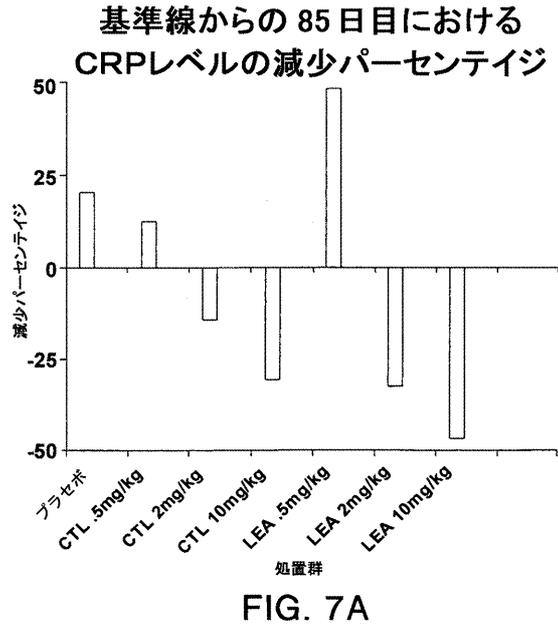
患者の全体評価 —基準線からの疾患活動度の変化—



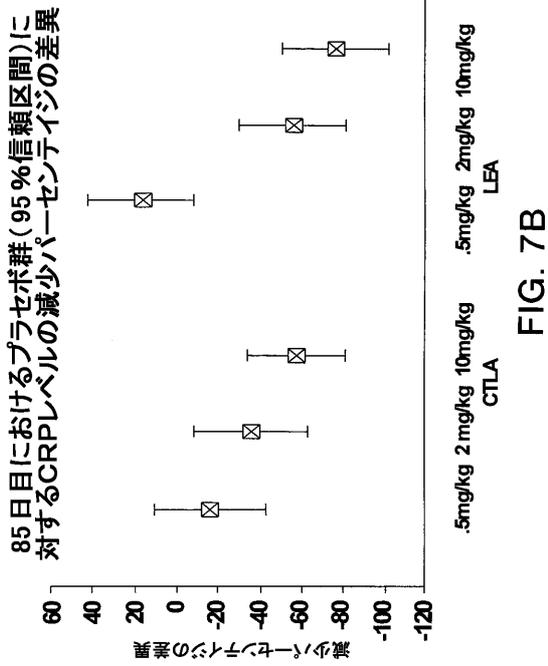
【 図 6 B 】



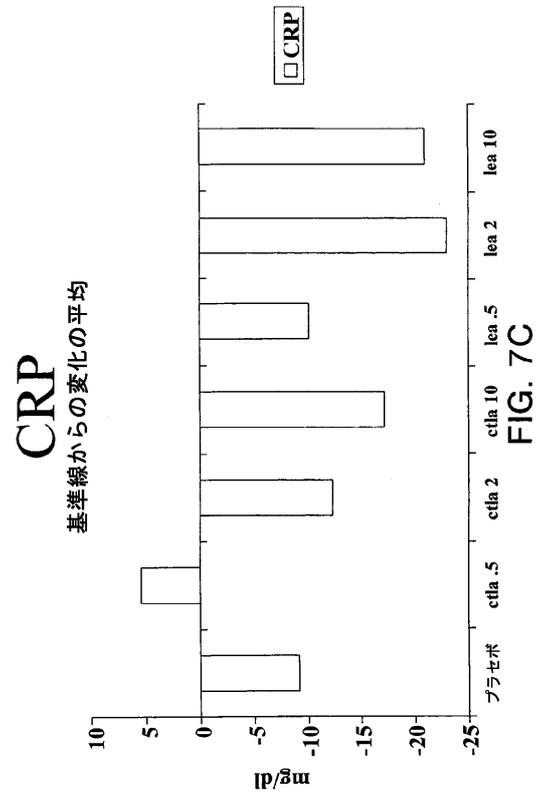
【 図 7 A 】



【 図 7 B 】



【 図 7 C 】



【 図 8 】

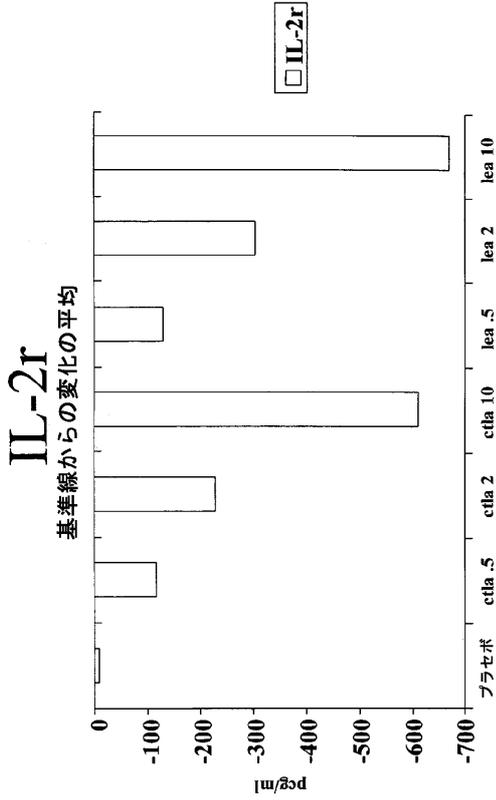


FIG. 8

【 図 9 A 】

CTLA 関節圧痛

—基準線からの差異の中央値—

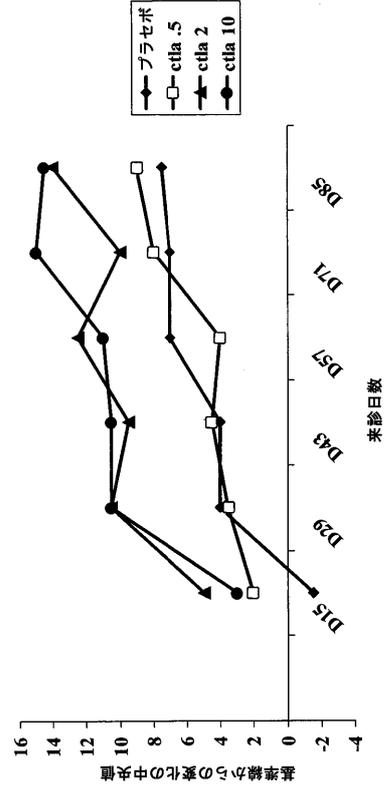


FIG. 9A

【 図 9 B 】

CTLA 関節圧痛

—基準線からの差異の平均—

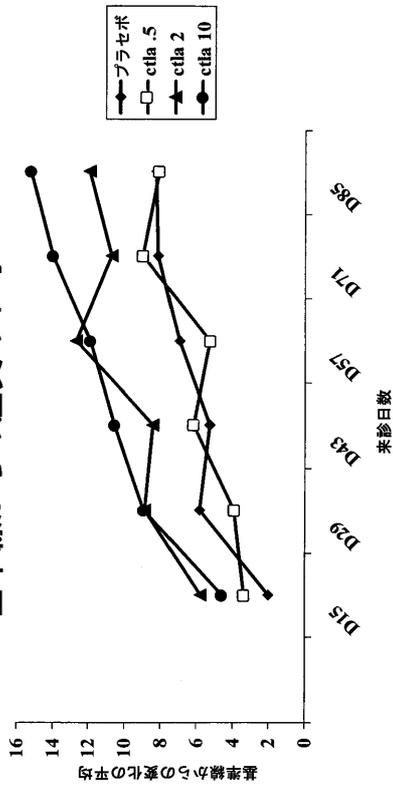


FIG. 9B

【 図 10 A 】

CTLA 関節腫脹

—基準線からの差異の中央値—

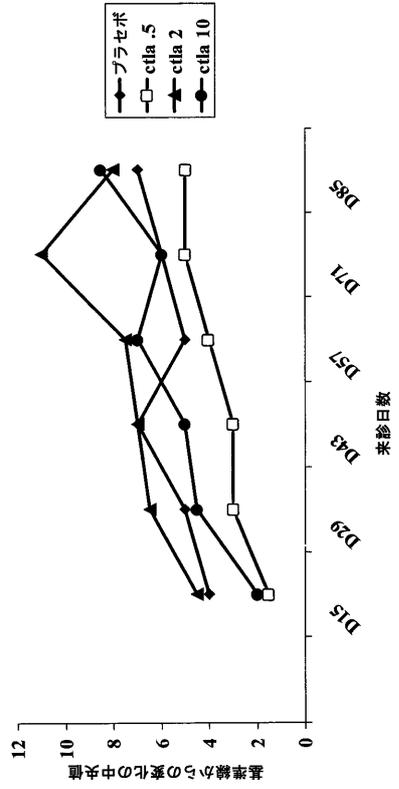


FIG. 10A

【 図 1 0 B 】

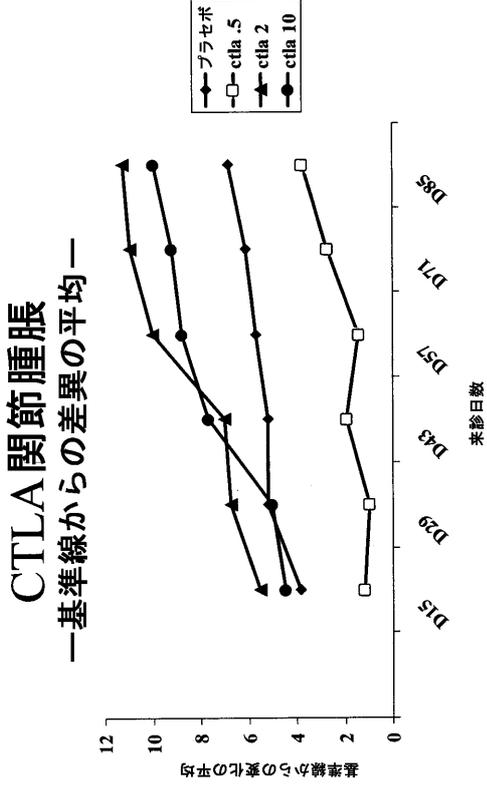


FIG. 10B

【 図 1 1 】

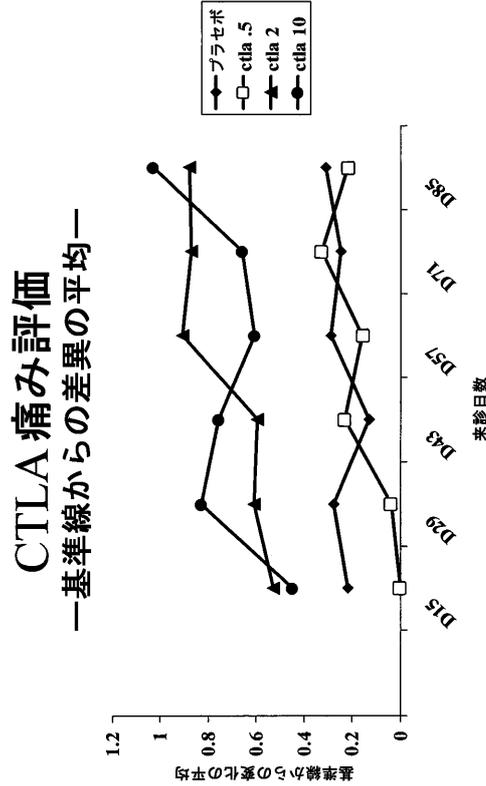


FIG. 11

【 図 1 2 A 】

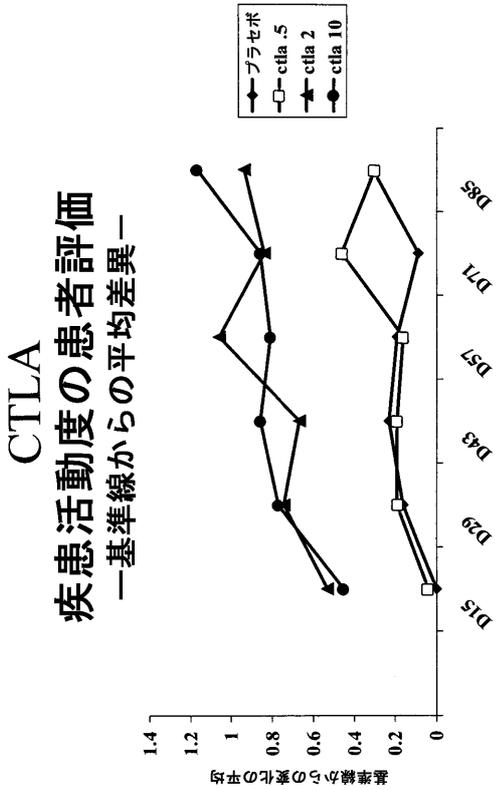


FIG. 12A

【 図 1 2 B 】

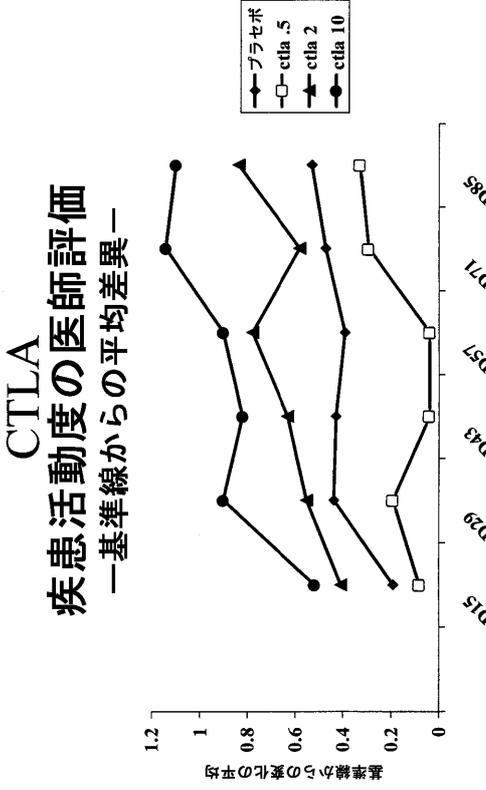


FIG. 12B

【 図 1 3 A 】

LEA 関節圧痛

—基準線からの差異の中央値—

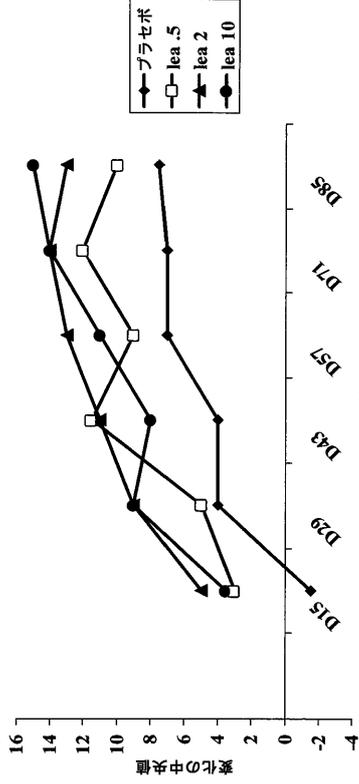


FIG. 13A

【 図 1 3 B 】

LEA 関節圧痛

—基準線からの変化の平均—

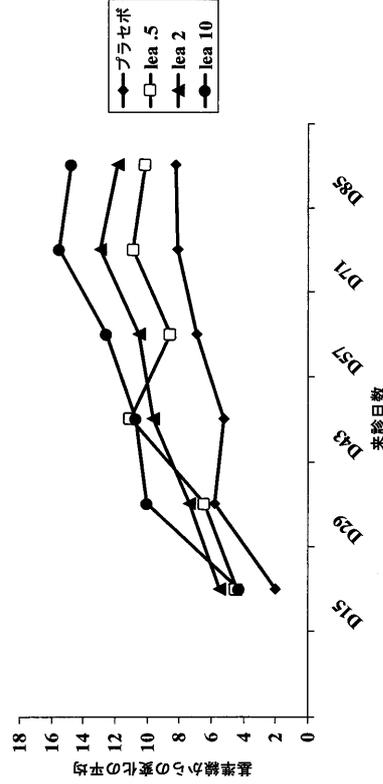


FIG. 13B

【 図 1 4 A 】

LEA 関節腫脹

—基準線からの差異の中央値—

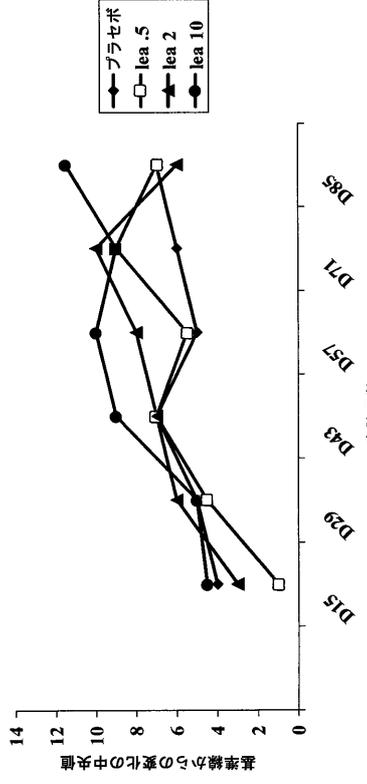


FIG. 14A

【 図 1 4 B 】

LEA 関節腫脹

—基準線からの変化の平均—

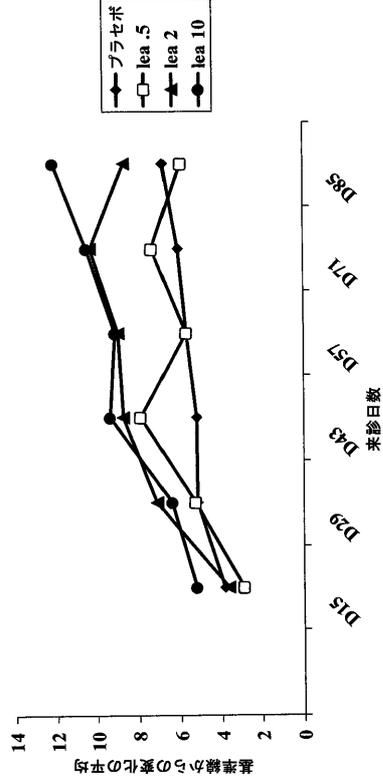


FIG. 14B

【 図 1 5 】

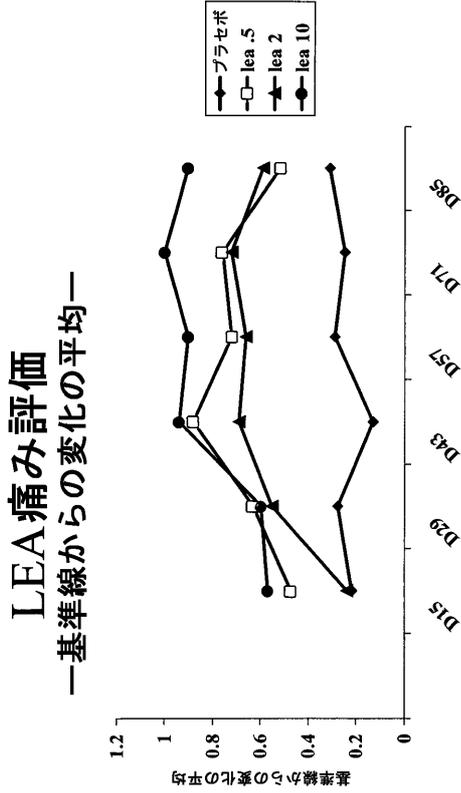


FIG. 15

【 図 1 6 A 】

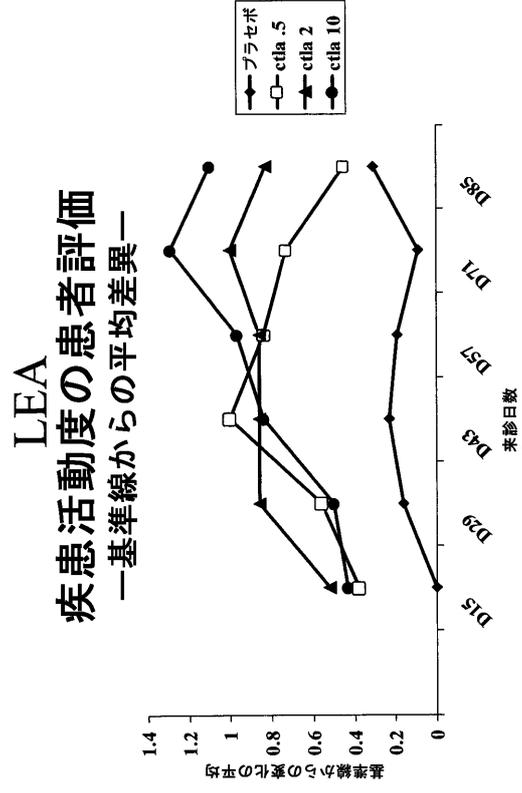


FIG. 16A

【 図 1 6 B 】

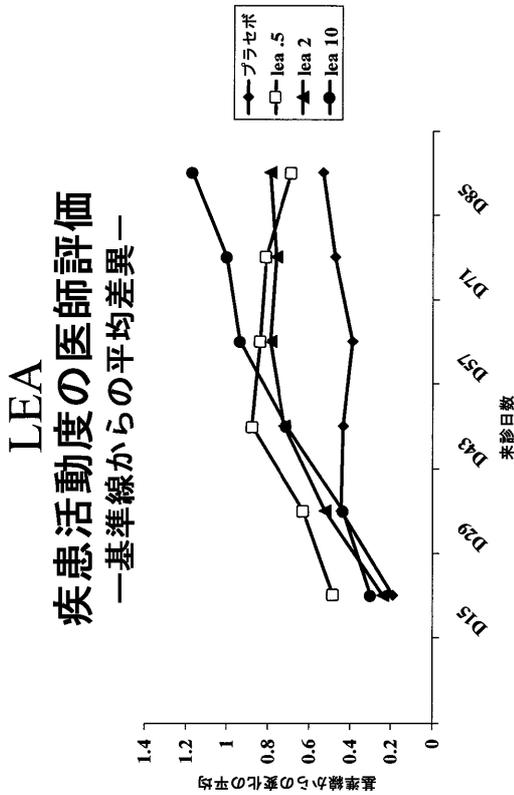


FIG. 16B

【 図 1 7 】

85日目における基準線と比較した、健康評価問診表(HAQ)における改善パーセンテージ

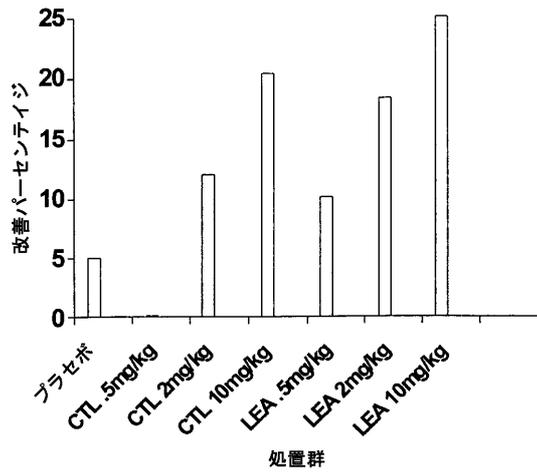


FIG. 17

【 図 2 3 】

オンコスタチンMシグナルペプチド

```

H G V L L T Q R T L L S L V L
ATG GGT GTA CTG CTC ACA CAG AGG ACG CTG CTC AGT CTG GTC CTT 45
      ←-1 +1
A L L F P S M A S M A M H V A
GCA CTC CTG TTT CCA AGC ATG GCG AGC ATG GCA ATG CAC GTG GCC 90

Q P A V V L A S S R G I A S F
CAG CCT GCT GTG GTA CTG GCC AGC AGC CGA GGC ATC GCC AGC TTT 135

V C E Y A S P G K A T E V R V
GTG TGT GAG TAT CCA TCT CCA GGC AAA GCC ACT GAG GTC CGG GTG 180

T V L R Q A D S Q V T E V C A
ACA GTG CTT CGG CAG GCT GAC AGC CAG GTG ACT GAA GTC TGT GCG 225

A T Y M H G N E L T F L D D S
GCA ACC TAC ATG ATG GGG AAT GAG TTG ACC TTC CTA GAT GAT TCC 270

I C T G T S S G N Q V N L T I
ATC TGC ACG GGC ACC TCC AGT GGA AAT CAA GTG AAC CTC ACT ATC 315

Q G L R A M D T G L Y I C K V
CAR GCA CTG AGG GCC ATG GAC ACG GGA CTC TAC ATC TGC AAG GTG 360
                                     グリコシル化部位
E L M Y P P P Y Y L G I G N G
GAG CTC ATG TAC CCA CCG CCA TAC TAC CTG GGC ATA GCC AAC GGA 405
↑
T Q I Y V I D P E P C P D S D
ACC CAG ATT TAT GTA ATT GAT CCA GAA CCG TGC CCA GAT TCT GAC 450

F L L W I L A A V S S G L F F
TTC CTC CTC TGG ATC CTT GCA GCA GTT AGT TCG GGG TTG TTT TTT 495

Y S F L L T A V S L S K M L K
TAT AGC TTT CTC CTC ACA GCT GTT TCT TTG AGC AAA ATG CTA AAG 540

K R S P L T T G V Y V X M P P
AAA AGA AGC CCT CTT ACA ACA GGG GTC TAT GTG AAA ATG CCC CCA 585

T E P E C E K Q F Q P Y F I P
ACA GAG CCA GAA TGT GAA AAG CAA TTT CAG CCT TAT TTT ATT CCC 630

I N
ATC AAT 636

```

FIG. 23

【 図 2 5 B 】

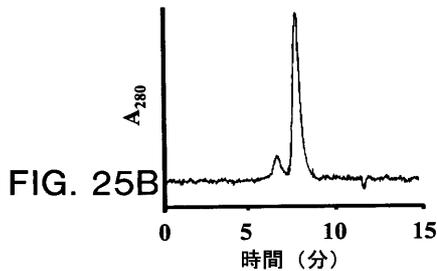


FIG. 25B

【 図 2 5 C 】

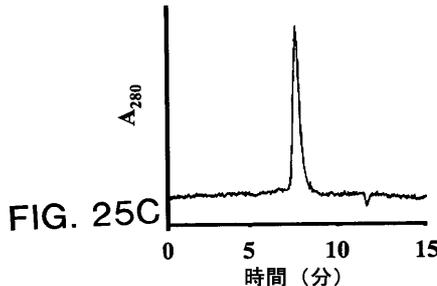


FIG. 25C

【 図 2 7 A 】

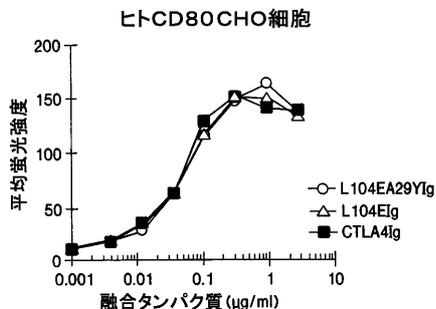


FIG. 27A

【 図 2 8 A 】

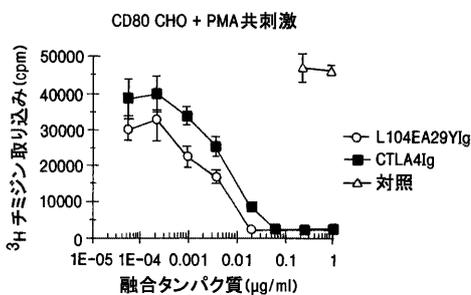


FIG. 28A

【 図 2 7 B 】

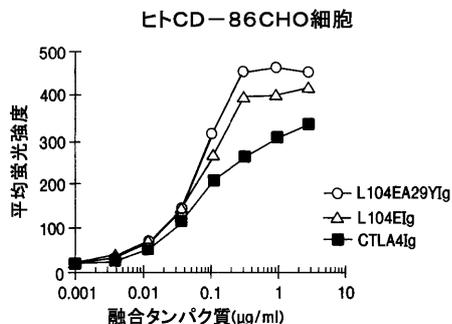


FIG. 27B

【 図 2 8 B 】

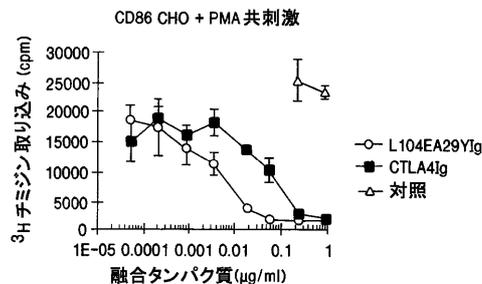


FIG. 28B

【 図 2 9 A 】

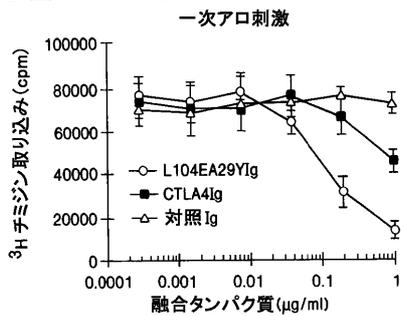


FIG. 29A

【 図 2 9 B 】

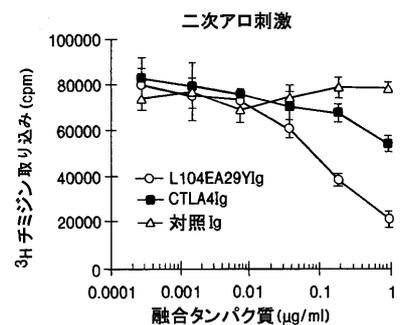


FIG. 29B

【 図 3 0 C 】

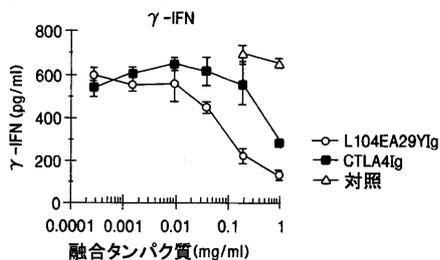


FIG. 30C

【 図 3 1 】

PHA誘導サルT細胞の増殖阻害

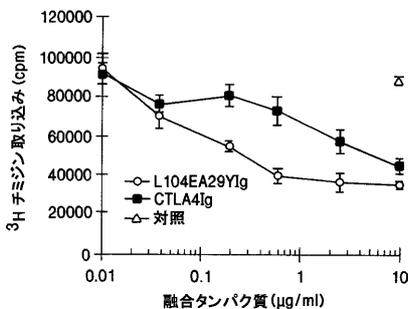


FIG. 31

【 図 3 0 A 】

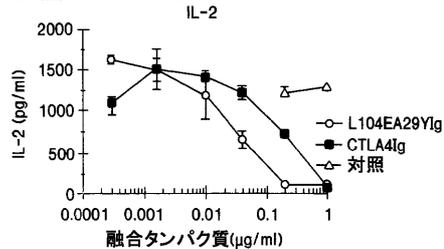


FIG. 30A

【 図 3 0 B 】

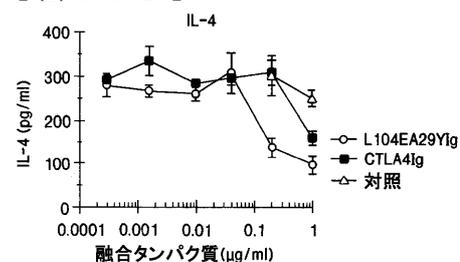


FIG. 30B

【 図 3 2 】

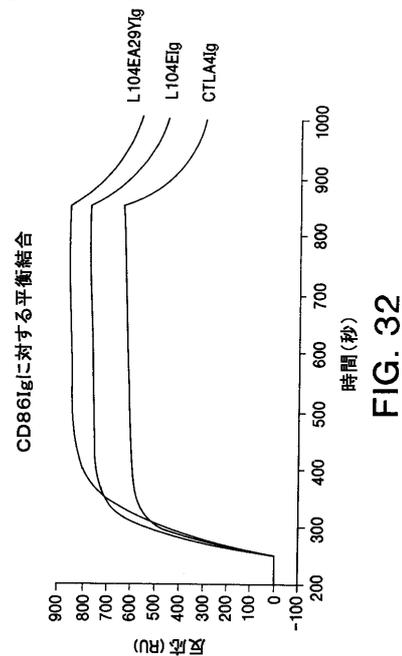


FIG. 32

【 図 3 3 】

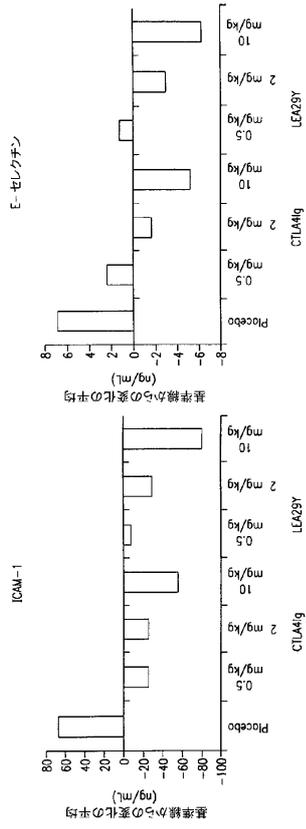


FIG. 33

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 January 2002 (10.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/02638 A2

- (51) International Patent Classification: **C07K 14/705**
- (21) International Application Number: PCT/US01/21204
- (22) International Filing Date: 2 July 2001 (02.07.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/215,913 3 July 2000 (03.07.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **BRIS-TOL-MYERS SQUIBB COMPANY** [US/US], P.O. Box 4000, Lawrenceville-Princeton Road, Princeton, NJ 08543 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): **COHEN, Robert** [US/US], 120 Meadowview Drive, Newton, PA 18940 (US), **CARR, Suzette** [US/US], 579 Province Line Road, Hopewell, NJ 08525 (US), **HAGERTY, David** [US/US], 3 Nohadsar Drive, Pennington, NJ 08534 (US), **PEACH, Robert, J.** [NZ/US], 12848 Via Caballo Rojo, San Diego, CA 92129 (US), **BECKER, Jean-Claude** [FR/US], 16 Halstead Place, Princeton, NJ 08543 (US).
- (74) Agents: **SHER, Audrey, F.**, Bristol-Myers Squibb Company, P.O. Box 4000, Lawrenceville-Princeton Road, Princeton, NJ 08543-4000 et al. (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/02638 A2

(54) Title: METHODS FOR TREATING RHEUMATIC DISEASES USING A SOLUBLE CTLA4 MOLECULE

(57) Abstract: The present invention relates to compositions and methods for treating rheumatic disease by administering to a subject, soluble CTLA4 molecules that block endogenous B7 molecules from binding their ligands.

WO 02/02638

PCT/US01/21204

5

METHODS FOR TREATING RHEUMATIC DISEASES USING A SOLUBLE CTLA4 MOLECULE

10 Throughout this application various publications are referenced. The disclosures of these publications in their entireties are hereby incorporated by reference into this application in order to more fully describe the state of the art to which this invention pertains.

FIELD OF THE INVENTION

15

The present invention relates generally to the field of rheumatic diseases. In particular, the invention relates to methods and compositions for treating rheumatic diseases, such as rheumatoid arthritis, by administering to a subject an effective amount of soluble CTLA4 mutant molecules.

20

BACKGROUND OF THE INVENTION

No cure currently exists for rheumatic diseases. Rather, therapeutic agents are used to treat the symptoms. Typically, the therapeutic agents are administered over long periods
25 of time and the therapeutic value is often diminished by adverse side effects.

Rheumatic diseases encompass a group of diseases that affect the musculo-skeletal and connective tissues of the body. These diseases are characterized by chronic inflammation that often leads to permanent tissue damage, deformity, atrophy and disability.

30 Rheumatic diseases affect the joints, bone, soft tissue, or spinal cord (Mathies, H. 1983 *Rheuma*) and are classified as inflammatory rheumatism, degenerative rheumatism, extra-

WO 02/02638

PCT/US01/21204

articular rheumatism, or collagen diseases. Some rheumatic diseases are known to be autoimmune diseases caused by a subject's altered immune response.

5 Rheumatoid arthritis is a progressive rheumatic disease, affecting approximately 2% of the adult population of developed countries (Utsinger, P. D., et al., 1985 *Rheumatoid Arthritis*, p. 140). This disease is characterized by persistent inflammatory synovitis that causes destruction of cartilage and bone erosion, leading to structural deformities in the peripheral joints. The symptoms associated with rheumatoid arthritis include joint swelling, joint tenderness, inflammation, morning stiffness, and pain, especially upon
10 flexing. Subjects having advanced stages of arthritis suffer from structural damage, including joint destruction with bone erosion (in: "Principals of Internal Medicine, Harrison, 13th edition, pages 1648-1655). In addition, patients can present other clinical symptoms of various organic lesions, including lesions of the skin, kidney, heart, lung, central nervous system, and eyes due to vasculitis related to the autoimmune process.

15 Other symptoms that correlate with rheumatoid arthritis include elevated erythrocyte sedimentation rates, and elevated levels of serum C-reactive protein (CRP) and/or soluble IL-2 receptor (IL-2r). The erythrocyte sedimentation rate is increased in nearly all patients with active rheumatoid arthritis. The level of serum C-reactive protein is also
20 elevated and correlates with disease activity and the likelihood of progressive joint damage. Additionally, the level of soluble IL-2r, a product of activated T-cells, is elevated in blood serum and synovial fluid of patients with active rheumatoid arthritis (see: "Principals of Internal Medicine, Harrison, 13th edition, page 1650).

25 Rheumatoid arthritis is believed to be a T-cell-mediated autoimmune disease, involving antigen-nonspecific intercellular interactions between T-lymphocytes and antigen-presenting cells. In general, the magnitude of the T-cell response is determined by the co-stimulatory response elicited by the interaction between T-cell surface molecules and their ligands (Mueller, et al., 1989 *Ann. Rev. Immunol.* 7:445-480). Key co-stimulatory
30 signals are provided by the interaction between T-cell surface receptors, CD28 and CTLA4, and their ligands, such as B7-related molecules CD80 (i.e., B7-1) and CD86

WO 02/02638

PCT/US01/21204

(i.e., B7-2), on antigen presenting cells (Linsley, P. and Ledbetter, J. 1993 *Ann. Rev. Immunol.* 11:191-212).

5 T-cell activation in the absence of co-stimulation results in anergic T-cell response (Schwartz, R. H., 1992 *Cell* 71:1065-1068) wherein the immune system becomes nonresponsive to stimulation.

10 Since rheumatoid arthritis is thought to be a T-cell-mediated immune system disease, one strategy to develop new agents to treat rheumatoid arthritis is to identify molecules that block co-stimulatory signals between T-lymphocytes and antigen presenting cells, by blocking the interaction between endogenous CD28 or CTLA4 and B7. Potential molecules include soluble CTLA4 molecules that are modified to bind to B7 with higher avidity than wildtype CTLA4 (the sequence of which is shown in Figure 23) or CD28, thereby blocking the co-stimulatory signals.

15 Soluble forms of CD28 and CTLA4 have been constructed by fusing variable (V)-like extracellular domains of CD28 and CTLA4 to immunoglobulin (Ig) constant domains resulting in CD28Ig and CTLA4Ig. A nucleotide and amino acid sequence of CTLA4Ig is shown in Figure 24 with the protein beginning with methionine at position +1 or
20 alanine at position -1 and ending with lysine at position +357. CTLA4Ig binds both CD80-positive and CD86-positive cells more strongly than CD28Ig (Linsley, P., et al., 1994 *Immunity* 1:793-80). Many T-cell-dependent immune responses have been found to be blocked by CTLA4Ig both *in vitro* and *in vivo*. (Linsley, P., et al., 1991b, *supra*; Linsley, P., et al., 1992a *Science* 257:792-795; Linsley, P., et al., 1992b *J. Exp. Med.*
25 176:1595-1604; 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).

To alter binding affinity to natural ligands, such as B7, soluble CTLA4Ig fusion
30 molecules were modified by mutation of amino acids in the CTLA4 portion of the molecules. Regions of CTLA4 that, when mutated, alter the binding affinity or avidity for B7 ligands include the complementarity determining region 1 (CDR-1 as described in

WO 02/02638

PCT/US01/21204

U.S. Patents 6,090,914, 5,773,253, 5,844,095; in copending U.S. Patent Application Serial Number 60/214,065; and by Peach et al, 1994. *J. Exp. Med.*, 180:2049-2058) and complementarity determining region 3 (CDR-3)-like regions (CDR-3 is the conserved region of the CTLA4 extracellular domain as described in U.S. Patents U.S. Patents 6,090,914, 5,773,253 and 5,844,095; in copending U.S. Patent Application Serial Number 60/214,065; and by Peach, R.J., et al *J Exp Med* 1994 180:2049-2058. The CDR-3-like region encompasses the CDR-3 region and extends, by several amino acids, upstream and/or downstream of the CDR-3 motif). The CDR-3-like region includes a hexapeptide motif MYPPPY that is highly conserved in all CD28 and CTLA4 family members.

5 Alanine scanning mutagenesis through the hexapeptide motif in CTLA4, and at selected residues in CD281g, reduced or abolished binding to CD80 (Peach, R.J., et al *J Exp Med* 1994 180:2049-2058).

Further modifications were made to soluble CTLA4lg molecules by interchanging homologous regions of CTLA4 and CD28. These chimeric CTLA4/CD28 homologue mutant molecules identified the MYPPPY hexapeptide motif common to CTLA4 and CD28, as well as certain non-conserved amino acid residues in the CDR-1- and CDR-3-like regions of CTLA4, as regions responsible for increasing the binding avidity of CTLA4 with CD80 (Peach, R. J., et al., 1994 *J Exp Med* 180:2049-2058).

15

20 Soluble CTLA4 molecules, such as CTLA4lg, CTLA4 mutant molecules or chimeric CTLA4/CD28 homologue mutants as described *supra*, introduce a new group of therapeutic drugs to treat rheumatic diseases.

25 Present treatments for rheumatic diseases, such as rheumatoid arthritis, include administering nonspecific cytotoxic immunosuppressive drugs, such as methotrexate, cyclophosphamide, azathioprine, cyclosporin A, and tumor necrosis factor-alpha (TNF α) blockers or antagonists. These immunosuppressive drugs suppress the entire immune system of the subject, and long-term use increases the risk of infection. Moreover, these

30 drugs merely slow down the progress of the rheumatoid arthritis, which resumes at an accelerated pace after the therapy is discontinued. Additionally, prolonged therapy with

WO 02/02638

PCT/US01/21204

these nonspecific drugs produces toxic side effects, including a tendency towards development of certain malignancies, kidney failure, bone marrow suppression, pulmonary fibrosis, malignancy, diabetes, and liver function disorders. These drugs also gradually cease being effective after about 2-5 years (Kelley's Textbook of Rheumatology, 6th Edition, pages 1001-1022).

Alternatively, therapeutic agents that are non-specific immunosuppressive and anti-inflammatory drugs have been used to obtain symptomatic relief. These drugs are dose-dependent and do not protect from disease progression. These drugs include steroid compounds, such as prednisone and methylprednisolone. Steroids also have significant toxic side effects associated with their long-term use. (Kelley's Textbook of Rheumatology, 6th Edition, pages 829-833).

Thus, current treatments for rheumatoid arthritis are of limited efficacy, involve significant toxic side effects, and cannot be used continuously for prolonged periods of time.

Accordingly, there exists a need for treatments that are effective and more potent for treating rheumatic diseases, such as rheumatoid arthritis, and avoids the disadvantages of conventional methods and agents, by targeting a pathophysiological mechanism of autoimmunity.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides compositions and methods for treating immune system diseases, by administering to a subject soluble CTLA4 molecules, which bind to B7 molecules on B7-positive cells, thereby inhibiting endogenous B7 molecules from binding CTLA4 and/or CD28 on T-cells. Soluble CTLA4 molecules used in the methods of the invention include CTLA4Ig and soluble CTLA4 mutant molecule L104EA29YIg.

WO 02/02638

PCT/US01/21204

The present invention also provides methods for inhibiting T-cell function but not T-cell depletion in a human by contacting B7-positive cells in the human with a soluble CTLA4. Examples of soluble CTLA4 include CTLA4Ig and soluble CTLA4 mutant molecule such as L104EA29YIg.

5

The present invention also provides methods for treating (e.g. reducing symptoms) rheumatic diseases, such as rheumatoid arthritis, by administering to a subject diagnosed with rheumatoid arthritis, soluble CTLA4 molecules such as CTLA4Ig and/or soluble CTLA4 mutant molecule L104EA29YIg. The CTLA4 mutant molecule L104EA29YIg e.g. beginning with methionine at position +1 or alanine at position -1 and ending with lysine at position +357 as shown in Figure 19 is preferred for use in the methods of the invention.

The present invention also provides methods for reducing pathophysiological changes associated with rheumatic disease, such as structural damage, by administering to a subject diagnosed with rheumatoid arthritis, soluble CTLA4 molecules.

The present invention also provides a pharmaceutical composition for treating immune system diseases, such as rheumatic diseases, comprising a pharmaceutically acceptable carrier and a biologically effective agent such as soluble CTLA4 molecules.

Kits comprising pharmaceutical compositions therapeutic for immune system disease are also encompassed by the invention. In one embodiment, a kit comprising one or more of the pharmaceutical compositions of the invention is used to treat an immune system disease e.g. rheumatoid arthritis. For example, the pharmaceutical composition comprises an effective amount of soluble CTLA4 mutant molecules that bind to B7 molecules on B7-positive cells, thereby blocking the B7 molecules from binding CTLA4 and/or CD28 on T-cells. Further, the kit may contain one or more immunosuppressive agents used in conjunction with the pharmaceutical compositions of the invention. Potential immunosuppressive agents include, but are not limited to, corticosteroids, nonsteroidal antiinflammatory drugs (e.g. Cox-2 inhibitors), cyclosporin prednisone, azathioprine,

WO 02/02638

PCT/US01/21204

methotrexate, TNF α blockers or antagonists, infliximab, any biological agent targeting an inflammatory cytokine, hydroxychloroquine, sulphasalazopyrine, gold salts, etanercept, and anakinra.

5 The present invention also provides methods for reducing the erythrocyte sedimentation rate that is associated with rheumatoid arthritis.

Additionally, the present invention provides methods for reducing the levels of certain components of blood serum which are associated with rheumatoid arthritis, including C-
10 reactive protein, soluble ICAM-1, soluble E-selectin and/or soluble IL-2r.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1A: Demographic data of patient cohorts. Demographic data including gender,
15 race, and disease duration as described in Example 3, *infra*.

Figure 1B: Demographic data of patient cohorts. Demographic data including gender,
age, weight, and disease activity evaluated by the patient and by the physician as
described in Example 3, *infra*.

20 Figure 1C: Demographic data of patient cohorts as described in Example 3, *infra*.
Demographic data including disease activity, erythrocyte sedimentation rate (ESR),
physical function (disability evaluated by health questionnaire), and C-reactive protein
(CRP).

25 Figure 1D: Demographic data of patient cohorts as described in Example 3, *infra*.
Demographic data including joint swelling, joint tenderness, morning stiffness, and pain.

Figure 1E: Demographic data of patient cohorts as described in Example 3, *infra*.
30 Demographic data including prior treatments.

WO 02/02638

PCT/US01/21204

Figure 2: Summary of discontinuations at day 85 by reason as described in Example 3, *infra*.

5 Figure 3A: ACR responses at Day 85 as described in Example 3, *infra*: ACR-20, -50, and -70 responses.

Figure 3B: ACR-20 responses at Day 85, including placebo response, as described in Example 3, *infra*: ACR-20 response with 95% confidence limits.

10 Figure 3C: ACR-20 responses at Day 85 as described in Example 3, *infra*: Difference in ACR-20 response with respect to 95% confidence intervals.

15 Figure 4A: Basic (20% improvement) clinical responses in swollen and tender joint count in percentage of patients at Day 85 as described in Example 3, *infra*: basic clinical response, ACR-20.

20 Figure 4B: Clinical responses (in percentage improvement) in swollen and tender joint count in percentage of patients at Day 85 as described in Example 3, *infra*: change in clinical response in percentage improvement.

Figure 5A: Pain response (by Likert scale by mean unit change from baseline) in percentage of patients at Day 85 as described in Example 3, *infra*: pain score changes from baseline.

25 Figure 5B: Patient global disease changes (by Likert scale by mean unit change from baseline) in percentage of patients at Day 85 as described in Example 3, *infra*: patient global disease activity changes.

30 Figure 5C: Physician global disease changes (by Likert scale by mean unit change from baseline) in percentage of patients at Day 85 as described in Example 3, *infra*: physician global disease activity changes.

WO 02/02638

PCT/US01/21204

Figure 5D: Pain (by Likert scale by mean unit change from baseline) in percentage of patients at Day 85 as described in Example 3, *infra*: pain changes from baseline.

5 Figure 6A: Patient global assessment of disease activity change from baseline by range of 2 units at Day 85 as described in Example 3, *infra*; disease activity improvement.

Figure 6B: Physician global assessment of disease activity change from baseline by range of 2 units at Day 85 as described in Example 3, *infra*; disease activity improvement.

10

Figure 7A: Percent reduction in C-reactive protein (CRP) levels at Day 85 as described in Example 3, *infra*: percentage reduction in CRP levels from baseline.

Figure 7B: Difference in reduction in C-reactive protein (CRP) levels at Day 85 as described in Example 3, *infra*: percent reduction difference in CRP levels with 95% confidence intervals.

15

Figure 7C: Mean reduction in C-reactive protein (CRP) levels at Day 85 as described in Example 3, *infra*: mean change from baseline.

20

Figure 8: Reduction in soluble IL-2 receptor levels mean change from baseline at Day 85 as described in Example 3, *infra*.

Figure 9A: The effect of CTLA4Ig on tender joints over time as described in Example 3, *infra*: median difference from baseline.

25

Figure 9B: The effect of CTLA4Ig on tender joints over time as described in Example 3, *infra*: mean difference from baseline.

Figure 10A: The effect of CTLA4Ig on swollen joints over time as described in Example 3, *infra*: median difference from baseline.

30

WO 02/02638

PCT/US01/21204

- Figure 10B: The effect of CTLA4Ig on swollen joints over time as described in Example 3, *infra*: mean difference from baseline.
- 5 Figure 11: The effect of CTLA4Ig on pain assessment mean difference from baseline over time as described in Example 3, *infra*.
- Figure 12A: The effect of CTLA4Ig on patient assessment of disease activity mean difference from baseline over time as described in Example 3, *infra*.
- 10 Figure 12B: The effect of CTLA4Ig on physician assessment of disease activity mean difference from baseline over time as described in Example 3, *infra*.
- Figure 13A: The effect of L104EA29YIg on tender joints over time as described in
- 15 Example 3, *infra*: median difference from baseline.
- Figure 13B: The effect of L104EA29YIg on tender joints over time as described in Example 3, *infra*: mean change from baseline.
- 20 Figure 14A: The effect of L104EA29YIg on swollen joints over time as described in Example 3, *infra*: median difference from baseline.
- Figure 14B: The effect of L104EA29YIg on swollen joints over time as described in Example 3, *infra*: mean change from baseline.
- 25 Figure 15: The effect of L104EA29YIg on pain assessment over time as described in Example 3, *infra*: mean change from baseline over time.
- Figure 16A: The effect of L104EA29YIg on patient assessment of disease activity mean difference from baseline over time as described in Example 3, *infra*.
- 30

WO 02/02638

PCT/US01/21204

Figure 16B: The effect of L104EA29YIg on physician assessment of disease activity mean difference from baseline over time as described in Example 3, *infra*.

5 Figure 17: Percent improvement in patient disability assessed by Health Assessment Questionnaire (HAQ) compared to the baseline at Day 85 with CTLA4Ig and L104EA29YIg treatment as described in Example 3, *infra*.

10 Figure 18: Nucleotide and amino acid sequence of L104EIg as described in Example 1, *infra*.

Figure 19: Nucleotide and amino acid sequence of L104EA29YIg as described in Example 1, *infra*.

15 Figure 20: Nucleotide and amino acid sequence of L104EA29LIg as described in Example 1, *infra*.

Figure 21: Nucleotide and amino acid sequence of L104EA29TIg as described in Example 1, *infra*.

20 Figure 22: Nucleotide and amino acid sequence of L104EA29Wlg as described in Example 1, *infra*.

Figure 23: Nucleotide and amino acid sequence of CTLA4 receptor.

25 Figure 24: Nucleotide and amino acid sequence of CTLA4Ig.

30 Figure 25: SDS gel (FIG. 25A) for CTLA4Ig (lane 1), L104EIg (lane 2), and L104EA29YIg (lane 3A); and size exclusion chromatographs of CTLA4Ig (FIG. 25B) and L104EA29YIg (FIG. 25C).

WO 02/02638

PCT/US01/21204

Figures 26 (left and right depictions): A ribbon diagram of the CTLA4 extracellular Ig V-like fold generated from the solution structure determined by NMR spectroscopy. FIG. 26 (right depiction) shows an expanded view of the CDR-1 (S25-R33) region and the MYPPPY region indicating the location and side-chain orientation of the avidity enhancing mutations, L104 and A29.

Figures 27A & 27B: FACS assays showing binding of L104EA29YIg, L104EIg, and CTLA4Ig to human CD80- or CD86-transfected CHO cells as described in Example 2, *infra*.

Figures 28A & 28B: Graphs showing inhibition of proliferation of CD80-positive and CD86-positive CHO cells as described in Example 2, *infra*.

Figures 29A & 29B: Graphs showing that L104EA29YIg is more effective than CTLA4Ig at inhibiting proliferation of primary and secondary allostimulated T cells as described in Example 2, *infra*.

Figures 30A-C: Graphs illustrating that L104EA29YIg is more effective than CTLA4Ig at inhibiting IL-2 (FIG. 30A), IL-4 (FIG. 30B), and gamma (γ)-interferon (FIG. 30C) cytokine production of allostimulated human T cells as described in Example 2, *infra*.

Figure 31: A graph demonstrating that L104EA29YIg is more effective than CTLA4Ig at inhibiting proliferation of phytohemagglutinin- (PHA) stimulated monkey T cells as described in Example 2, *infra*.

Figure 32: A graph showing the equilibrium binding analysis of L104EA29YIg, L104EIg, and wild-type CTLA4Ig to CD86Ig.

Figures 33A & B: Reduction in soluble ICAM-1 and soluble E-selectin levels mean change from baseline at Day 85 as described in Example 3, *infra*.

WO 02/02638

PCT/US01/21204

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

DEFINITIONS

5

All scientific and technical terms used in this application have meanings commonly used in the art unless otherwise specified. As used in this application, the following words or phrases have the meanings specified.

- 10 As used herein, "ligand" refers to a molecule that specifically recognizes and binds another molecule, for example, a ligand for CTLA4 is a B7 molecule.

As used herein "wild type CTLA4" or "non-mutated CTLA4" has the amino acid sequence of naturally occurring, full length CTLA4 as shown in Figure 23 (also as
15 described U.S. Patent Nos. 5,434,131, 5,844,095, 5,851,795), or any portion or derivative thereof, that recognizes and binds a B7 or interferes with a B7 so that it blocks binding to CD28 and/or CTLA4 (e.g., endogenous CD28 and/or CTLA4). In particular embodiments, the extracellular domain of wild type CTLA4 begins with methionine at position +1 and ends at aspartic acid at position +124, or the extracellular domain of wild
20 type CTLA4 begins with alanine at position -1 and ends at aspartic acid at position +124. Wild type CTLA4 is a cell surface protein, having an N-terminal extracellular domain, a transmembrane domain, and a C-terminal cytoplasmic domain. The extracellular domain binds to target molecules, such as a B7 molecule. In a cell, the naturally occurring, wild type CTLA4 protein is translated as an immature polypeptide, which includes a signal
25 peptide at the N-terminal end. The immature polypeptide undergoes post-translational processing, which includes cleavage and removal of the signal peptide to generate a CTLA4 cleavage product having a newly generated N-terminal end that differs from the N-terminal end in the immature form. One skilled in the art will appreciate that additional post-translational processing may occur, which removes one or more of the
30 amino acids from the newly generated N-terminal end of the CTLA4 cleavage product. Alternatively, the signal peptide may not be removed completely, generating molecules

WO 02/02638

PCT/US01/21204

that begin before the common starting amino acid methionine. Thus, the mature CTLA4 protein may start at methionine at position +1 or alanine at position -1. The mature form of the CTLA4 molecule includes the extracellular domain or any portion thereof, which binds to B7.

5

As used herein, a "CTLA4 mutant molecule" means wildtype CTLA4 as shown in Figure 23 or any portion or derivative thereof, that has a mutation or multiple mutations (preferably in the extracellular domain of wildtype CTLA4). A CTLA4 mutant molecule has a sequence that it is similar but not identical to the sequence of wild type CTLA4 molecule, but still binds a B7. The mutations may include one or more amino acid residues substituted with an amino acid having conservative (e.g., substitute a leucine with an isoleucine) or non-conservative (e.g., substitute a glycine with a tryptophan) structure or chemical properties, amino acid deletions, additions, frameshifts, or truncations. CTLA4 mutant molecules may include a non-CTLA4 molecule therein or attached thereto. The mutant molecules may be soluble (i.e., circulating) or bound to a cell surface. Additional CTLA4 mutant molecules include those described in U.S. Patent Application Serial Numbers 09/865,321, 60/214,065 and 60/287,576; in U.S. Patent Numbers 6,090,914 5,844,095 and 5,773,253; and as described by Peach, R. J., *et al.*, in *J Exp Med* 180:2049-2058 (1994). CTLA4 mutant molecules can be made synthetically or recombinantly.

10

"CTLA4Ig" is a soluble fusion protein comprising an extracellular domain of wildtype CTLA4 joined to an Ig tail, or a portion thereof that binds a B7. A particular embodiment comprises the extracellular domain of wild type CTLA4 (as shown in Figure 23) starting at methionine at position +1 and ending at aspartic acid at position +124; or starting at alanine at position -1 to aspartic acid at position +124; a junction amino acid residue glutamine at position +125; and an immunoglobulin portion encompassing glutamic acid at position +126 through lysine at position +357 (DNA encoding CTLA4Ig was deposited on May 31, 1991 with the American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 under the provisions of the Budapest Treaty, and has been accorded ATCC accession number ATCC 68629; Linsley, P., *et al.*, 1994 *Immunity* 1:793-80). CTLA4Ig-24, a Chinese Hamster Ovary (CHO) cell line

15

20

WO 02/02638

PCT/US01/21204

expressing CTLA4Ig was deposited on May 31, 1991 with ATCC identification number CRL-10762). The soluble CTLA4Ig molecules used in the methods and/or kits of the invention may or may not include a signal (leader) peptide sequence. Typically, in the methods and/or kits of the invention, the molecules do not include a signal peptide sequence.

"L104EA29YIg" is a fusion protein that is a soluble CTLA4 mutant molecule comprising an extracellular domain of wildtype CTLA4 with amino acid changes A29Y (a tyrosine amino acid residue substituting for an alanine at position 29) and L104E (a glutamic acid amino acid residue substituting for a leucine at position +104), or a portion thereof that binds a B7 molecule, joined to an Ig tail (included in Figure 19; DNA encoding L104EA29YIg was deposited on June 20, 2000 with ATCC number PTA-2104; copending in U.S. Patent Application Serial Numbers 09/579,927, 60/287,576 and 60/214,065, incorporated by reference herein). The soluble L104EA29YIg molecules used in the methods and/or kits of the invention may or may not include a signal (leader) peptide sequence. Typically, in the methods and/or kits of the invention, the molecules do not include a signal peptide sequence.

As used herein, "soluble" refers to any molecule, or fragments and derivatives thereof, not bound or attached to a cell, i.e., circulating. For example, CTLA4, B7 or CD28 can be made soluble by attaching an immunoglobulin (Ig) moiety to the extracellular domain of CTLA4, B7 or CD28, respectively. Alternatively, a molecule such as CTLA4 can be rendered soluble by removing its transmembrane domain. Typically, the soluble molecules used in the methods of the invention do not include a signal (or leader) sequence.

As used herein, "soluble CTLA4 molecules" means non-cell-surface-bound (i.e. circulating) CTLA4 molecules or any functional portion of a CTLA4 molecule that binds B7 including, but not limited to: CTLA4Ig fusion proteins (e.g. ATCC 68629), wherein the extracellular domain of CTLA4 is fused to an immunoglobulin (Ig) moiety rendering the fusion molecule soluble, or fragments and derivatives thereof; proteins with the

WO 02/02638

PCT/US01/21204

extracellular domain of CTLA4 fused or joined with a portion of a biologically active or chemically active protein such as the papillomavirus E7 gene product (CTLA4-E7), melanoma-associated antigen p97 (CTLA4-p97) or HIV env protein (CTLA4-env gp120), or fragments and derivatives thereof; hybrid (chimeric) fusion proteins such as CD28/CTLA4lg, or fragments and derivatives thereof; CTLA4 molecules with the transmembrane domain removed to render the protein soluble (Oaks, M. K., et al., 2000 *Cellular Immunology* 201:144-153), or fragments and derivatives thereof. "Soluble CTLA4 molecules" also include fragments, portions or derivatives thereof, and soluble CTLA4 mutant molecules, having CTLA4 binding activity. The soluble CTLA4 molecules used in the methods of the invention may or may not include a signal (leader) peptide sequence. Typically, in the methods of the invention, the molecules do not include a signal peptide sequence.

As used herein "the extracellular domain of CTLA4" is the portion of CTLA4 that recognizes and binds CTLA4 ligands, such as B7 molecules. For example, an extracellular domain of CTLA4 comprises methionine at position +1 to aspartic acid at position +124 (Figure 23). Alternatively, an extracellular domain of CTLA4 comprises alanine at position -1 to aspartic acid at position +124 (Figure 23). The extracellular domain includes fragments or derivatives of CTLA4 that bind a B7 molecule. The extracellular domain of CTLA4 as shown in Figure 23 may also include mutations that change the binding avidity of the CTLA4 molecule for a B7 molecule.

As used herein, the term "mutation" means a change in the nucleotide or amino acid sequence of a wildtype molecule, for example, a change in the DNA and/or amino acid sequences of the wild-type CTLA4 extracellular domain. A mutation in DNA may change a codon leading to a change in the amino acid sequence. A DNA change may include substitutions, deletions, insertions, alternative splicing, or truncations. An amino acid change may include substitutions, deletions, insertions, additions, truncations, or processing or cleavage errors of the protein. Alternatively, mutations in a nucleotide sequence may result in a silent mutation in the amino acid sequence as is well understood in the art. In that regard, certain nucleotide codons encode the same amino acid.

WO 02/02638

PCT/US01/21204

Examples include nucleotide codons CGU, CGG, CGC, and CGA encoding the amino acid, arginine (R); or codons GAU, and GAC encoding the amino acid, aspartic acid (D). Thus, a protein can be encoded by one or more nucleic acid molecules that differ in their specific nucleotide sequence, but still encode protein molecules having identical sequences. The amino acid coding sequence is as follows:

<u>Amino Acid</u>	<u>Symbol</u>	<u>One Letter Symbol</u>	<u>Codons</u>
Alanine	Ala	A	GCU, GCC, GCA, GCG
Cysteine	Cys	C	UGU, UGC
Aspartic Acid	Asp	D	GAU, GAC
Glutamic Acid	Glu	E	GAA, GAG
Phenylalanine	Phe	F	UUU, UUC
Glycine	Gly	G	GGU, GGC, GGA, GGG
Histidine	His	H	CAU, CAC
Isoleucine	Ile	I	AUU, AUC, AUA
Lysine	Lys	K	AAA, AAG
Leucine	Leu	L	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG
Methionine	Met	M	AUG
Asparagine	Asn	N	AAU, AAC
Proline	Pro	P	CCU, CCC, CCA, CCG
Glutamine	Gln	Q	CAA, CAG
Arginine	Arg	R	CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Serine	Ser	S	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
Threonine	Thr	T	ACU, ACC, ACA, ACG
Valine	Val	V	GUU, GUC, GUA, GUG
Tryptophan	Trp	W	UGG
Tyrosine	Tyr	Y	UAU, UAC

The mutant molecule may have one or more mutations.

WO 02/02638

PCT/US01/21204

As used herein, a "non-CTLA4 protein sequence" or "non-CTLA4 molecule" means any protein molecule that does not bind B7 and does not interfere with the binding of CTLA4 to its target. An example includes, but is not limited to, an immunoglobulin (Ig) constant region or portion thereof. Preferably, the Ig constant region is a human or monkey Ig constant region, e.g., human C(gamma)1, including the hinge, CH2 and CH3 regions. The
5 Ig constant region can be mutated to reduce its effector functions (U.S. Patents 5,637,481, 5,844,095 and 5,434,131).

As used herein, a "fragment" or "portion" is any part or segment of a CTLA4 molecule,
10 preferably the extracellular domain of CTLA4 or a part or segment thereof, that recognizes and binds its target, e.g., a B7 molecule.

As used herein, "B7" refers to the B7 family of molecules including, but not limited to, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) and B7-3 that may recognize and bind CTLA4 and/or CD28.
15

As used herein, "B7-positive cells" are any cells with one or more types of B7 molecules expressed on the cell surface.

As used herein, a "derivative" is a molecule that shares sequence homology and activity of
20 its parent molecule. For example, a derivative of CTLA4 includes a soluble CTLA4 molecule having an amino acid sequence at least 70% similar to the extracellular domain of wildtype CTLA4, and which recognizes and binds B7 e.g. CTLA4Ig or soluble CTLA4 mutant molecule L104EA29YIg.

As used herein, to "block" or "inhibit" a receptor, signal or molecule means to interfere
25 with the activation of the receptor, signal or molecule, as detected by an art-recognized test. For example, blockage of a cell-mediated immune response can be detected by determining reduction of Rheumatic Disease associated symptoms. Blockage or inhibition may be partial or total.
30

WO 02/02638

PCT/US01/21204

- As used herein, "blocking B7 interaction" means to interfere with the binding of B7 to its ligands, such as CD28 and/or CTLA4, thereby obstructing T-cell and B7-positive cell interactions. Examples of agents that block B7 interactions include, but are not limited to, molecules such as an antibody (or portion or derivative thereof) that recognizes and binds to the any of CTLA4, CD28 or B7 molecules (e.g. B7-1, B7-2); a soluble form (or portion or derivative thereof) of the molecules such as soluble CTLA4; a peptide fragment or other small molecule designed to interfere with the cell signal through the CTLA4/CD28/B7-mediated interaction. In a preferred embodiment, the blocking agent is a soluble CTLA4 molecule, such as CTLA4Ig (ATCC 68629) or L104EA29YIg (ATCC PTA-2104), a soluble CD28 molecule such as CD28Ig (ATCC 68628), a soluble B7 molecule such as B7Ig (ATCC 68627), an anti-B7 monoclonal antibody (e.g. ATCC HB-253, ATCC CRL-2223, ATCC CRL-2226, ATCC HB-301, ATCC HB-11341 and monoclonal antibodies as described in by Anderson et al in U.S. Patent 6,113,898 or Yokochi et al., 1982. *J. Immun.*, 128(2)823-827), an anti-CTLA4 monoclonal antibody (e.g. ATCC HB-304, and monoclonal antibodies as described in references 82-83) and/or an anti-CD28 monoclonal antibody (e.g. ATCC HB 11944 and mAb 9.3 as described by Hansen (Hansen et al., 1980. *Immunogenetics* 10: 247-260) or Martin (Martin et al., 1984. *J. Clin. Immun.*, 4(1):18-22)).
- As used herein, "immune system disease" means any disease mediated by T-cell interactions with B7-positive cells including, but not limited to, autoimmune diseases, graft related disorders and immunoproliferative diseases. Examples of immune system diseases include graft versus host disease (GVHD) (e.g., such as may result from bone marrow transplantation, or in the induction of tolerance), immune disorders associated with graft transplantation rejection, chronic rejection, and tissue or cell allo- or xenografts, including solid organs, skin, islets, muscles, hepatocytes, neurons. Examples of immunoproliferative diseases include, but are not limited to, psoriasis, T-cell lymphoma, T-cell acute lymphoblastic leukemia, testicular angiocentric T-cell lymphoma, benign lymphocytic angitis, lupus (e.g. lupus erythematosus, lupus nephritis), Hashimoto's thyroiditis, primary myxedema, Graves' disease, pernicious anemia, autoimmune atrophic gastritis, Addison's disease, diabetes (e.g. insulin dependent diabetes mellitus, type I diabetes

WO 02/02638

PCT/US01/21204

mellitus, type II diabetes mellitus), good pasture's syndrome, myasthenia gravis, pemphigus, Crohn's disease, sympathetic ophthalmia, autoimmune uveitis, multiple sclerosis, autoimmune hemolytic anemia, idiopathic thrombocytopenia, primary biliary cirrhosis, chronic action hepatitis, ulceratis colitis, Sjogren's syndrome, rheumatic diseases (e.g. 5 rheumatoid arthritis), polymyositis, scleroderma, and mixed connective tissue disease.

As used herein, "rheumatic diseases" means any disease that affects the joints, bone, soft tissue, or spinal cord (Mathies, H. 1983 *Rheuma*) and comprises inflammatory rheumatism, degenerative rheumatism, extra-articular rheumatism, and collagen diseases. 10 Additionally, rheumatic diseases include, but are not limited to, chronic polyarthritis, psoriasis arthropathica, ankylosing spondylitis, rheumatoid arthritis, panarteritis nodosa, systemic lupus erythematosus, progressive systemic scleroderma, periartthritis humeroscapularis, arthritis uratica, chondrocalcinosis, dermatomyositis, muscular rheumatism, myositis, and myogelosis. Some rheumatic diseases are known to be 15 autoimmune diseases caused by a subject's altered immune response.

As used herein, "gene therapy" is a process to treat a disease by genetic manipulation so that a sequence of nucleic acid is transferred into a cell, the cell then expressing any genetic product encoded by the nucleic acid. For example, as is well known by those 20 skilled in the art, nucleic acid transfer may be performed by inserting an expression vector containing the nucleic acid of interest into cells *ex vivo* or *in vitro* by a variety of methods including, for example, calcium phosphate precipitation, diethylaminoethyl dextran, polyethylene glycol (PEG), electroporation, direct injection, lipofection or viral infection (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring 25 Harbor Laboratory Press 1989); Kriegler M. *Gene Transfer ad Expression: A Laboratory Manual* (W. H. Freeman and Co, New York, N.Y., 1993) and Wu, *Methods in Enzymology* (Academic Press, New York, 1993), each of which is incorporated herein by reference). Alternatively, nucleic acid sequences of interest may be transferred into a cell 30 *in vivo* in a variety of vectors and by a variety of methods including, for example, direct administration of the nucleic acid into a subject (Williams *et al*, 1991 *PNAS* 88:2726-2730), or insertion of the nucleic acid into a viral vector and infection of the subject with

WO 02/02638

PCT/US01/21204

the virus (Battleman *et al*, 1993 *J Neurosci* 13:94-951; Carroll *et al*, 1993 *J Cell Biochem* 17E:241; Lebkowski *et al*, U.S. Patent 5,354,678; Davison and Elliott, *Molecular Virology: A Practical Approach* (IRL Press, New York, 1993)). Other methods used for *in vivo* transfer include encapsulation of the nucleic acid into liposomes, and direct transfer of the liposomes, or liposomes combined with a hemagglutinating Sendai virus, to a subject (U.S. Patent 5,824,655, incorporated by reference herein). The transfected or infected cells express the protein products encoded by the nucleic acid in order to ameliorate a disease or the symptoms of a disease.

10 In order that the invention herein described may be more fully understood the following description is set forth.

COMPOSITIONS AND METHODS OF THE INVENTION

15 The present invention provides compositions and methods for treating immune system diseases, such as rheumatic diseases, by administering to a subject an effective amount of a ligand that binds B7 for example, soluble CTLA4 molecules (such as CTLA4Ig and/or L104EA29YIg) and mAbs that recognize and bind B7. An effective amount is defined as the amount of soluble CTLA4 molecules that, when bound to B7 molecules on B7-
20 positive cells, inhibit B7 molecules from binding endogenous ligands such as CTLA4 and CD28.

In a preferred embodiment, the immune disease is a rheumatic disease. Rheumatic diseases are any diseases which are characterized by (i) inflammation or degeneration of
25 musculo-skeletal or connective tissue structures of the body, particularly the joints, and including muscles, tendons, cartilage, synovial and fibrous tissues, (ii) accompanied by joint swelling, joint tenderness, inflammation, morning stiffness, and/or pain, or impairment of locomotion or function of those structures and, in some cases, (iii) often accompanied by serological evidence of rheumatoid factor and other inflammatory
30 surrogate markers.

WO 02/02638

PCT/US01/21204

Rheumatic diseases include, but are not limited to, rheumatoid arthritis. The symptoms of rheumatoid arthritis include joint swelling, joint tenderness, inflammation, morning stiffness, and pain leading to physical disability. Subjects afflicted with the advanced stages of arthritis suffer from symptoms of structural damage and debilitating pain. Other organs also can be impaired by the autoimmune mechanism.

Compositions

10 The present invention provides compositions for treating immune diseases, such as rheumatic diseases, comprising soluble CTLA4 molecules. Further, the present invention provides compositions comprising a biological agent that inhibits T-cell function but not T-cell depletion in a human by contacting B7-positive cells in the human with a soluble CTLA4. Examples of soluble CTLA4 include CTLA4Ig and soluble CTLA4 mutant
15 molecule e.g. L104EA29YIg.

CTLA4 molecules, with mutant or wildtype sequences, may be rendered soluble by deleting the CTLA4 transmembrane segment (Oaks, M. K., et al., 2000 *Cellular Immunology* 201:144-153).

20 Alternatively, soluble CTLA4 molecules, with mutant or wildtype sequences, may be fusion proteins, wherein the CTLA4 molecules are fused to non-CTLA4 moieties such as immunoglobulin (Ig) molecules that render the CTLA4 molecules soluble. For example, a CTLA4 fusion protein may include the extracellular domain of CTLA4 fused to an
25 immunoglobulin constant domain, resulting in the CTLA4Ig molecule (Figure 24) (Linsley, P. S., et al., 1994 *Immunity* 1:793-80).

For clinical protocols, it is preferred that the immunoglobulin region does not elicit a detrimental immune response in a subject. The preferred moiety is the immunoglobulin
30 constant region, including the human or monkey immunoglobulin constant regions. One example of a suitable immunoglobulin region is human C γ 1, including the hinge, CH2

WO 02/02638

PCT/US01/21204

- and CH3 regions which can mediate effector functions such as binding to Fc receptors, mediating complement-dependent cytotoxicity (CDC), or mediate antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). The immunoglobulin moiety may have one or more mutations therein, (e.g., in the CH2 domain, to reduce effector functions such as CDC or
- 5 ADCC) where the mutation modulates the binding capability of the immunoglobulin to its ligand, by increasing or decreasing the binding capability of the immunoglobulin to Fc receptors. For example, mutations in the immunoglobulin may include changes in any or all its cysteine residues within the hinge domain, for example, the cysteines at positions +130, +136, and +139 are substituted with serine (Figure 24). The immunoglobulin
- 10 molecule may also include the proline at position +148 substituted with a serine, as shown in Figure 24. Further, the mutations in the immunoglobulin moiety may include having the leucine at position +144 substituted with phenylalanine, leucine at position +145 substituted with glutamic acid, or glycine at position +147 substituted with alanine.
- 15 Additional non-CTLA4 moieties for use in the soluble CTLA4 molecules or soluble CTLA4 mutant molecules include, but are not limited to, p97 molecule, env gp120 molecule, E7 molecule, and ova molecule (Dash, B. et al. 1994 *J. Gen. Virol.* 75 (Pt 6):1389-97; Ikeda, T., et al. 1994 *Gene* 138(1-2):193-6; Falk, K., et al. 1993 *Cell. Immunol.* 150(2):447-52; Fujisaka, K. et al. 1994 *Virology* 204(2):789-93). Other molecules are also possible
- 20 (Gerard, C. et al. 1994 *Neuroscience* 62(3):721; Bym, R. et al. 1989 63(10):4370; Smith, D. et al. 1987 *Science* 238:1704; Lasky, L. 1996 *Science* 233:209).

The soluble CTLA4 molecule of the invention can include a signal peptide sequence linked to the N-terminal end of the extracellular domain of the CTLA4 portion of the

25 molecule. The signal peptide can be any sequence that will permit secretion of the molecule, including the signal peptide from oncostatin M (Malik, et al., (1989) *Molec. Cell. Biol.* 9: 2847-2853), or CD5 (Jones, N. H. et al., (1986) *Nature* 323:346-349), or the signal peptide from any extracellular protein.

WO 02/02638

PCT/US01/21204

The soluble CTLA4 molecule of the invention can include the oncostatin M signal peptide linked at the N-terminal end of the extracellular domain of CTLA4, and the human immunoglobulin molecule (e.g., hinge, CH2 and CH3) linked to the C-terminal end of the extracellular domain (wildtype or mutated) of CTLA4. This molecule includes the oncostatin M signal peptide encompassing an amino acid sequence having methionine at position -26 through alanine at position -1, the CTLA4 portion encompassing an amino acid sequence having methionine at position +1 through aspartic acid at position +124, a junction amino acid residue glutamine at position +125, and the immunoglobulin portion encompassing an amino acid sequence having glutamic acid at position +126 through lysine at position +357.

Specifically, the soluble CTLA4 mutant molecules of the invention, comprising the mutated CTLA4 sequences described *infra*, are fusion molecules comprising human IgC γ 1 moieties fused to the mutated CTLA4 fragments.

In one embodiment, the soluble CTLA4 mutant molecules comprise IgC γ 1 fused to a CTLA4 fragment comprising a single-site mutation in the extracellular domain. The extracellular domain of CTLA4 comprises methionine at position +1 through aspartic acid at position +124 (e.g., Figure 23). The extracellular portion of the CTLA4 can comprise alanine at position -1 through aspartic acid at position +124 (e.g., Figure 23). Examples of single-site mutations include the following wherein the leucine at position +104 is changed to any other amino acid:

Single-site mutant:	Codon change:
L104EIg	Glutamic acid GAG
L104SIg	Serine AGT
L104TIg	Threonine ACG
L104AIg	Alanine GCG
L104Wlg	Tryptophan TGG
L104Qlg	Glutamine CAG

WO 02/02638

PCT/US01/21204

L104KIg	Lysine AAG
L104RIg	Arginine CGG
L104GIg	Glycine GGG

Further, the invention provides mutant molecules having the extracellular domain of CTLA4 with two mutations, fused to an Ig C_γ1 moiety. Examples include the following wherein the leucine at position +104 is changed to another amino acid (e.g. glutamic acid) and the glycine at position +105, the serine at position +25, the threonine at position +30 or the alanine at position +29 is changed to any other amino acid:

Double-site mutants:	Codon change:
L104EG105FIg	Phenylalanine TTC
L104EG105WIIg	Tryptophan TGG
L104EG105LIIg	Leucine CTT
L104ES25RIg	Arginine CGG
L104ET30GIg	Glycine GGG
L104ET30NIg	Asparagine AAT
L104EA29YIIg	Tyrosine TAT
L104EA29LIIg	Leucine TTG
L104EA29TIg	Threonine ACT
L104EA29WIIg	Tryptophan TGG

Further still, the invention provides mutant molecules having the extracellular domain of CTLA4 comprising three mutations, fused to an Ig C_γ1 moiety. Examples include the following wherein the leucine at position +104 is changed to another amino acid (e.g. glutamic acid), the alanine at position +29 is changed to another amino acid (e.g. tyrosine) and the serine at position +25 is changed to another amino acid:

Triple-site Mutants:	Codon changes:
L104EA29YS25KIg	Lysine AAA

WO 02/02638

PCT/US01/21204

L104EA29YS25KIg	Lysine AAG
L104EA29YS25NIg	Asparagine AAC
L104EA29YS25RIg	Arginine CGG

Soluble CTLA4 mutant molecules may have a junction amino acid residue which is located between the CTLA4 portion and the Ig portion of the molecule. The junction amino acid can be any amino acid, including glutamine. The junction amino acid can be introduced by molecular or chemical synthesis methods known in the art.

The present invention provides CTLA4 mutant molecules including a signal peptide sequence linked to the N-terminal end of the extracellular domain of the CTLA4 portion of the mutant molecule. The signal peptide can be any sequence that will permit secretion of the mutant molecule, including the signal peptide from oncostatin M (Malik, et al., 1989 *Molec. Cell. Biol.* 9: 2847-2853), or CD5 (Jones, N. H. et al., 1986 *Nature* 323:346-349), or the signal peptide from any extracellular protein.

The invention provides soluble CTLA4 mutant molecules comprising a single-site mutation in the extracellular domain of CTLA4 such as L104EIg (as included in Figure 18) or L104SIg, wherein L104EIg and L104SIg are mutated in their CTLA4 sequences so that leucine at position +104 is substituted with glutamic acid or serine, respectively. The single-site mutant molecules further include CTLA4 portions encompassing methionine at position +1 through aspartic acid at position +124, a junction amino acid residue glutamine at position +125, and an immunoglobulin portion encompassing glutamic acid at position +126 through lysine at position +357. The immunoglobulin portion of the mutant molecule may also be mutated so that the cysteines at positions +130, +136, and +139 are substituted with serine, and the proline at position +148 is substituted with serine. Alternatively, the single-site soluble CTLA4 mutant molecule may have a CTLA4 portion encompassing alanine at position -1 through aspartic acid at position +124.

The invention provides soluble CTLA4 mutant molecules comprising a double-site

WO 02/02638

PCT/US01/21204

mutation in the extracellular domain of CTLA4, such as L104EA29YIg, L104EA29LIg, L104EA29TIg or L104EA29Wlg, wherein leucine at position +104 is substituted with a glutamic acid and alanine at position +29 is changed to tyrosine, leucine, threonine and tryptophan, respectively. The sequences for L104EA29YIg, L104EA29LIg, L104EA29TIg and L104EA29Wlg, starting at methionine at position +1 and ending with lysine at position +357, plus a signal (leader) peptide sequence are included in the sequences as shown in Figures 19-22 respectively. The double-site mutant molecules further comprise CTLA4 portions encompassing methionine at position +1 through aspartic acid at position +124, a junction amino acid residue glutamine at position +125, and an immunoglobulin portion encompassing glutamic acid at position +126 through lysine at position +357. The immunoglobulin portion of the mutant molecule may also be mutated, so that the cysteines at positions +130, +136, and +139 are substituted with serine, and the proline at position +148 is substituted with serine. Alternatively, these mutant molecules can have a CTLA4 portion encompassing alanine at position -1 through aspartic acid at position +124.

The invention provides soluble CTLA4 mutant molecules comprising a double-site mutation in the extracellular domain of CTLA4, such as L104EG105FIg, L104EG105Wlg and L104EG105LIg, wherein leucine at position +104 is substituted with a glutamic acid and glycine at position +105 is substituted with phenylalanine, tryptophan and leucine, respectively. The double-site mutant molecules further comprise CTLA4 portions encompassing methionine at position +1 through aspartic acid at position +124, a junction amino acid residue glutamine at position +125, and an immunoglobulin portion encompassing glutamic acid at position +126 through lysine at position +357. The immunoglobulin portion of the may also be mutated, so that the cysteines at positions +130, +136, and +139 are substituted with serine, and the proline at position +148 is substituted with serine. Alternatively, these mutant molecules can have a CTLA4 portion encompassing alanine at position -1 through aspartic acid at position +124.

The invention provides L104ES25RIg which is a double-site mutant molecule including a CTLA4 portion encompassing methionine at position +1 through aspartic acid at position

WO 02/02638

PCT/US01/21204

+124, a junction amino acid residue glutamine at position +125, and the immunoglobulin portion encompassing glutamic acid at position +126 through lysine at position +357. The portion having the extracellular domain of CTLA4 is mutated so that serine at position +25 is substituted with arginine, and leucine at position +104 is substituted with glutamic acid.

5 Alternatively, L104ES25RIg can have a CTLA4 portion encompassing alanine at position -1 through aspartic acid at position +124.

The invention provides soluble CTLA4 mutant molecules comprising a double-site mutation in the extracellular domain of CTLA4, such as L104ET30GIg and

10 L104ET30NIg, wherein leucine at position +104 is substituted with a glutamic acid and threonine at position +30 is substituted with glycine and asparagine, respectively. The double-site mutant molecules further comprise CTLA4 portions encompassing methionine at position +1 through aspartic acid at position +124, a junction amino acid residue glutamine at position +125, and an immunoglobulin portion encompassing

15 glutamic acid at position +126 through lysine at position +357. The immunoglobulin portion of the mutant molecule may also be mutated, so that the cysteines at positions +130, +136, and +139 are substituted with serine, and the proline at position +148 is substituted with serine. Alternatively, these mutant molecules can have a CTLA4 portion encompassing alanine at position -1 through aspartic acid at position +124.

20 The invention provides soluble CTLA4 mutant molecules comprising a triple-site mutation in the extracellular domain of CTLA4, such as L104EA29YS25KIg, L104EA29YS25NIg, L104EA29YS25RIg, wherein leucine at position +104 is substituted with a glutamic acid, alanine at position +29 is changed to tyrosine and serine at position

25 +25 is changed to lysine, asparagine and arginine, respectively. The triple-site mutant molecules further comprise CTLA4 portions encompassing methionine at position +1 through aspartic acid at position +124, a junction amino acid residue glutamine at position +125, and an immunoglobulin portion encompassing glutamic acid at position +126 through lysine at position +357. The immunoglobulin portion of the mutant

30 molecule may also be mutated, so that the cysteines at positions +130, +136, and +139 are substituted with serine, and the proline at position +148 is substituted with serine.

WO 02/02638

PCT/US01/21204

Alternatively, these mutant molecules can have a CTLA4 portion encompassing alanine at position -1 through aspartic acid at position +124.

- Additional embodiments of soluble CTLA4 mutant molecules include chimeric CTLA4/CD28 homologue mutant molecules that bind a B7 (Peach, R. J., *et al.*, 1994 *J Exp Med* 180:2049-2058). Examples of these chimeric CTLA4/CD28 mutant molecules include HS1, HS2, HS3, HS4, HS5, HS6, HS4A, HS4B, HS7, HS8, HS9, HS10, HS11, HS12, HS13 and HS14 (U.S. patent number 5,773,253)
- 10 Preferred embodiments of the invention are soluble CTLA4 molecules such as CTLA4Ig (as shown in Figure 24, starting at methionine at position +1 and ending at lysine at position +357) and soluble CTLA4 mutant L104EA29YIg (as shown in Figure 19, starting at methionine at position +1 and ending at lysine at position +357). The invention further provides nucleic acid molecules comprising nucleotide sequences encoding the amino acid sequences corresponding to the soluble CTLA4 molecules of the invention.
- 15 In one embodiment, the nucleic acid molecule is a DNA (e.g., cDNA) or a hybrid thereof. DNA encoding CTLA4Ig (Figure 24) was deposited on May 31, 1991 with the American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 and has been accorded ATCC accession number ATCC 68629. DNA encoding
- 20 L104EA29YIg (sequence included in Figure 19) was deposited on June 19, 2000 with ATCC and has been accorded ATCC accession number PTA-2104. Alternatively, the nucleic acid molecules are RNA or a hybrid thereof.

- Additionally, the invention provides a vector, which comprises the nucleotide sequences of the invention. Examples of expression vectors for include, but are not limited to,
- 25 vectors for mammalian host cells (e.g., BPV-1, pHyg, pRSV, pSV2, pTK2 (Maniatis); pIRES (Clontech); pRc/CMV2, pRc/RSV, pSFV1 (Life Technologies); pVPakc Vectors, pCMV vectors, pSG5 vectors (Stratagene)), retroviral vectors (e.g., pFB vectors (Stratagene)), pCDNA-3 (Invitrogen) or modified forms thereof, adenoviral vectors;
- 30 adeno-associated virus vectors, baculovirus vectors, yeast vectors (e.g., pESC vectors (Stratagene)).

WO 02/02638

PCT/US01/21204

A host vector system is also provided. The host vector system comprises the vector of the invention in a suitable host cell. Examples of suitable host cells include, but are not limited to, prokaryotic and eukaryotic cells. In accordance with the practice of the invention, eukaryotic cells are also suitable host cells. Examples of eukaryotic cells include any animal cell, whether primary or immortalized, yeast (e.g., Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, and Pichia pastoris), and plant cells. Myeloma, COS and CHO cells are examples of animal cells that may be used as hosts. Particular CHO cells include, but are not limited to, 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 cell line (Clontech), CHO designated ECACC 85050302 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), CHO clone 13 (GEIMG, Genova, IT), CHO clone B (GEIMG, Genova, IT), CHO-K1/SF designated ECACC 93061607 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), and RR-CHOK1 designated ECACC 92052129 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK). Exemplary plant cells include tobacco (whole plants, cell culture, or callus), corn, soybean, and rice cells. Corn, soybean, and rice seeds are also acceptable.

The CTLA4 mutant molecules of the invention may be isolated as naturally-occurring polypeptides, or from any source whether natural, synthetic, semi-synthetic or recombinant. Accordingly, the CTLA4 mutant polypeptide molecules may be isolated as naturally-occurring proteins from any species, particularly mammalian, including bovine, ovine, porcine, murine, equine, and preferably human. Alternatively, the CTLA4 mutant polypeptide molecules may be isolated as recombinant polypeptides that are expressed in prokaryote or eukaryote host cells, or isolated as a chemically synthesized polypeptide.

A skilled artisan can readily employ standard isolation methods to obtain isolated CTLA4 mutant molecules. The nature and degree of isolation will depend on the source and the intended use of the isolated molecules.

CTLA4 mutant molecules and fragments or derivatives thereof, can be produced by recombinant methods. Accordingly, an isolated nucleotide sequence encoding wild-type

WO 02/02638

PCT/US01/21204

CTLA4 molecules may be manipulated to introduce mutations, resulting in nucleotide sequences that encode the CTLA4 mutant polypeptide molecules. For example, the nucleotide sequences encoding the CTLA4 mutant molecules may be generated by site-directed mutagenesis methods, using primers and PCR amplification. The primers can include specific sequences designed to introduce desired mutations. Alternatively, the primers can be designed to include randomized or semi-randomized sequences to introduce random mutations. Standard recombinant methods (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, Sambrook, Fritsch, and Maniatis 1989, Cold Spring Harbor Press) and PCR technology (U. S. Patent No. 4,603,102) can be employed for generating and isolating CTLA4 mutant polynucleotides encoding CTLA4 mutant polypeptides.

The invention includes pharmaceutical compositions for use in the treatment of immune system diseases comprising pharmaceutically effective amounts of soluble CTLA4 molecules. In certain embodiments, the immune system diseases are mediated by CD28/CTLA4/B7 interactions. The soluble CTLA4 molecules are preferably soluble CTLA4 molecules with wildtype sequence and/or soluble CTLA4 molecules having one or more mutations in the extracellular domain of CTLA4. The pharmaceutical composition can include soluble CTLA4 protein molecules and/or nucleic acid molecules, and/or vectors encoding the molecules. In preferred embodiments, the soluble CTLA4 molecules have the amino acid sequence of the extracellular domain of CTLA4 as shown in either Figures 24 or 19 (CTLA4Ig or L104EA29Y, respectively). Even more preferably, the soluble CTLA4 mutant molecule is L104EA29YIg as disclosed herein. The compositions may additionally include other therapeutic agents, including, but not limited to, drug toxins, enzymes, antibodies, or conjugates.

As is standard practice in the art, pharmaceutical compositions, comprising the molecules of the invention admixed with an acceptable carrier or adjuvant which is known to those of skill of the art, are provided. The pharmaceutical compositions preferably include suitable carriers and adjuvants which include any material which when combined with the molecule of the invention (e.g., a soluble CTLA4 molecule, such as, CTLA4Ig or

WO 02/02638

PCT/US01/21204

L104EA29Y) retains the molecule's activity and is non-reactive with the subject's immune system. These carriers and adjuvants include, but are not limited to, ion exchangers, alumina, aluminum stearate, lecithin, serum proteins, such as human serum albumin, buffer substances such as phosphates, glycine, sorbic acid, potassium sorbate, partial glyceride mixtures of saturated vegetable fatty acids, phosphate buffered saline solution, water, emulsions (e.g. oil/water emulsion), salts or electrolytes such as protamine sulfate, disodium hydrogen phosphate, potassium hydrogen phosphate, sodium chloride, zinc salts, colloidal silica, magnesium trisilicate, polyvinyl pyrrolidone, cellulose-based substances and polyethylene glycol. Other carriers may also include sterile solutions; tablets, including coated tablets and capsules. Typically such carriers contain excipients such as starch, milk, sugar (e.g. sucrose, glucose, maltose), certain types of clay, gelatin, stearic acid or salts thereof, magnesium or calcium stearate, talc, vegetable fats or oils, gums, glycols, or other known excipients. Such carriers may also include flavor and color additives or other ingredients. Compositions comprising such carriers are formulated by well known conventional methods. Such compositions may also be formulated within various lipid compositions, such as, for example, liposomes as well as in various polymeric compositions, such as polymer microspheres.

Methods

The invention provides methods for regulating functional CTLA4- and CD28- positive cell interactions with B7-positive cells. The methods comprise contacting the B7-positive cells with a soluble CTLA4 molecule of the invention so as to form soluble CTLA4/B7 complexes, the complexes interfering with reaction of an endogenous CTLA4 and/or CD28 molecule with a B7 molecule.

The present invention also provides methods for inhibiting T-cell function but not T-cell depletion in a human by contacting B7-positive cells in the human with a soluble CTLA4. Examples of soluble CTLA4 include CTLA4Ig and soluble CTLA4 mutant molecule e.g. L104EA29YIg.

WO 02/02638

PCT/US01/21204

The present invention further provides methods for treating immune system diseases such as rheumatic diseases. The methods comprise administering a therapeutic composition, comprising soluble CTLA4 molecules of the invention, to a subject in an amount effective to relieve at least one of the symptoms associated with immune system diseases.

5 Additionally, the invention may provide long-term therapy for immune system diseases by blocking the T-cell/B7-positive cell interactions, thereby blocking T-cell stimulation by co-stimulatory signals such as B7 binding to CD28, leading to induction of T-cell anergy or tolerance. Immune system diseases include, but are not limited to, autoimmune diseases, immunoproliferative diseases, and graft-related disorders. Examples of graft-related diseases include graft versus host disease (GVHD) (e.g., such as may result from 10 bone marrow transplantation, or in the induction of tolerance), immune disorders associated with graft transplantation rejection, chronic rejection, and tissue or cell allo- or xenografts, including solid organs, skin, islets, muscles, hepatocytes, neurons. Examples of immunoproliferative diseases include, but are not limited to, psoriasis; T cell lymphoma; T cell acute lymphoblastic leukemia; testicular angiocentric T cell lymphoma; benign lymphocytic angitis; and autoimmune diseases such as lupus (e.g., lupus erythematosus, lupus nephritis), Hashimoto's thyroiditis, primary myxedema, Graves' disease, pernicious anemia, autoimmune atrophic gastritis, Addison's disease, diabetes (e.g. insulin dependent diabetes mellitus, type I diabetes mellitus, type II diabetes 20 mellitus), good pasture's syndrome, myasthenia gravis, pemphigus, Crohn's disease, sympathetic ophthalmia, autoimmune uveitis, multiple sclerosis, autoimmune hemolytic anemia, idiopathic thrombocytopenia, primary biliary cirrhosis, chronic action hepatitis, ulceratis colitis, Sjogren's syndrome, rheumatic diseases (e.g., rheumatoid arthritis), polymyositis, scleroderma, and mixed connective tissue disease.

25 The soluble CTLA4 molecules of the invention exhibit inhibitory properties *in vivo*. Under conditions where T-cell/B7-positive cell interactions, for example T cell/B cell interactions, are occurring as a result of contact between T cells and B7-positive cells, binding of introduced CTLA4 molecules to react to B7-positive cells, for example B 30 cells, may interfere, i.e., inhibit, the T cell/ B7-positive cell interactions resulting in regulation of immune responses.

WO 02/02638

PCT/US01/21204

The invention provides methods for downregulating immune responses. Down regulation of an immune response by the soluble CTLA4 molecules of the invention may be by way of inhibiting or blocking an immune response already in progress or may involve preventing the induction of an immune response. The soluble CTLA4 molecules of the invention may inhibit the functions of activated T cells, such as T lymphocyte proliferation and cytokine secretion, by suppressing T cell responses or by inducing specific tolerance in T cells, or both. Further, the soluble CTLA4 molecules of this invention, interfering with the CTLA4/CD28/B7 pathway may inhibit T-cell proliferation and/or cytokine secretion, and thus result in reduced tissue destruction and induction of T-cell unresponsiveness or anergy.

A preferred embodiment of the invention comprises use of the soluble CTLA4 mutant molecule L104EA29YIg to regulate functional CTLA4- and CD28- positive cell interactions with B7-positive cells, to treat immune system diseases such as rheumatic diseases and/or to downregulate immune responses. The L104EA29YIg of the invention is a soluble CTLA4 mutant molecule comprising at least the two amino acid changes, the leucine (L) to glutamic acid (E) at position +104 and the alanine (A) to tyrosine (Y) change at position +29. The L104EA29YIg molecule may encompass further mutations beyond the two specified herein.

A preferred embodiment includes methods for treating a rheumatic disease, such as rheumatoid arthritis, by administering an effective amount of soluble CTLA4 molecules to a subject. Administration of an effective amount of the therapeutic composition, thereby relieving the subject of at least one of the symptoms associated with the disease, including reducing: joint swelling, joint tenderness, inflammation, morning stiffness, and pain, and structural damage subsequently decreasing the physical disability. The methods of the invention also may be used to reduce at least one symptom associated with rheumatoid arthritis, including reducing erythrocyte sedimentation rates, serum levels of C-reactive protein, soluble ICAM-1, soluble E-selectin and/or soluble IL-2r.

WO 02/02638

PCT/US01/21204

The amount of symptom relief provided by the present invention can be measured using any of the accepted criteria established to measure and document symptom relief in a clinical setting. Acceptable criteria for measuring symptom relief may include scores based on the criteria established by the American College of Rheumatology (e.g., ACR 5 20), the four measures of symptom relief (in: "CDER Guideline for the Clinical Evaluation of Anti-Inflammatory and Antirheumatic Drugs—FDA 1988), and the Health Assessment Questionnaire (HAQ) (Fries, J. F., et al., 1982 *J. of Rheumatology* 9:789-793). For a general description of these criteria, see "Guidance for Industry: Clinical Development Programs for Drugs, Devices, and Biological products for the Treatment of 10 Rheumatoid Arthritis (RA)", February 1999.

The subjects treated by the present invention include mammalian subjects, including, human, monkey, ape, dog, cat, cow, horse, rabbit, mouse and rat.

15 The present invention provides various methods, local or systemic, for administering the soluble CTLA4 molecule. The methods include intravenous, intramuscular, intraperitoneal, oral, inhalation and subcutaneous methods, as well as implantable pump, continuous infusion, gene therapy, liposomes, suppositories, topical contact, vesicles, capsules and injection methods. The therapeutic agent, compounded with a carrier, is 20 commonly lyophilized for storage and is reconstituted with water or a buffered solution with a neutral pH (about pH 7-8, e.g., pH 7.5) prior to administration.

As is standard practice in the art, the compositions of the invention may be administered to the subject in any pharmaceutically acceptable form.

25 In accordance with the practice of the invention, the methods comprise administering to a subject the soluble CTLA4 molecules of the invention to regulate CD28- and/or CTLA4-positive cell interactions with B7-positive cells. The B7-positive cells are contacted with an effective amount of the soluble CTLA4 molecules of the invention, or fragments or 30 derivatives thereof, so as to form soluble CTLA4/B7 complexes. The complexes interfere with interaction between endogenous CTLA4 and CD28 molecules with B7 family

WO 02/02638

PCT/US01/21204

molecules.

The soluble CTLA4 molecules may be administered to a subject in an amount and for a time (e.g. length of time and/or multiple times) sufficient to block endogenous B7 molecules from binding their respective ligands, in the subject. Blockage of endogenous B7/ligand binding thereby inhibiting interactions between B7-positive cells with CD28- and/or CTLA4-positive cells.

Dosage of a therapeutic agent is dependant upon many factors including, but not limited to, the type of tissue affected, the type of autoimmune disease being treated, the severity of the disease, a subject's health and response to the treatment with the agents. Accordingly, dosages of the agents can vary depending on each subject and the mode of administration. The soluble CTLA4 molecules may be administered in an amount between 0.1 to 20.0 mg/kg weight of the patient/day, preferably between 0.5 to 10.0 mg/kg/day.

The invention also encompasses the use of the compositions of the invention together with other pharmaceutical agents to treat immune system diseases. For example, rheumatic diseases may be treated with molecules of the invention in conjunction with, but not limited to, immunosuppressants such as corticosteroids, cyclosporin (Mathiesen 1989 *Cancer Lett.* 44(2):151-156), prednisone, azathioprine, methotrexate (R. Handschumacher, in: "Drugs Used for Immunosuppression" pages 1264-1276), TNF α blockers or antagonists (New England Journal of Medicine, vol. 340: 253-259, 1999; The Lancet vol. 354: 1932-39, 1999, Annals of Internal Medicine, vol. 130: 478-486), or any other biological agent targeting any inflammatory cytokine, nonsteroidal antiinflammatory drugs/Cox-2 inhibitors, hydroxychloroquine, sulphasalazopyrine, gold salts, etanercept, infliximab, rapamycin, mycophenolate mofetil, azathioprine, tacrolimus, basiliximab, cytoxan, interferon beta-1a, interferon beta-1b, glatiramer acetate, mitoxantrone hydrochloride, anakinra and/or other biologics.

30

WO 02/02638

PCT/US01/21204

The soluble CTLA4 molecules (preferably, L104EA29YIg) can also be used in combination with one or more of the following agents to regulate an immune response: soluble gp39 (also known as CD40 ligand (CD40L), CD154, T-BAM, TRAP), soluble CD29, soluble CD40, soluble CD80 (e.g. ATCC 68627), soluble CD86, soluble CD28 5 (e.g. 68628), soluble CD56, soluble Thy-1, soluble CD3, soluble TCR, soluble VLA-4, soluble VCAM-1, soluble LECAM-1, soluble ELAM-1, soluble CD44, antibodies reactive with gp39 (e.g. ATCC HB-10916, ATCC HB-12055 and ATCC HB-12056), antibodies reactive with CD40 (e.g. ATCC HB-9110), antibodies reactive with B7 (e.g. ATCC HB-253, ATCC CRL-2223, ATCC CRL-2226, ATCC HB-301; ATCC HB-10 11341, etc), antibodies reactive with CD28 (e.g. ATCC HB-11944 or mAb 9.3 as described by Martin et al (J. Clin. Immun. 4(1):18-22, 1980), antibodies reactive with LFA-1 (e.g. ATCC HB-9579 and ATCC TIB-213), antibodies reactive with LFA-2, antibodies reactive with IL-2, antibodies reactive with IL-12, antibodies reactive with IFN-gamma, antibodies reactive with CD2, antibodies reactive with CD48, antibodies 15 reactive with any ICAM (e.g., ICAM-1 (ATCC CRL-2252), ICAM-2 and ICAM-3), antibodies reactive with CTLA4 (e.g. ATCC HB-304), antibodies reactive with Thy-1, antibodies reactive with CD56, antibodies reactive with CD3, antibodies reactive with CD29, antibodies reactive with TCR, antibodies reactive with VLA-4, antibodies reactive with VCAM-1, antibodies reactive with LECAM-1, antibodies reactive with ELAM-1, 20 antibodies reactive with CD44. In certain embodiments, monoclonal antibodies are preferred. In other embodiments, antibody fragments are preferred. As persons skilled in the art will readily understand, the combination can include the soluble CTLA4 molecules of the invention and one other immunosuppressive agent, the soluble CTLA4 molecules with two other immunosuppressive agents, the soluble CTLA4 molecules with 25 three other immunosuppressive agents, etc. The determination of the optimal combination and dosages can be determined and optimized using methods well known in the art.

Some specific combinations include the following: L104EA29YIg and CD80 30 monoclonal antibodies (mAbs); L104EA29YIg and CD86 mAbs; L104EA29YIg, CD80 mAbs, and CD86 mAbs; L104EA29YIg and gp39 mAbs; L104EA29YIg and CD40

WO 02/02638

PCT/US01/21204

mAbs; L104EA29YIg and CD28 mAbs; L104EA29YIg, CD80 and CD86 mAbs, and gp39 mAbs; L104EA29YIg, CD80 and CD86 mAbs and CD40 mAbs; and L104EA29YIg, anti-LFA1 mAb, and anti-gp39 mAb. A specific example of a gp39 mAb is MR1. Other combinations will be readily appreciated and understood by persons skilled in the art.

The soluble CTLA4 molecules of the invention, for example L104EA29YIg, may be administered as the sole active ingredient or together with other drugs in immunomodulating regimens or other anti-inflammatory agents e.g. for the treatment or prevention of allo- or xenograft acute or chronic rejection or inflammatory or autoimmune disorders, or to induce tolerance. For example, it may be used in combination with a calcineurin inhibitor, e.g. cyclosporin A or FK506; an immunosuppressive macrolide, e.g. rapamycin or a derivative thereof; e.g. 40-O-(2-hydroxy)ethyl-rapamycin, a lymphocyte homing agent, e.g. FTY720 or an analog thereof; corticosteroids; cyclophosphamide; azathioprene; methotrexate; leflunomide or an analog thereof; mizoribine; mycophenolic acid; mycophenolate mofetil; 15-deoxyspergualine or an analog thereof; immunosuppressive monoclonal antibodies, e.g., monoclonal antibodies to leukocyte receptors, e.g., MHC, CD2, CD3, CD4, CD 11a/CD18, CD7, CD25, CD 27, B7, CD40, CD45, CD58, CD 137, ICOS, CD150 (SLAM), OX40, 4-1BB or their ligands; or other immunomodulatory compounds, e.g. CTLA4/CD28-Ig, or other adhesion molecule inhibitors, e.g. mAbs or low molecular weight inhibitors including LFA-1 antagonists, Selectin antagonists and VLA-4 antagonists. The compound is particularly useful in combination with a compound that interferes with CD40 and its ligand, e.g. antibodies to CD40 and antibodies to CD40-L.

Where the soluble CTLA4 mutant molecules of the invention are administered in conjunction with other immunosuppressive/immunomodulatory or anti-inflammatory therapy, e.g. as hereinabove specified, dosages of the co-administered immunosuppressant, immunomodulatory or anti-inflammatory compound will of course vary depending on the type of co-drug employed, e.g. whether it is a steroid or a cyclosporin, on the specific drug employed, on the condition being treated and so forth.

WO 02/02638

PCT/US01/21204

In accordance with the foregoing the present invention provides in a yet further aspect methods as defined above comprising co-administration, e.g. concomitantly or in sequence, of a therapeutically effective amount of soluble CTLA4 molecules of the invention, e.g. CTLA4Ig and/or L104EA29YIg, in free form or in pharmaceutically acceptable salt form, and a second drug substance, said second drug substance being an immunosuppressant, immunomodulatory or anti-inflammatory drug, e.g. as indicated above. Further provided are therapeutic combinations, e.g. a kit, e.g. for use in any method as defined above, comprising a soluble CTLA4 molecule, in free form or in pharmaceutically acceptable salt form, to be used concomitantly or in sequence with at least one pharmaceutical composition comprising an immunosuppressant, immunomodulatory or anti-inflammatory drug. The kit may comprise instructions for its administration.

The invention also provides methods for producing the soluble CTLA4 mutant molecules of the invention. Expression of soluble CTLA4 mutant molecules can be in prokaryotic cells or eukaryotic cells.

Prokaryotes most frequently are represented by various strains of bacteria. The bacteria may be a gram positive or a gram negative. Typically, gram-negative bacteria such as E. coli are preferred. Other microbial strains may also be used. Sequences encoding soluble CTLA4 mutant molecules can be inserted into a vector designed for expressing foreign sequences in prokaryotic cells such as E. coli. These vectors can include commonly used prokaryotic control sequences which are defined herein to include promoters for transcription initiation, optionally with an operator, along with ribosome binding site sequences, including such commonly used promoters as the beta-lactamase (penicillinase) and lactose (lac) promoter systems (Chang, et al., (1977) Nature 198:1056), the tryptophan (trp) promoter system (Goeddel, et al., (1980) Nucleic Acids Res. 8:4057) and the lambda derived P_L promoter and N-gene ribosome binding site (Shimatake, et al., (1981) Nature 292:128).

WO 02/02638

PCT/US01/21204

Such expression vectors will also include origins of replication and selectable markers, such as a beta-lactamase or neomycin phosphotransferase gene conferring resistance to antibiotics, so that the vectors can replicate in bacteria and cells carrying the plasmids can be selected for when grown in the presence of antibiotics, such as ampicillin or
5 kanamycin.

The expression plasmid can be introduced into prokaryotic cells via a variety of standard methods, including but not limited to CaCl₂-shock (Cohen, (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2110, and Sambrook et al. (eds.), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual",
10 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, (1989)) and electroporation.

In accordance with the practice of the invention, eukaryotic cells are also suitable host cells. Examples of eukaryotic cells include any animal cell, whether primary or immortalized, yeast (e.g., Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, and
15 Pichia pastoris), and plant cells. Myeloma, COS and CHO cells are examples of animal cells that may be used as hosts. Particular CHO cells include, but are not limited to, 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 cell line (Clontech), CHO designated ECACC 85050302 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK),
20 CHO clone 13 (GEIMG, Genova, IT), CHO clone B (GEIMG, Genova, IT), CHO-K1/SF designated ECACC 93061607 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), and RR-CHOK1 designated ECACC 92052129 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK). Exemplary plant cells include tobacco (whole plants, cell culture, or callus), corn, soybean, and rice cells. Corn, soybean, and rice seeds are also acceptable.

25

Nucleic acid sequences encoding the CTLA4 mutant molecules can also be inserted into a vector designed for expressing foreign sequences in an eukaryotic host. The regulatory elements of the vector can vary according to the particular eukaryotic host.

30 Commonly used eukaryotic control sequences for use in expression vectors include promoters and control sequences compatible with mammalian cells such as, for example,

WO 02/02638

PCT/US01/21204

CMV promoter (CDM8 vector) and avian sarcoma virus (ASV) (μ LN vector). Other commonly used promoters include the early and late promoters from Simian Virus 40 (SV40) (Fiers, et al., (1973) Nature 273:113), or other viral promoters such as those derived from polyoma, Adenovirus 2, and bovine papilloma virus. An inducible promoter, such as hMTII (Karin, et al., (1982) Nature 299:797-802) may also be used.

Vectors for expressing CTLA4 mutant molecules in eukaryotes may also carry sequences called enhancer regions. These are important in optimizing gene expression and are found either upstream or downstream of the promoter region.

10

Examples of expression vectors for eukaryotic host cells include, but are not limited to, vectors for mammalian host cells (e.g., BPV-1, pHyg, pRSV, pSV2, pTK2 (Maniatis); pIRES (Clontech); pRc/CMV2, pRc/RSV, pSFV1 (Life Technologies); pVPack Vectors, pCMV vectors, pSG5 vectors (Stratagene)), retroviral vectors (e.g., pFB vectors (Stratagene)), pCDNA-3 (Invitrogen) or modified forms thereof, adenoviral vectors; Adeno-associated virus vectors, baculovirus vectors, yeast vectors (e.g., pESC vectors (Stratagene)).

15

Nucleic acid sequences encoding CTLA4 mutant molecules can integrate into the genome of the eukaryotic host cell and replicate as the host genome replicates. Alternatively, the vector carrying CTLA4 mutant molecules can contain origins of replication allowing for extrachromosomal replication.

20

For expressing the nucleic acid sequences in Saccharomyces cerevisiae, the origin of replication from the endogenous yeast plasmid, the 2 μ circle can be used. (Broach, (1983) Meth. Enz. 101:307). Alternatively, sequences from the yeast genome capable of promoting autonomous replication can be used (see, for example, Stinchcomb et al., (1979) Nature 282:39); Tschemper et al., (1980) Gene 10:157; and Clarke et al., (1983) Meth. Enz. 101:300).

25
30

WO 02/02638

PCT/US01/21204

Transcriptional control sequences for yeast vectors include promoters for the synthesis of glycolytic enzymes. (Hess et al., (1968) J. Adv. Enzyme Reg. 7:149; Holland et al., (1978) Biochemistry 17:4900). Additional promoters known in the art include the CMV promoter provided in the CDM8 vector (Toyama and Okayama, (1990) FEBS 268:217-221); the promoter for 3-phosphoglycerate kinase (Hitzeman et al., (1980) J. Biol. Chem. 255:2073), and those for other glycolytic enzymes.

Other promoters are inducible because they can be regulated by environmental stimuli or by the growth medium of the cells. These inducible promoters include those from the genes for heat shock proteins, alcohol dehydrogenase 2, isocytochrome C, acid phosphatase, enzymes associated with nitrogen catabolism, and enzymes responsible for maltose and galactose utilization.

Regulatory sequences may also be placed at the 3' end of the coding sequences. These sequences may act to stabilize messenger RNA. Such terminators are found in the 3' untranslated region following the coding sequences in several yeast-derived and mammalian genes.

Exemplary vectors for plants and plant cells include, but are not limited to, *Agrobacterium* T₁ plasmids, cauliflower mosaic virus (CaMV), and tomato golden mosaic virus (TGMV).

General aspects of mammalian cell host system transformations have been described by Axel (U.S. Patent No. 4,399,216 issued Aug. 16, 1983). Mammalian cells can be transformed by methods including but not limited to, transfection in the presence of calcium phosphate, microinjection, electroporation, or via transduction with viral vectors.

Methods for introducing foreign DNA sequences into plant and yeast genomes include (1) mechanical methods, such as microinjection of DNA into single cells or protoplasts, vortexing cells with glass beads in the presence of DNA, or shooting DNA-coated tungsten or gold spheres into cells or protoplasts; (2) introducing DNA by making cell

WO 02/02638

PCT/US01/21204

membranes permeable to macromolecules through polyethylene glycol treatment or subjection to high voltage electrical pulses (electroporation); or (3) the use of liposomes (containing cDNA) which fuse to cell membranes.

- 5 Once the CTLA4 mutant molecules of the inventions are expressed, they can be harvested by methods well known in the art such as cell lysis (e.g. sonication, lysozyme and/or detergents) and protein recovery performed using standard protein purification means, e.g., affinity chromatography or ion-exchange chromatography, to yield substantially pure product (R. Scopes in: "Protein Purification, Principles and Practice",
10 Third Edition, Springer-Verlag (1994); Sambrook et al. (eds.), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, (1989)). Expression of CTLA4 mutant molecules can be detected by methods known in the art. For example, the mutant molecules can be detected by Coomassie staining SDS-PAGE gels and immunoblotting using antibodies that bind CTLA4.

15

The following examples are presented to illustrate the present invention and to assist one of ordinary skill in making and using the same. The examples are not intended in any way to otherwise limit the scope of the invention.

20 EXAMPLE 1

The following provides a description of the methods used to generate the nucleotide sequences encoding the CTLA4 molecules of the invention.

- 25 A CTLA4Ig encoding plasmid was first constructed, and shown to express CTLA4Ig molecules as described in U.S. Patent Nos. 5,434,131, 5,885,579 and 5,851,795. Then single-site mutant molecules (e.g., L104EIg) were generated from the CTLA4Ig encoding sequence, expressed and tested for binding kinetics for various B7 molecules. The L104EIg nucleotide sequence (as included in the sequence shown in Figure 18) was used
30 as a template to generate the double-site CTLA4 mutant sequences (as included in the sequences shown in Figures 19-22) which were expressed as proteins and tested for

WO 02/02638

PCT/US01/21204

binding kinetics. The double-site CTLA4 mutant sequences include: L104EA29YIg, L104EA29LIg, L104EA29TIg, and L104EA29WIIg. Triple-site mutants were also generated.

5 CTLA4Ig Construction

A genetic construct encoding CTLA4Ig comprising the extracellular domain of CTLA4 and an IgCgamma1 domain was constructed as described in U.S. Patents 5,434,131, 5,844,095 and 5,851,795, the contents of which are incorporated by reference herein. The extracellular domain of the CTLA4 gene was cloned by PCR using synthetic oligonucleotides corresponding to the published sequence (Dariavach et al., Eur. Journ. Immunol. 18:1901-1905 (1988)).

Because a signal peptide for CTLA4 was not identified in the CTLA4 gene, the N-terminus of the predicted sequence of CTLA4 was fused to the signal peptide of oncostatin M (Malik et al., Mol. and Cell. Biol. 9:2847 (1989)) in two steps using overlapping oligonucleotides. For the first step, the oligonucleotide, CTCAGTCTGGTCCCTTGCACTCCTGTTTCCAAGCATGGCGAGCATGGCAATGCA CGTGGCCCAGCC (which encoded the C terminal 15 amino acids from the oncostatin M signal peptide fused to the N terminal 7 amino acids of CTLA4) was used as forward primer, and TTTGGGCTCCTGATCAGAATCTGGGCACGGTTG (encoding amino acid residues 119-125 of the amino acid sequence encoding CTLA4 receptor and containing a Bcl I restriction enzyme site) as reverse primer. The template for this step was cDNA synthesized from 1 micro g of total RNA from H38 cells (an HTLV II infected T-cell leukemic cell line provided by Drs. Salahudin and Gallo, NCI, Bethesda, MD). A portion of the PCR product from the first step was reamplified, using an overlapping forward primer, encoding the N terminal portion of the oncostatin M signal peptide and containing a Hind III restriction endonuclease site, CTAGCCACTGAAGCTTCACCAATGGGTGACTGCTCACACAGAGGACGCTGC TCAGTCTGGTCCCTTGCACTC and the same reverse primer. The product of the PCR reaction was digested with Hind III and Bcl I and ligated together with a Bcl I/Xba I

WO 02/02638

PCT/US01/21204

cleaved cDNA fragment encoding the amino acid sequences corresponding to the hinge, CH2 and CH3 regions of IgC(gamma)1 into the Hind III/Xba I cleaved expression vector, CDM8 or Hind III/Xba I cleaved expression vector pILN (also known as π LN).

- 5 DNA encoding the amino acid sequence corresponding to CTLA4Ig has been deposited with the ATCC under the Budapest Treaty on May 31, 1991, and has been accorded ATCC accession number 68629.

CTLA4Ig Codon Based Mutagenesis:

10

- A mutagenesis and screening strategy was developed to identify mutant CTLA4Ig molecules that had slower rates of dissociation ("off" rates) from CD80 and/or CD86 molecules i.e. improved binding ability. In this embodiment, mutations were carried out in and/or about the residues in the CDR-1, CDR-2 (also known as the C' strand) and/or
15 CDR-3 regions of the extracellular domain of CTLA4 (as described in U.S. Patents U.S. Patents 6,090,914, 5,773,253 and 5,844,095; in copending U.S. Patent Application Serial Number 60/214,065; and by Peach, R.J., et al *J Exp Med* 1994 180:2049-2058. A CDR-like region encompasses the each CDR region and extends, by several amino acids, upstream and/or downstream of the CDR motif). These sites were chosen based on
20 studies of chimeric CD28/CTLA4 fusion proteins (Peach et al., *J. Exp. Med.* 1994, 180:2049-2058), and on a model predicting which amino acid residue side chains would be solvent exposed, and a lack of amino acid residue identity or homology at certain positions between CD28 and CTLA4. Also, any residue which is spatially in close proximity (5 to 20 Angstrom Units) to the identified residues is considered part of the
25 present invention.

- To synthesize and screen soluble CTLA4 mutant molecules with altered affinities for a B7 molecule (e.g. CD80, CD86), a two-step strategy was adopted. The experiments entailed first generating a library of mutations at a specific codon of an extracellular
30 portion of CTLA4 and then screening these by BIAcore analysis to identify mutants with altered reactivity to B7. The BIAcore assay system (Pharmacia, Piscataway, N.J.) uses a

WO 02/02638

PCT/US01/21204

surface plasmon resonance detector system that essentially involves covalent binding of either CD80Ig or CD86Ig to a dextran-coated sensor chip which is located in a detector. The test molecule can then be injected into the chamber containing the sensor chip and the amount of complementary protein that binds can be assessed based on the change in molecular mass which is physically associated with the dextran-coated side of the sensor chip; the change in molecular mass can be measured by the detector system.

Specifically, single-site mutant nucleotide sequences were generated using non-mutated (e.g., wild-type) DNA encoding CTLA4Ig (U.S. Patent Nos: 5,434,131, 5,844,095; 5,851,795; and 5,885,796; ATCC Accession No. 68629) as a template. Mutagenic oligonucleotide PCR primers were designed for random mutagenesis of a specific codon by allowing any base at positions 1 and 2 of the codon, but only guanine or thymine at position 3 (XXG/T or also noted as NNG/T). In this manner, a specific codon encoding an amino acid could be randomly mutated to code for each of the 20 amino acids. In that regard, XXG/T mutagenesis yields 32 potential codons encoding each of the 20 amino acids. PCR products encoding mutations in close proximity to the CDR3-like loop of CTLA4Ig (MYPPPY), were digested with SacI/XbaI and subcloned into similarly cut CTLA4Ig (as included in Figure 24) π LN expression vector. This method was used to generate the single-site CTLA4 mutant molecule L104EIg (as included in Figure 18).

For mutagenesis in proximity to the CDR-1-like loop of CTLA4Ig, a silent NheI restriction site was first introduced 5' to this loop, by PCR primer-directed mutagenesis. PCR products were digested with NheI/XbaI and subcloned into similarly cut CTLA4Ig or L104EIg expression vectors. This method was used to generate the double-site CTLA4 mutant molecule L104EA29YIg (as included in Figure 19). In particular, the nucleic acid molecule encoding the single-site CTLA4 mutant molecule, L104EIg, was used as a template to generate the double-site CTLA4 mutant molecule, L104EA29YIg.

The double-site mutant nucleotide sequences encoding CTLA4 mutant molecules, such as L104EA29YIg (deposited on June 19, 2000 with the American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 and accorded

WO 02/02638

PCT/US01/21204

ATCC accession number PTA-2104), were generated by repeating the mutagenesis procedure described above using L104E1g as a template. This method was used to generate numerous double-site mutant nucleotide sequences such as those encoding CTLA4 molecules L104EA29Y1g (as included in the sequence shown in Figure 19), L104EA29L1g (as included in the sequence shown in Figure 20), L104EA29T1g (as included in the sequence shown in Figure 21), and L104EA29W1g (as included in the sequence shown in Figure 22). Triple-site mutants, such as those encoding L104EA29YS25K1g, L104EA29YS25N1g and L104EA29YS25R1g, were also generated

10 The soluble CTLA4 molecules were expressed from the nucleotide sequences and used in the phase II clinical studies described in Example 3, *infra*.

As those skilled-in-the-art will appreciate, replication of nucleic acid sequences, especially by PCR amplification, easily introduces base changes into DNA strands. However, nucleotide changes do not necessarily translate into amino acid changes as some codons redundantly encode the same amino acid. Any changes of nucleotide from the original or wildtype sequence, silent (i.e. causing no change in the translated amino acid) or otherwise, while not explicitly described herein, are encompassed within the scope of the invention.

20

EXAMPLE 2

The following example provides a description of the screening methods used to identify the single- and double-site mutant CTLA polypeptides, expressed from the constructs described in Example 1, that exhibited a higher binding avidity for B7 molecules, compared to non-mutated CTLA41g molecules.

Current *in vitro* and *in vivo* studies indicate that CTLA41g by itself is unable to completely block the priming of antigen specific activated T cells. *In vitro* studies with CTLA41g and either monoclonal antibody specific for CD80 or CD86 measuring inhibition of T cell proliferation indicate that anti-CD80 monoclonal antibody did not

WO 02/02638

PCT/US01/21204

augment CTLA4Ig inhibition. However, anti-CD86 monoclonal antibody did augment the inhibition, indicating that CTLA4Ig was not as effective at blocking CD86 interactions. These data support earlier findings by Linsley et al. (*Immunity*, (1994), 1:793-801) showing inhibition of CD80-mediated cellular responses required
5 approximately 100 fold lower CTLA4Ig concentrations than for CD86-mediated responses. Based on these findings, it was surmised that soluble CTLA4 mutant molecules having a higher avidity for CD86 than wild type CTLA4 should be better able to block the priming of antigen specific activated cells than CTLA4Ig.

10 To this end, the soluble CTLA4 mutant molecules described in Example 1 above were screened using a novel screening procedure to identify several mutations in the extracellular domain of CTLA4 that improve binding avidity for CD80 and CD86. This screening strategy provided an effective method to directly identify mutants with apparently slower "off" rates without the need for protein purification or quantitation
15 since "off" rate determination is concentration independent (O'Shannessy et al., (1993) *Anal. Biochem.*, 212:457-468).

COS cells were transfected with individual miniprep purified plasmid DNA and propagated for several days. Three day conditioned culture media was applied to
20 BIAcore biosensor chips (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) coated with soluble CD80Ig or CD86Ig. The specific binding and dissociation of mutant proteins was measured by surface plasmon resonance (O'Shannessy, D. J., et al., 1997 *Anal. Biochem.* 212:457-468). All experiments were run on BIAcore™ or BIAcore™ 2000 biosensors at 25°C. Ligands were immobilized on research grade NCM5 sensor chips (Pharmacia)
25 using standard N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimidN-hydroxysuccinimide coupling (Johnsson, B., et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198: 268-277; Khilko, S.N., et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:5425-15434).

WO 02/02638

PCT/US01/21204

Screening Method

COS cells grown in 24 well tissue culture plates were transiently transfected with mutant CTLA4Ig. Culture media containing secreted soluble mutant CTLA4Ig was collected 3 days later.

Conditioned COS cell culture media was allowed to flow over BIAcore biosensor chips derivitized with CD86Ig or CD80Ig (as described in Greene et al., 1996 *J. Biol. Chem.* 271:26762-26771), and mutant molecules were identified with off-rates slower than that observed for wild type CTLA4Ig. The DNAs corresponding to selected media samples were sequenced and more DNA prepared to perform larger scale COS cell transient transfection, from which CTLA4Ig mutant protein was prepared following protein A purification of culture media.

BIAcore analysis conditions and equilibrium binding data analysis were performed as described in J. Greene et al. 1996 *J. Biol. Chem.* 271:26762-26771 and in U.S. Patent Application Serial Nos. 09/579,927, and 60/214,065 which are herein incorporated by reference.

BIAcore Data Analysis

Sensorgram baselines were normalized to zero response units (RU) prior to analysis. Samples were run over mock-derivitized flow cells to determine background RU values due to bulk refractive index differences between solutions. Equilibrium dissociation constants (K_d) were calculated from plots of R_{eq} versus C, where R_{eq} is the steady-state response minus the response on a mock-derivitized chip, and C is the molar concentration of analyte. Binding curves were analyzed using commercial nonlinear curve-fitting software (Prism, GraphPAD Software).

Experimental data were first fit to a model for a single ligand binding to a single receptor (1-site model, i.e., a simple langmuir system, $A+B \leftrightarrow AB$), and equilibrium association

WO 02/02638

PCT/US01/21204

constants ($K_d = \frac{[A] \cdot [B]}{[AB]}$) were calculated from the equation $R = \frac{R_{max} \cdot C}{K_d + C}$. Subsequently, data were fit to the simplest two-site model of ligand binding (i.e., to a receptor having two non-interacting independent binding sites as described by the equation $R = \frac{R_{max1} \cdot C}{K_{d1} + C} + \frac{R_{max2} \cdot C}{K_{d2} + C}$).

5

The goodness-of-fits of these two models were analyzed visually by comparison with experimental data and statistically by an F test of the sums-of-squares. The simpler one-site model was chosen as the best fit, unless the two-site model fit significantly better ($p < 0.1$).

10

Association and disassociation analyses were performed using BIA evaluation 2.1 Software (Pharmacia). Association rate constants k_{on} were calculated in two ways, assuming both homogenous single-site interactions and parallel two-site interactions. For single-site interactions, k_{on} values were calculated according to the equation $R_t = R_{eq}(1 - \exp^{-k_{on}(t-t_0)})$, where R_t is a response at a given time, t ; R_{eq} is the steady-state response; t_0 is the time at the start of the injection; and $k_s = dR/dt = k_{on} \cdot C$, where C is a concentration of analyte, calculated in terms of monomeric binding sites. For two-site interactions k_{on} values were calculated according to the equation $R_t = R_{eq1}(1 - \exp^{-k_{s1}(t-t_0)}) + R_{eq2}(1 - \exp^{-k_{s2}(t-t_0)})$. For each model, the values of k_{on} were determined from the calculated slope (to about 70% maximal association) of plots of k_s versus C .

15

20

Disassociation data were analyzed according to one site ($AB = A + B$) or two site ($A_i B_j = A_i + B_j$) models, and rate constants (k_{off}) were calculated from best fit curves. The binding site model was used except when the residuals were greater than machine background (2-10RU, according to machine), in which case the two-binding site model was employed. Half-times of receptor occupancy were calculated using the relationship $t_{1/2} = 0.693/k_{off}$.

25

WO 02/02638

PCT/US01/21204

Flow Cytometry:

Murine mAb L307.4 (anti-CD80) was purchased from Becton Dickinson (San Jose, California) and IT2.2 (anti-B7-0 [also known as CD86]), from Pharmingen (San Diego, California). For immunostaining, CD80-positive and/or CD86-positive CHO cells were removed from their culture vessels by incubation in phosphate-buffered saline (PBS) containing 10mM EDTA. CHO cells ($1-10 \times 10^5$) were first incubated with mAbs or immunoglobulin fusion proteins in DMEM containing 10% fetal bovine serum (FBS), then washed and incubated with fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-mouse or anti-human immunoglobulin second step reagents (Tago, Burlingame, California). Cells were given a final wash and analyzed on a FACScan (Becton Dickinson).

SDS-PAGE and Size Exclusion Chromatography

SDS-PAGE was performed on Tris/glycine 4-20% acrylamide gels (Novex, San Diego, CA). Analytical gels were stained with Coomassie Blue, and images of wet gels were obtained by digital scanning. CTLA4Ig (25 μ g) and L104EA29YIg (25 μ g) were analyzed by size exclusion chromatography using a TSK-GEL G300 SW_{XL} column (7.8 x 300mm, Tosohaas, Montgomeryville, PA) equilibrated in phosphate buffered saline containing 0.02% NAN₃ at a flow rate of 1.0 ml/min.

CTLA4X_{C1208} and L104EA29YX_{C1208}.

Single chain CTLA4X_{C1208} was prepared as previously described (Linsley et al., (1995) J. Biol. Chem., 270:15417-15424). Briefly, an oncostatin M CTLA4 (OMCTLA4) expression plasmid was used as a template, the forward primer, GAGGTGATAAAGCTTCACCAATGGGTGACTGCTCACACAG was chosen to match sequences in the vector; and the reverse primer, GTGGTGTATTGGTCTAGATCAATCAGAATCTGGGCACGGTTC corresponded to the last seven amino acids (i.e. amino acids 118-124) in the extracellular domain of CTLA4, and contained a restriction enzyme site, and a stop codon (TGA). The reverse

WO 02/02638

PCT/US01/21204

primer specified a C120S (cysteine to serine at position 120) mutation. In particular, the nucleotide sequence GCA (nucleotides 34-36) of the reverse primer shown above is replaced with one of the following nucleotide sequences: AGA, GGA, TGA, CGA, ACT, or GCT. As persons skilled in the art will understand, the nucleotide sequence GCA is a
5 reversed complementary sequence of the codon TGC for cysteine. Similarly, the nucleotide sequences AGA, GGA, TGA, CGA, ACT, or GCT are the reversed complementary sequences of the codons for serine. Polymerase chain reaction products were digested with *HindIII/XbaI* and directionally subcloned into the expression vector μ LN (Bristol-Myers Squibb Company, Princeton, NJ). L104EA29YX_{C120S} was prepared
10 in an identical manner. Each construct was verified by DNA sequencing.

Identification and Biochemical Characterization of High Avidity Mutants

Twenty four amino acids were chosen for mutagenesis and the resulting ~2300 mutant
15 proteins assayed for CD86Ig binding by surface plasmon resonance (SPR; as described, supra). The predominant effects of mutagenesis at each site are summarized in Table II, infra. Random mutagenesis of some amino acids in the CDR-1 region (S25-R33) apparently did not alter ligand binding. Mutagenesis of E31 and R33 and residues M97-Y102 apparently resulted in reduced ligand binding. Mutagenesis of residues, S25, A29,
20 and T30, K93, L96, Y103, L104, and G105, resulted in proteins with slow "on" and/or slow "off" rates. These results confirm previous findings that residues in the CDR-1 (S25-R33) region, and residues in or near M97-Y102 influence ligand binding (Peach et al., (1994) J. Exp. Med., 180:2049-2058).

25 Mutagenesis of sites S25, T30, K93, L96, Y103, and G105 resulted in the identification of some mutant proteins that had slower "off" rates from CD86Ig. However, in these instances, the slow "off" rate was compromised by a slow "on" rate that resulted in mutant proteins with an overall avidity for CD86Ig that was apparently similar to that seen with wild type CTLA4Ig. In addition, mutagenesis of K93 resulted in significant
30 aggregation that may have been responsible for the kinetic changes observed.

WO 02/02638

PCT/US01/21204

Random mutagenesis of L104 followed by COS cell transfection and screening by SPR of culture media samples over immobilized CD86Ig yielded six media samples containing mutant proteins with approximately 2-fold slower "off" rates than wild type CTLA4Ig. When the corresponding cDNA of these mutants were sequenced, each was found to encode a leucine to glutamic acid mutation (L104E). Apparently, substitution of leucine 104 to aspartic acid (L104D) did not affect CD86Ig binding.

Mutagenesis was then repeated at each site listed in Table II, this time using L104E as the PCR template instead of wild type CTLA4Ig, as described above. SPR analysis, again using immobilized CD86Ig, identified six culture media samples from mutagenesis of alanine 29 with proteins having approximately 4-fold slower "off" rates than wild type CTLA4Ig. The two slowest were tyrosine substitutions (L104EA29Y), two were leucine (L104EA29L), one was tryptophan (L104EA29W), and one was threonine (L104EA29T). Apparently, no slow "off" rate mutants were identified when alanine 29 was randomly mutated, alone, in wild type CTLA4Ig.

The relative molecular mass and state of aggregation of purified L104E and L104EA29YIg was assessed by SDS-PAGE and size exclusion chromatography. L104EA29YIg (~1 µg; lane 3) and L104EIg (~1 µg; lane 2) apparently had the same electrophoretic mobility as CTLA4Ig (~1 µg; lane 1) under reducing (~50kDa; +BME; plus 2-mercaptoethanol) and non-reducing (~100kDa; -BME) conditions (FIG. 25A). Size exclusion chromatography demonstrated that L104EA29YIg (FIG. 25C) apparently had the same mobility as dimeric CTLA4Ig (FIG. 25B). The major peaks represent protein dimer while the faster eluting minor peak in FIG. 25B represents higher molecular weight aggregates. Approximately 5.0% of CTLA4Ig was present as higher molecular weight aggregates but there was no evidence of aggregation of L104EA29YIg or L104EIg. Therefore, the stronger binding to CD86Ig seen with L104EIg and L104EA29YIg could not be attributed to aggregation induced by mutagenesis.

30

WO 02/02638

PCT/US01/21204

Equilibrium and Kinetic Binding Analysis

Equilibrium and kinetic binding analysis was performed on protein A purified CTLA4Ig, L104EIg, and L104EA29YIg using surface plasmon resonance (SPR). The results are shown in Table I, *infra*. Observed equilibrium dissociation constants (K_d ; Table I) were calculated from binding curves generated over a range of concentrations (5.0-200 nM). L104EA29YIg binds more strongly to CD86Ig than does L104EIg or CTLA4Ig. The lower K_d of L104EA29YIg (3.21 nM) than L104EIg (6.06 nM) or CTLA4Ig (13.9 nM) indicates higher binding avidity of L104EA29YIg to CD86Ig. The lower K_d of L104EA29YIg (3.66 nM) than L104EIg (4.47 nM) or CTLA4Ig (6.51 nM) indicates higher binding avidity of L104EA29YIg to CD80Ig.

Kinetic binding analysis revealed that the comparative "on" rates for CTLA4Ig, L104EIg, and L104EA29YIg binding to CD80 were similar, as were the "on" rates for CD86Ig (Table I). However, "off" rates for these molecules were not equivalent (Table I). Compared to CTLA4Ig, L104EA29YIg had approximately 2-fold slower "off" rate from CD80Ig, and approximately 4-fold slower "off" rate from CD86Ig. L104E had "off" rates intermediate between L104EA29YIg and CTLA4Ig. Since the introduction of these mutations did not significantly affect "on" rates, the increase in avidity for CD80Ig and CD86Ig observed with L104EA29YIg was likely primarily due to a decrease in "off" rates.

To determine whether the increase in avidity of L104EA29YIg for CD86Ig and CD80Ig was due to the mutations affecting the way each monomer associated as a dimer, or whether there were avidity enhancing structural changes introduced into each monomer, single chain constructs of CTLA4 and L104EA29Y extracellular domains were prepared following mutagenesis of cysteine 120 to serine as described *supra*, and by Linsley et al., (1995) *J. Biol. Chem.*, 270:15417-15424 (84). The purified proteins CTLA4X_{C120S} and L104EA29YX_{C120S} were shown to be monomeric by gel permeation chromatography (Linsley et al., (1995), *supra*), before their ligand binding properties were analyzed by SPR. Results showed that binding affinity of both monomeric proteins for CD86Ig was

WO 02/02638

PCT/US01/21204

approximately 35-80-fold less than that seen for their respective dimers (Table I). This supports previously published data establishing that dimerization of CTLA4 was required for high avidity ligand binding (Greene et al., (1996) *J. Biol. Chem.*, 271:26762-26771).

5 L104EA29YX_{C120S} bound with approximately 2-fold higher affinity than CTLA4X_{C120S} to both CD80Ig and CD86Ig. The increased affinity was due to approximately 3-fold slower rate of dissociation from both ligands. Therefore, stronger ligand binding by L104EA29Y was most likely due to avidity enhancing structural changes that had been introduced into each monomeric chain rather than alterations in which the molecule
10 dimerized.

Location and Structural Analysis of Avidity Enhancing Mutations

The solution structure of the extracellular IgV-like domain of CTLA4 has recently been
15 determined by NMR spectroscopy (Metzler et al., (1997) *Nature Struct. Biol.*, 4:527-531). This allowed accurate location of leucine 104 and alanine 29 in the three dimensional fold (FIG. 26 left and right depictions). Leucine 104 is situated near the highly conserved MYPPPY amino acid sequence. Alanine 29 is situated near the C-terminal end of the CDR-1 (S25-R33) region, which is spatially adjacent to the MYPPPY
20 region. While there is significant interaction between residues at the base of these two regions, there is apparently no direct interaction between L104 and A29 although they both comprise part of a contiguous hydrophobic core in the protein. The structural consequences of the two avidity enhancing mutants were assessed by modeling. The A29Y mutation can be easily accommodated in the cleft between the CDR-1 (S25-R33)
25 region and the MYPPPY region, and may serve to stabilize the conformation of the MYPPPY region. In wild type CTLA4, L104 forms extensive hydrophobic interactions with L96 and V94 near the MYPPPY region. It is highly unlikely that the glutamic acid mutation adopts a conformation similar to that of L104 for two reasons. First, there is insufficient space to accommodate the longer glutamic acid side chain in the structure
30 without significant perturbation to the CDR-1 (S25-R33 region). Second, the energetic costs of burying the negative charge of the glutamic acid side chain in the hydrophobic

WO 02/02638

PCT/US01/21204

region would be large. Instead, modeling studies predict that the glutamic acid side chain flips out on to the surface where its charge can be stabilized by solvation. Such a conformational change can easily be accommodated by G105, with minimal distortion to other residues in the regions.

5

Binding of High Avidity Mutants to CHO Cells Expressing CD80 or CD86

FACS analysis (Fig. 27) of CTLA4Ig and mutant molecules binding to stably transfected CD80+ and CD86+CHO cells was performed as described herein. CD80-positive and CD86-positive CHO cells were incubated with increasing concentrations of CTLA4Ig, L104EA29YIg, or L104EIg, and then washed. Bound immunoglobulin fusion protein was detected using fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-human immunoglobulin.

15 As shown in Figure 27, CD80-positive or CD86-positive CHO cells (1.5×10^5) were incubated with the indicated concentrations of CTLA4Ig (closed squares), L104EA29YIg (circles), or L104EIg (triangles) for 2 hr. at 23°C, washed, and incubated with fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-human immunoglobulin antibody. Binding on a total of 5,000 viable cells was analyzed (single determination) on a FACScan, and mean fluorescence intensity (MFI) was determined from data histograms using PC-LYSYS. Data were corrected for background fluorescence measured on cells incubated with second step reagent only (MFI = 7). Control L6 mAb (80 µg/ml) gave MFI < 30. These results are representative of four independent experiments.

20
25 Binding of L104EA29YIg, L104EIg, and CTLA4Ig to human CD80-transfected CHO cells is approximately equivalent (FIG. 27A). L104EA29YIg and L104EIg bind more strongly to CHO cells stably transfected with human CD86 than does CTLA4Ig (FIG. 27B).

30

WO 02/02638

PCT/US01/21204

Functional Assays:

Human CD4-positive T cells were isolated by immunomagnetic negative selection (Linsley et al., (1992) *J. Exp. Med.* 176:1595-1604). Isolated CD4-positive T cells were stimulated with phorbol myristate acetate (PMA) plus CD80-positive or CD86-positive CHO cells in the presence of titrating concentrations of inhibitor. CD4-positive T cells ($8-10 \times 10^4$ /well) were cultured in the presence of 1 nM PMA with or without irradiated CHO cell stimulators. Proliferative responses were measured by the addition of 1 μ Ci/well of [3 H]thymidine during the final 7 hours of a 72 hour culture. Inhibition of PMA plus CD80-positive CHO, or CD86-positive CHO, stimulated T cells by L104EA29YIg and CTLA4Ig was performed. The results are shown in FIG. 28. L104EA29YIg inhibits proliferation of CD80-positive PMA treated CHO cells more than CTLA4Ig (FIG. 28A). L104EA29YIg is also more effective than CTLA4Ig at inhibiting proliferation of CD86-positive PMA treated CHO cells (FIG. 28B). Therefore, L104EA29YIg is a more potent inhibitor of both CD80- and CD86-mediated costimulation of T cells.

Figure 29 shows inhibition by L104EA29YIg and CTLA4Ig of allostimulated human T cells prepared above, and further allostimulated with a human B lymphoblastoid cell line (LCL) called PM that expressed CD80 and CD86 (T cells at 3.0×10^4 /well and PM at 8.0×10^3 /well). Primary allostimulation occurred for 6 days, then the cells were pulsed with 3 H-thymidine for 7 hours, before incorporation of radiolabel was determined.

Secondary allostimulation was performed as follows: Seven day primary allostimulated T cells were harvested over lymphocyte separation medium (LSM) (ICN, Aurora, OH) and rested for 24 hours. T cells were then restimulated (secondary), in the presence of titrating amounts of CTLA4Ig or L104EA29YIg, by adding PM in the same ratio as above. Stimulation occurred for 3 days, then the cells were pulsed with radiolabel and harvested as above. The effect of L104EA29YIg on primary allostimulated T cells is shown in FIG. 29A. The effect of L104EA29YIg on secondary allostimulated T cells is

WO 02/02638

PCT/US01/21204

shown in FIG. 29B. L104EA29YIg inhibits both primary and secondary T cell proliferative responses better than CTLA4Ig.

- To measure cytokine production (Figure 30), duplicate secondary allostimulation plates were set up. After 3 days, culture media was assayed using ELISA kits (Biosource, Camarillo, CA) using conditions recommended by the manufacturer. L104EA29YIg was found to be more potent than CTLA4Ig at blocking T cell IL-2, IL-4, and γ -IFN cytokine production following a secondary allogeneic stimulus (FIGS. 30A-C).
- 10 The effects of L104EA29YIg and CTLA4Ig on monkey mixed lymphocyte response (MLR) are shown in Figure 31. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC'S; 3.5×10^6 cells/well from each monkey) from 2 monkeys were purified over lymphocyte separation medium (LSM) and mixed with 2 μ g/ml phytohemagglutinin (PHA). The cells were stimulated 3 days then pulsed with radiolabel 16 hours before harvesting. L104EA29YIg
- 15 inhibited monkey T cell proliferation better than CTLA4Ig.

Table I:

- Equilibrium and apparent kinetic constants are given in the following table (values are means \pm standard deviation from three different experiments):
- 20

Immobilized Protein	Analyte	k_{on} ($\times 10^5$) $M^{-1} S^{-1}$	k_{off} ($\times 10^{-3}$) S^{-1}	K_d nM
CD80Ig	CTLA4Ig	3.44 ± 0.29	2.21 ± 0.18	6.51 ± 1.08
CD80Ig	L104E1g	3.02 ± 0.05	1.35 ± 0.08	4.47 ± 0.36
CD80Ig	L104EA29YIg	2.96 ± 0.20	1.08 ± 0.05	3.66 ± 0.41
CD80Ig	CTLA4X _{C120S}	12.0 ± 1.0	230 ± 10	195 ± 25
CD80Ig	L104EA29YX _{C120S}	8.3 ± 0.26	71 ± 5	85.0 ± 2.5
CD86Ig	CTLA4Ig	5.95 ± 0.57	8.16 ± 0.52	13.9 ± 2.27
CD86Ig	L104E1g	7.03 ± 0.22	4.26 ± 0.11	6.06 ± 0.05
CD86Ig	L104EA29YIg	6.42 ± 0.40	2.06 ± 0.03	3.21 ± 0.23
CD86Ig	CTLA4X _{C120S}	16.5 ± 0.5	840 ± 55	511 ± 17
CD86Ig	L104EA29YX _{C120S}	11.4 ± 1.6	300 ± 10	267 ± 29

WO 02/02638

PCT/US01/21204

Table II

The effect on CD86lg binding by mutagenesis of CTLA4lg at the sites listed was determined by SPR, described *supra*. The predominant effect is indicated with a "+" sign.

5

Mutagenesis Site	Effects of Mutagenesis				ligand
	No Effect	Apparent	Slow "on" rate/ slow "off rate	Reduced binding	
S25			+		
P26	+				
G27	+				
K28	+				
A29			+		
T30			+		
E31				+	
R33				+	
K93			+		
L96			+		
M97				+	
Y98				+	
P99				+	
P100				+	
P101				+	
Y102				+	
Y103			+		
L104			+		
G105			+		
I106	+				
G107	+				
Q111	+				

WO 02/02638

PCT/US01/21204

Mutagenesis Site	Effects of Mutagenesis			
	No Effect	Apparent	Slow "on" rate/ slow "off" rate	Reduced ligand binding
Y113	+			
I115	+			

EXAMPLE 3

The following provides a description of phase II clinical studies of human patients administered soluble CTLA4 mutant molecule L104EA29YIg (also known as LEA29Y or LEA) or CTLA4Ig, to relieve at least one symptom associated with rheumatoid arthritis, including reducing: joint swelling, joint tenderness, inflammation, morning stiffness, and pain. The CTLA4Ig molecule used herein begins with methionine at position +1 (or alternatively with alanine at position -1) and ends with lysine at position +357 as shown in Figure 24. DNA encoding an embodiment of the CTLA4Ig molecule has been deposited as ATCC 68629. The L104EA29YIg molecule used herein begins with methionine at position +1 (or alternatively with alanine at position -1) and ends with lysine at position +357 as shown in Figure 19. DNA encoding an embodiment of the L104EA29YIg molecule has been deposited as ATCC PTA 2104.

Additionally, the following provides a description of human patients administered L104EA29YIg or CTLA4Ig to relieve at least one biological surrogate marker associated with rheumatoid arthritis, including reducing erythrocyte sedimentation rates, and serum levels of C-reactive protein and/or IL2 receptor.

Patient Cohorts

A total of 214 patients, including 54 males and 160 females, participated in the study (Figures 1A, 1B). The patients at baseline had a mean disease duration of 3.4 (± 2.0) years and had failed at least one Disease Modifying Antirheumatic Drug (DMARD). Stable Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDS) or steroids (≤ 10 mg/day) were permitted and concomitant DMARDS were prohibited. The patients were randomized

WO 02/02638

PCT/US01/21204

into groups of 25 to 32 patients per treatment group. Thirty-two patients received a placebo, 92 received L104EA29YIg, and 90 received CTLA4Ig. The patients who followed protocol guidelines and did not discontinue before day 57 received a total of 4 intravenous infusions, one infusion each on days 1, 15, 29, and 57. All patients were evaluated on days 1, 15, 29, 43, 57, 71, and 85. The doses administered included 0.5, 2.0, or 10.0 mg/kg of L104EA29YIg (denoted as LEA.5, LEA2 and LEA10, respectively in Figures 1A-1E) or of CTLA4Ig (denoted as CTLA.5, CTLA2 and CTLA10, respectively in Figures 1A-1E).

All subjects were monitored for peri-infusional adverse events and global safety by answering a questionnaire listing potential adverse events. The patients were questioned about potential adverse events that may have occurred within twenty-four hours post-infusion. In addition, the patients were encouraged to spontaneously report any adverse events that they experienced. The physicians routinely monitored laboratory samples from the patients for abnormalities in blood chemistry and hematology e.g. assessed the levels of inflammatory response mediators such as cytokines (TNF, IL-6), tryptase and complement. The primary endpoint was the proportion of subjects meeting the ACR 20 criteria on day 85.

Storage of Test Material

The CTLA4Ig and L104EA29YIg were supplied in single-use glass vials containing 200 mg/vial of CTLA4Ig or 100 mg/vial of L104EA29YIg, respectively. Prior to infusion, the CTLA4Ig and L104EA29YIg were diluted to a final concentration of 25 mg/ml with sterile water for injection (SWFI).

Administration Protocol

All infusions were administered intravenously over 1 hour (Figures 1 through 17). All subjects received at least one infusion of study medication.

WO 02/02638

PCT/US01/21204

Group 1: 32 patients, CTLA4Ig or L104EA29YIg matching placebo.

Group 2: 26 patients; dosage 0.5 mg/kg of CTLA4Ig.

5 Group 3: 32 patients; dosage 2.0 mg/kg of CTLA4Ig.

Group 4: 32 patients; dosage 10.0 mg/kg of CTLA4Ig.

Group 5: 32 patients; dosage 0.5 mg/kg of L104EA29YIg.

10

Group 6: 29 patients; dosage 2.0 mg/kg of L104EA29YIg.

Group 7: 31 patients; dosage 10.0 mg/kg of L104EA29YIg.

15 Clinical Monitoring

Patients were evaluated for baseline symptoms of disease activity prior to receiving any infusions. These baseline evaluations included: joint swelling, joint tenderness, inflammation, morning stiffness, disease activity evaluated by patient and physician as well as disability evaluated by Health Questionnaire Assessment (HAQ) (reported as a physical function score in Figure 1C), and pain (Figures 1A to 1D). Additionally, the baseline evaluations included erythrocyte sedimentation rates (ESR), and serum levels of C-reactive protein (CRP) and soluble IL-2 receptor (IL-2r) (Figures 1C and 1D).

20

25 The clinical response studies were based on the criteria established by the American College of Rheumatology (ACR). A subject satisfied the ACR20 criterion if there was a 20 percent improvement in tender and swollen joint counts and 20 percent improvement in three of the five remaining symptoms measured, such as patient and physician global disease changes, pain, disability, and an acute phase reactant (Felson, D. T., et al., 1993 *Arthritis and Rheumatism* 36:729-740; Felson, D. T., et al., 1995 *Arthritis and Rheumatism* 38:1-9).

30

WO 02/02638

PCT/US01/21204

Biomarkers

5 Potential biomarkers of disease activity (rheumatoid factor, CRP, ESR, soluble IL-2R, soluble ICAM-1, soluble E-selectin, and MMP-3) were also assessed. Validated enzyme immunoassay (EIA) methods were used to determine the serum concentration of IL-2sR α , sICAM-1, sE-selectin and MMP-3. TNF α and IL-6 were assessed at infusion pre and 2 hours post, if necessary.

10 IL-2sR α , sICAM-1, and sE-selectin were measured using commercially available colorimetric EIA kits from R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN). The lower and upper limits of quantitation were 312-20,000 pg/mL, 40-907 ng/mL and 10-206 ng/mL, respectively. The inter-assay coefficient of variation ranged from 4.48-8.4%, 3.8-5.0% and 5.5-9.0% respectively. According to the kit manufacturer, normal serum values
15 range from 676-2,132 pg/mL, respectively.

MMP-3 was measured using a commercially available colorimetric EIA kit from Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ). The lower and upper limits of quantitation were 30-7,680 ng/mL. The inter-assay coefficient of variation ranged from
20 6.3-10.6%. According to the kit manufacturer, normal serum values range from 28-99 ng/mL.

IL-6 and TNF α were measured using commercially available chemiluminescent EIA kits from R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN). The lower and upper limits of quantitation
25 were 0.3-3,000 pg/mL and 0.7-7,000 pg/mL, respectively. The inter-assay coefficient of variation ranged from 3.1-5.7% and 6.4-20.7%, respectively. According to the kit manufacturer, normal serum values range from <0.3-12 pg/mL and <0.7-7.5 pg/mL.

30

WO 02/02638

PCT/US01/21204

Antibody testing

Serum samples were obtained for assessment of drug-specific antibodies prior to dosing on day 1, and approximately on days 15, 29, 57, 85 and 169. Due to high, preexisting titers directed to the immunoglobulin (Ig) portion of the molecule, specific antibody formation against CTLA4Ig and LEA29Y without Ig constant regions was also assessed.

Ninety-six well Immulon II ELISA plates (Dynex, Chantilly, Virginia) were coated with CTLA4Ig, CTLA4Ig without the Ig constant regions, LEA29Y, or LEA29Y without the Ig constant regions at 2, 4, 2, or 1 µg/ml in phosphate buffered saline (PBS), respectively, and incubated overnight at 2-8°C. The plates were washed with PBS containing 0.05% Tween 20 and blocked for 1 hour at 37°C with PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA). The plates were then washed and serial dilutions of the test sera or quality control (QC) sera were added to the appropriate wells and incubated for 2 hours at 37°C. Sera was diluted threefold in PBS with 0.25% BSA and 0.05% Tween 20 starting at a 1:10 dilution. Plates were washed and an alkaline-phosphatase-conjugated goat anti-human kappa and lambda (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, Alabama) antibody cocktail was added. Following a 1-hour incubation at 37°C, the plates were washed and 1 mg/ml para-nitrophenyl phosphate in diethanolamine buffer was added to each well. After 30 minutes at 25°C, the reactions were stopped with 3N NaOH and the absorbance (dual wavelength: 405 nm and 550 nm) was recorded. Results were expressed as endpoint titer (EPT), defined as the reciprocal of the highest dilution that resulted in an absorbance reading fivefold greater than or equal to the mean plate-background absorbance. Plate background was determined as the absorbance measurement recorded in the absence of serum. Values were considered positive for seroconversion if they were at least two serial dilutions (ninefold) or greater relative to predose EPT values. Serum QC samples positive for either CTLA4Ig- or LEA29Y-specific antibodies were generated from immunized monkeys. An aliquot of the appropriate QC sample was assayed during each analytical run. Analytical runs were accepted only when the QC samples were within the assay acceptance criteria.

WO 02/02638

PCT/US01/21204

Results

CTLA4Ig and L104EA29YIg were generally well-tolerated at all dose-levels. Peri-infusional adverse events were similar across all dose groups, with the exception of headaches. Headache response of patients on day 85 increased dose-dependently 23%, 44%, and 53% in CTLA4Ig-treated patients, and 34%, 45%, and 61% in L104EA29YIg-treated patients, at 0.5, 2.0, and 10.0 mg/kg respectively. In contrast, 31% of the patients administered placebos experienced headaches.

The percent of patients that discontinued from the clinical study due to arthritis flares and other adverse events is summarized in Figure 2. A much higher percentage of patients on placebo discontinued treatment due to arthritis flare. The CTLA4Ig treated patients discontinued treatment less with increasing doses. Very few patients treated with L104EA29YIg discontinued treatment. These results indicate a good inverse dose-dependent response for CTLA4Ig, and a stronger therapeutic response with L104EA29YIg therapy.

The ACR-20, -50, and -70 responses of patients treated with CTLA4Ig, L104EA29YIg, or placebo at day 85 are summarized in Figure 3A. Similarly, Figures 3B and C describe the ACR-20 responses with 95% confidence limits. The responses appear to be dose-dependent with a clear significant response at 10 mg/kg per body weight of the patient.

The percent of patients having reduced swollen and tender joint counts compared to the patients having no response to treatment with CTLA4Ig, L104EA29YIg, or placebo, is shown in Figures 4A and B. The therapeutic responses appear to be dose-dependent. A larger percentage of patients show improvement of 20, 50, 70, and even 100% in the 2 and 10 mg/kg groups for both products.

The percent of patients having reduced pain, disease activity evaluated by patient and physician mean score units with CTLA4Ig, L104EA29YIg, or placebo, is shown in Figures 5A, B, C, and D. The therapeutic responses, as monitored by the Likert scale,

WO 02/02638

PCT/US01/21204

appear to be dose-dependent in favor of the active treatment groups as compared to placebo on day 85. The Likert scale is a validated verbal rating scale using adjectives to rank the symptoms (The American College of Rheumatology Preliminary Core Set of Disease Activity Measures for Rheumatoid Arthritis Clinical Trials: Arthritis and Rheumatism, June 1993, 36(6):729-740).

The patient and physician assessments of disease activity change from the baseline by at least 2 units, resulting from treatment with CTLA4Ig, L104EA29YIg, or placebo, are shown in Figures 6A and B. The responses appear to be dose-dependent with more marked improvement for the higher doses of active drugs.

The percent reduction in C-reactive protein (CRP) levels in patients treated with CTLA4Ig, L104EA29YIg, or placebo, is shown in Figures 7A and B. The responses appear to be dose-dependent with a clear decrease for the 2 and 10 mg/kg active treatment groups. In addition, Figure 7B showed that the difference is quite significant compared to placebo with 95% confidence intervals. Figure 7C shows the changes in serum level changes from baseline at day 85.

The amount of serum soluble IL-2 receptor in patients treated with CTLA4Ig, L104EA29YIg, or placebo, is shown in Figure 8. The reduction in soluble IL-2 receptor levels appears to be dose-dependent.

The amount of serum soluble ICAM-1 and soluble E-selectin in patients treated with CTLA4Ig, L104EA29YIg, or placebo, is shown in Figure 33. The reduction in soluble ICAM-1 and soluble E-selectin levels appears to be dose-dependent.

The median and mean tender joint counts in patients treated with CTLA4Ig or placebo over time are shown in Figures 9A and B. The change from baseline (e.g., reduction in tender joints) appears to be more important in the 2 and 10 mg/kg treated groups, than in the placebo or 0.5 mg/kg groups.

WO 02/02638

PCT/US01/21204

- The median and mean swollen joint counts in patients treated with CTLA4Ig or placebo over time are shown in Figures 10A and B. The change from baseline (e.g., reduction in swollen joints) appears to be more important in the 2 and 10 mg/kg treated groups than placebo or 0.5 mg/kg groups.
- 5
- The mean pain assessment scores over time in patients treated with CTLA4Ig or placebo are shown in Figure 11. The change from baseline (e.g., reduction in pain) appears to be more important in the 2 and 10 mg/kg treated groups than placebo or 0.5 mg/kg groups.
- 10
- The mean disease activity assessment scores assessed by patient or physician in patients treated with CTLA4Ig or placebo over time are shown in Figures 12A and B. The change from baseline (e.g., reduction in disease activity) appears to be more important in the 2 and 10 mg/kg treated groups than placebo or 0.5 mg/kg groups.
- 15
- The median and mean tender joint counts in patients treated with L104EA29YIg (denoted as LEA in the figures) or placebo over time are shown in Figures 13A and B. The change from baseline (e.g., reduction in tender joints) appears to be dose-dependent.
- The median and mean swollen joint counts in patients treated with L104EA29YIg (denoted as LEA in the figures) or placebo over time are shown in Figures 14A and B. The change from baseline (e.g., reduction in swollen joints) appears to be more important in the 2 and 10 mg/kg treated groups than placebo or 0.5 mg/kg groups.
- 20
- The mean pain assessment scores in patients treated with L104EA29YIg (denoted as LEA in the figures) or placebo over time are shown in Figure 15. The change from baseline (e.g., reduction in pain) appears to be dose-dependent.
- 25
- The mean disease activity assessment scores evaluated by patient or physician in patients treated with L104EA29YIg (denoted as LEA in the figures) or placebo over time are shown in Figures 16A and B. The change from baseline (e.g., reduction in disease activity) appears to be dose-dependent.
- 30

WO 02/02638

PCT/US01/21204

The percent improvement of physical disability assessed by HAQ at day 85 for patients treated with CTLA4Ig, L104EA29YIg, or placebo are shown in Figure 17 (Health Assessment Questionnaire (HAQ); Fries, J. F., et al., 1982 *J. of Rheumatology* 9:789-793). There is a clear dose dependent improvement with this parameter.

The changes from baseline for soluble IL-2r and C-reactive protein levels were dose-dependent in both treatment groups. After treatment, soluble IL-2r levels were -2%, -10%, and -22% for CTLA4Ig and -4%, -18%, and -32% for L104EA29YIg at 0.5, 2.0, and 10.0 mg/kg respectively, compared to +3% for the placebo. C-reactive protein levels were +12%, -15%, and -32% for CTLA4Ig and +47%, -33%, and -47% for L104EA29YIg at 0.5, 2.0, and 10.0 mg/kg respectively, compared to +20% for the placebo (Figure 7A).

No clinically remarkable findings with respect to routine hematology testing, chemistry laboratory testing with the exception of slight suppressions in IgA and IgG levels at the higher doses of both drugs, physical findings, or vital signs assessments were observed. Notably, neither medication induced drug-specific antibodies.

Example 4

The following examples describe phase II clinical studies of human patients that will be administered L104EA29YIg, to reduce or prevent structural damage, including bone or joint erosion using validated radiographic scales. This improvement in reducing or preventing structural damage is parallel to the clinical improvement measured by the clinical parameters.

The status of the bone structure is monitored in some of the human patients prior to treatment with CTLA4Ig or L104EA29YIg. These patients are administered between 0.5 and 20 mg/kg of CTLA4Ig or L104EA29YIg chronically every two to twelve weeks (alone or in combination with other agents) to maintain their therapeutic improvement

WO 02/02638

PCT/US01/21204

over time. Radiographs of patients' hands and feet are taken at predefined intervals: 6 months, and then yearly, as recommended by the FDA guidelines. These patients are monitored in long-term extension after 6 and 12 months to determine if treatment with CTLA4Ig or L104EA29YIg reduces the progression of bone deterioration, and then
5 yearly. The patients are monitored by radiographic methods, including X-ray and/or magnetic resonance imaging (MRI), according to standard practice in the art (Larsen, A. K. and M. Eek 1977 *Acta. Radiol. Diag.* 18:481-491; Sharp, J. T., et al., 1985 *Arthritis and Rheumatism* 28:1326-1335). The results of the radiographic data are evaluated for prevention of structural damage, including slowing the progression of bone erosion and
10 cartilage damage, with joint space narrowing and/or prevention of new erosions.

WO 02/02638

PCT/US01/21204

What is claimed:

1. A method for treating a rheumatic disease comprising administering to a subject an effective amount of a soluble CTLA4 mutant molecule that binds a B7 molecule.
5
2. The method of claim 1 further comprising administering to a subject an effective amount of at least one immunosuppressive agent, wherein the immunosuppressive agent is selected from the group consisting of corticosteroids, nonsteroidal antiinflammatory drugs, cyclosporin prednisone, azathioprine, methotrexate, TNF α blockers or antagonists, infliximab, any biological agent targeting an inflammatory cytokine, hydroxychloroquine, sulphasalazopyrine, gold salts, etanercept, and anakinra.
10
3. The method of claim 1, wherein the soluble CTLA4 mutant molecule inhibits the B7 molecule from binding CTLA4 and/or CD28 on T cells.
15
4. The method of claim 1, wherein the soluble CTLA4 mutant molecule interferes with T-cell/B7-positive cell interactions.
- 20 5. The method of claim 1, wherein the soluble CTLA4 mutant molecule comprises a mutation at position +104 of CTLA4, wherein leucine at position +104 as shown in Figure 23 is substituted with any other amino acid.
- 25 6. The method of claim 5, wherein the soluble CTLA4 mutant molecule is a L104Elg beginning with methionine at position +1 through lysine at position +357 as shown in Figure 18.
- 30 7. The method of claim 5, wherein the soluble CTLA4 mutant molecule is a L104Elg beginning with alanine at position -1 through lysine at position +357 as shown in Figure 18.

WO 02/02638

PCT/US01/21204

8. The method of claim 1, wherein the soluble CTLA4 mutant molecule comprises a first mutation at position +104 of CTLA4, wherein leucine at position +104 as shown in Figure 23 is substituted with glutamic acid, and a second mutation at
- 5 a. position +29 of CTLA4, wherein alanine at position +29 as shown in Figure 23 is substituted with any other amino acid,
- b. position +105 of CTLA4, wherein glycine at position +105 as shown in Figure 23 is substituted with any other amino acid,
- c. position +25 of CTLA4, wherein serine at position +25 as shown in Figure 23 is substituted with any other amino acid, or
- 10 d. position +30 of CTLA4, wherein threonine at position +30 as shown in Figure 23 is substituted with any other amino acid.
9. The method of claim 1, wherein the soluble CTLA4 mutant molecule is
- 15 a. L104EA29YIg, beginning with methionine at position +1 and ending with lysine at position +357 as shown in Figure 19,
- b. L104EA29LIg, beginning with methionine at position +1 and ending with lysine at position +357 as shown in Figure 20,
- c. L104EA29TIg, beginning with methionine at position +1 and ending with lysine at position +357 as shown in Figure 21, or
- 20 d. L104EA29Wlg, beginning with methionine at position +1 and ending with lysine at position +357 as shown in Figure 22.
10. The method of claim 1, wherein the soluble CTLA4 mutant molecule is
- 25 a. L104EA29YIg, beginning with alanine at position -1 and ending with lysine at position +357 as shown in Figure 19.
- b. L104EA29LIg, beginning with alanine at position -1 and ending with lysine at position +357 as shown in Figure 20,
- c. L104EA29TIg, beginning with alanine at position -1 and ending with lysine at position +357 as shown in Figure 21, or
- 30 d. L104EA29Wlg, beginning with alanine at position -1 and ending with lysine at position +357 as shown in Figure 22.

WO 02/02638

PCT/US01/21204

11. The method of claim 9 or 10, wherein L104EA29YIg is encoded by a DNA sequence designated ATCC PTA-2104.
- 5 12. The method of claim 1, wherein the soluble CTLA4 mutant molecule comprises a mutation at
- a. position +104 of CTLA4, wherein leucine at position +104 as shown in Figure 23 is substituted with glutamic acid,
 - 10 b. position +29 of CTLA4, wherein alanine at position +29 as shown in Figure 23 is substituted with tyrosine, and
 - c. position +25 of CTLA4, wherein serine at position +25 as shown in Figure 23 is substituted with any other amino acid.
13. A method for treating rheumatic disease comprising administering to a subject an effective amount of a soluble CTLA4 mutant molecule that binds a B7 molecule, wherein the soluble CTLA4 mutant molecule comprises a mutation at position +104 of CTLA4, wherein leucine at position +104 as shown in Figure 23 is substituted with glutamic acid and a mutation at position +29 of CTLA4, wherein alanine at position +29 as shown in Figure 23 is substituted with tyrosine.
- 15 20
14. The method of claim 13, wherein the soluble CTLA4 mutant molecule is L104EA29YIg.
15. The method of claim 14, wherein L104EA29YIg begins with methionine at position +1 and ending with lysine at position +357 as shown Figure 19.
- 25
16. The method of claim 14, wherein L104EA29YIg begins with alanine at position -1 and ending with lysine at position +357 as shown Figure 19
- 30 17. The method of claim 1 or 13, wherein the rheumatic disease is rheumatoid arthritis.

WO 02/02638

PCT/US01/21204

18. A method for alleviating a symptom associated with a rheumatic disease selected from the group consisting of joint swelling, pain, tenderness, morning stiffness, structural damage, an elevated level of serum C-reactive protein, an elevated level of soluble IL-2r, an elevated level of soluble ICAM-1, an elevated level of soluble E-selectin and an elevated erythrocyte sedimentation rate, by treating a subject suffering from a rheumatic disease by the method of claim 1 or 13.
19. The method of claims 1 or 13, wherein administration of the soluble CTLA4 mutant molecule is effected locally or systemically.
20. The method of claim 19, wherein administration is selected from the group consisting of intravenous, intramuscular, subcutaneous, implantable pump, continuous infusion, gene therapy, liposomal and oral administration.
21. The method of claims 1 or 13, wherein the effective amount of soluble CTLA4 mutant molecule is between about 0.5 through 100 mg/kg weight of the subject.
22. The method of claim 21, wherein the effective amount of soluble CTLA4 mutant molecule is 0.5 mg/kg weight of the subject.
23. The method of claim 21, wherein the effective amount of soluble CTLA4 mutant molecule is 2 mg/kg weight of the subject.
24. The method of claim 21, wherein the effective amount of soluble CTLA4 mutant molecule is 10 mg/kg weight of the subject.
25. The method of claims 1 or 13, wherein the subject is selected from the group consisting of human, monkey, ape, dog, cat, cow, horse, rabbit, mouse, and rat.
26. A pharmaceutical composition for treating a rheumatic disease comprising a pharmaceutically acceptable carrier and a soluble CTLA4 mutant molecule.

WO 02/02638

PCT/US01/21204

27. The pharmaceutical composition of claim 26, wherein the soluble CTLA4 mutant molecule comprises a mutation at position +104 of CTLA4, wherein leucine at position +104 as shown in Figure 23 is substituted with glutamic acid and a mutation at position +29 of CTLA4, wherein alanine at position +29 as shown in Figure 23 is substituted with tyrosine.
28. The pharmaceutical composition of claim 27, wherein the soluble CTLA4 mutant molecule is L104EA29YIg.
29. The pharmaceutical composition of claim 28, wherein the L104EA29YIg begins with methionine at position +1 and ending with lysine at position +357 as shown Figure 19.
30. The pharmaceutical composition of claim 28, wherein the L104EA29YIg begins with alanine at position -1 and ending with lysine at position +357 as shown Figure 19.
31. The pharmaceutical composition of claim 26, wherein the pharmaceutically acceptable carrier is selected ion exchangers, alumina, aluminum stearate, lecithin, serum proteins, such as human serum albumin, buffer substances, glycine, sorbic acid, potassium sorbate, partial glyceride mixtures of saturated vegetable fatty acids, phosphate buffered saline solution, water, emulsions, salts or electrolytes, colloidal silica, magnesium trisilicate, polyvinyl pyrrolidone, cellulose-based substances, polyethylene glycol, sterile solutions, tablets, excipients, sucrose, glucose, maltose, flavor and color additives, lipid compositions and polymeric compositions.
32. A method for inducing a pathophysiological change associated with a rheumatic disease by treating a subject suffering from the rheumatic disease by the method of claim 1 or 13.

WO 02/02638

PCT/US01/21204

33. The method of claim 32, wherein the pathophysiological change associated with rheumatic disease is reduced structural damage.
34. A kit for treating rheumatoid arthritis, said kit comprising an effective amount of a soluble CTLA4 mutant molecule that binds to a B7 molecule.
35. The kit of claim 34, wherein the soluble CTLA4 mutant molecule comprises a mutation at position +104 of CTLA4, wherein leucine at position +104 as shown in Figure 23 is substituted with glutamic acid and a mutation at position +29 of CTLA4, wherein alanine at position +29 as shown in Figure 23 is substituted with tyrosine.
36. The kit of claim 35, wherein the soluble CTLA4 mutant is L104EA29YIg.
37. The kit of claim 36, wherein L104EA29YIg begins with methionine at position +1 and ending with lysine at position +357 as shown Figure 19.
38. The kit of claim 36, wherein L104EA29YIg begins with alanine at position -1 and ending with lysine at position +357 as shown Figure 19.
39. The kit of claim 34 further comprising an effective amount of an immunosuppressive agent, wherein the immunosuppressive agent is selected from the group consisting of corticosteroids, nonsteroidal antiinflammatory drugs, cyclosporin prednisone, azathioprine, methotrexate, TNF α blockers or antagonists, infliximab, any biological agent targeting an inflammatory cytokine, hydroxychloroquine, sulphasalazopyrine, gold salts, etanercept, and anakinra.

Demographic -1-

	Placebo N=32	CTLA.5 N=26	CTLA.2 N=32	CTLA.10 N=32	LEA.5 N=32	LEA.2 N=29	LEA.10 N=31	Total N=214
Gender								
Male	6 (19%)	4 (15%)	9 (28%)	10 (31%)	9 (28%)	9 (31%)	7 (23%)	54 (25%)
Female	26 (81%)	22 (85%)	23 (72%)	22 (69%)	23 (72%)	20 (69%)	24 (77%)	160 (75%)
Race								
White	30 (94%)	23 (88%)	30 (94%)	30 (94%)	29 (91%)	25 (86%)	27 (87%)	194 (91%)
Black	2 (6%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (3%)	1 (3%)	3 (10%)	2 (6%)	9 (4%)
Other	0 (0%)	3 (12%)	2 (6%)	1 (3%)	2 (6%)	1 (3%)	2 (6%)	11 (5%)
Disease Duration								
< 2 years	12 (38%)	5 (19%)	8 (25%)	12 (38%)	10 (31%)	10 (34%)	11 (35%)	68 (32%)
2-5 years	14 (44%)	11 (42%)	18 (56%)	13 (41%)	14 (44%)	14 (48%)	12 (39%)	96 (45%)
5-7 years	6 (19%)	8 (31%)	6 (19%)	6 (19%)	6 (19%)	5 (17%)	7 (23%)	44 (21%)
> 7 years	0 (0%)	2 (8%)	0 (0%)	1 (3%)	2 (6%)	0 (0%)	1 (3%)	6 (3%)
Duration Disease (years)								
N	32	26	32	32	32	29	31	214
Mean	3.2	4.2	3.3	3.4	3.7	3.1	3	3.4
Sd	2	2	1.7	2.1	2	1.8	2.2	2
Min	0.3	0.2	0.4	0	0.7	0.4	0	0
Max	7	7.5	6.8	7.3	7.6	7	7.1	7.6

FIG. 1A

Demographic -2-

	Placebo N=32	CTLA.5 N=26	CTLA.2 N=32	CTLA.10 N=32	LEA.5 N=32	LEA.2 N=29	LEA.10 N=31	Total N=214
Gender								
Male	6 (19%)	4 (15%)	9 (28%)	10 (31%)	9 (28%)	9 (31%)	7 (23%)	54 (25%)
Female	26 (81%)	22 (85%)	23 (72%)	22 (69%)	23 (72%)	20 (69%)	24 (77%)	160 (75%)
Age								
N	32	26	32	32	32	29	31	214
Mean	48.3	46.9	46.2	51.5	49.3	50.8	45.6	48.4
Sd	11.7	12.2	13.4	11.5	8.8	10.7	10.1	11.3
Min	22	25	21	24	27	24	28	21
Max	66	64	64	66	66	65	64	66
Weight (kg)								
N	32	26	32	32	32	29	31	214
Mean	72.9	70.6	72.7	70	69.8	68.9	71.7	71
Sd	13.5	17.4	14.4	16.7	12.8	12.1	15.8	14.6
Min	46.7	45	50	40.1	48	47	39.2	39.2
Max	98.2	101.3	99	101.3	95	93.8	99	101.3
Disease activity (patient)								
N	32	26	32	32	32	29	31	215
Mean	3.6	3.6	3.7	3.6	3.5	3.6	3.5	3.6
Sd	0.9	0.9	0.9	0.9	0.8	0.8	0.7	0.8
Min	2	2	2	2	2	2	2	2
Max	5	5	5	5	5	5	5	5

FIG. 1B

WO 02/02638

PCT/US01/21204

3/52

Demographic - Disease -

Disease	N	Placebo		CTLA.5		CTLA.2		CTLA.10		LEA.5		LEA.2		LEA.10		Total
		N=32	N=26	N=32	N=32	N=32	N=32	N=29	N=31	N=214						
Disease activity (physician)	Mean	3.6	26	32	32	32	29	31	214							
	Sd	0.7	3.5	3.5	3.7	3.4	3.4	3.5	3.5							
	Min	2	0.6	0.8	1	0.6	0.8	0.6	0.7							
	Max	5	3	2	2	2	2	3	2							
ESR	Mean	32	26	32	32	32	29	30	213							
	Sd	43.3	35.2	41.6	36.3	29.8	40.9	39.3	38.1							
	Min	2	4	4	3	0	6	2	0							
	Max	116	90	94	98	91	110	102	116							
Physical function (score)	Mean	16.8	15.5	16.2	17.1	15.3	16.3	16.1	16.2							
	Sd	5.4	4.2	5.5	5.7	3.7	4.8	3.8	4.8							
	Min	8	8	8	8	8	8	9	8							
	Max	32	23	26	28	24	26	26	32							
CRP	Mean	30	23	31	31	31	28	31	205							
	Sd	56.7	26.4	48	33.6	28.1	48.1	37.5	40.1							
	Min	2	5	3	3	3	3	3	2							
	Max	248	115	198	182	200	333	135	333							

FIG. 1C

WO 02/02638

PCT/US01/21204

4/52

Demographic - Disease -

	Placebo N=32	CTLA.5 N=26	CTLA.2 N=32	CTLA.10 N=32	LEA.5 N=32	LEA.2 N=29	LEA.10 N=31	Total N=214
Tender joints (score)								
N	32	26	32	32	32	29	31	214
Mean	32.1	32.5	32.1	29.4	25.6	30.7	30.6	30.4
Sd	14.8	14.8	15	14.6	12	13.3	12.9	13.9
Min	12	14	11	12	12	12	12	11
Max	63	64	68	68	61	63	59	68
Swollen joints (score)								
N	32	26	32	32	32	29	31	214
Mean	23.9	18.6	26.9	22.7	18.3	22.6	19.9	21.9
Sd	10	6.3	11.4	12.7	7.6	8.5	8.9	10
Min	10	10	10	10	10	10	10	10
Max	51	33	53	58	36	40	44	58
Pain (score)								
N	32	26	32	32	32	29	31	214
Mean	3.5	3.4	3.5	3.5	3.5	3.3	3.5	3.5
Sd	0.9	0.6	0.6	1	0.7	0.8	0.7	0.8
Min	2	2	2	1	2	2	3	1
Max	5	5	5	5	5	5	5	5
AM stiffness (min.)								
N	31	26	32	31	32	29	30	211
Mean	156.6	211.5	145.2	149.5	160.9	160.3	147.5	160.5
Sd	121.5	370.6	102.1	148.7	151.1	152.3	258.3	198.1
Min	30	0	5	35	30	0	15	0
Max	600	1440	420	720	600	720	1440	1440

FIG. 1D

WO 02/02638

PCT/US01/21204

5/52

Demographic- Prior treatments -

	Placebo N=32	CTLA.5 N=26	CTLA.2 N=32	CTLA.10 N=32	LEA.5 N=32	LEA.2 N=29	LEA.10 N=31	Total N=214
Etanercept	Yes 0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	No 32 (100%)	26 (100%)	32 (100%)	32 (100%)	32 (100%)	29 (100%)	31 (100%)	214 (100%)
Methotrexate	Yes 23 (72%)	22 (85%)	26 (81%)	24 (75%)	24 (75%)	21 (72%)	28 (90%)	168 (79%)
	No 9 (28%)	4 (15%)	6 (19%)	8 (25%)	8 (25%)	8 (28%)	3 (10%)	46 (21%)
Other DMARDs	Yes 28 (86%)	23 (88%)	25 (78%)	26 (81%)	28 (86%)	24 (83%)	25 (81%)	179 (84%)
	No 4 (13%)	3 (12%)	7 (22%)	6 (19%)	4 (13%)	5 (17%)	6 (19%)	35 (16%)
C-Steroids	Yes 31 (97%)	26 (100%)	29 (91%)	27 (84%)	27 (84%)	28 (97%)	24 (77%)	192 (90%)
	No 1 (3%)	0 (0%)	3 (9%)	5 (16%)	5 (16%)	1 (3%)	7 (23%)	22 (10%)
NSAIDs	Yes 27 (84%)	20 (77%)	30 (94%)	29 (91%)	26 (81%)	25 (86%)	25 (77%)	181 (85%)
	No 5 (16%)	6 (23%)	2 (6%)	3 (9%)	6 (19%)	4 (14%)	7 (23%)	33 (15%)
Other	Yes 30 (94%)	22 (85%)	29 (91%)	30 (94%)	31 (97%)	29 (100%)	29 (94%)	200 (93%)
	No 2 (6%)	4 (15%)	3 (9%)	2 (6%)	1 (3%)	0 (0%)	2 (6%)	14 (7%)

FIG. 1E

**Summary of Discontinuations by Reason
on or before Day 85**

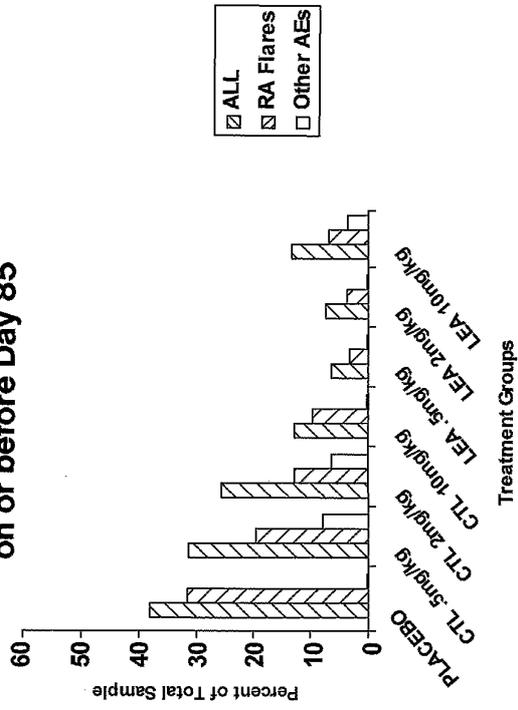


FIG. 2

ACR response at Day 85

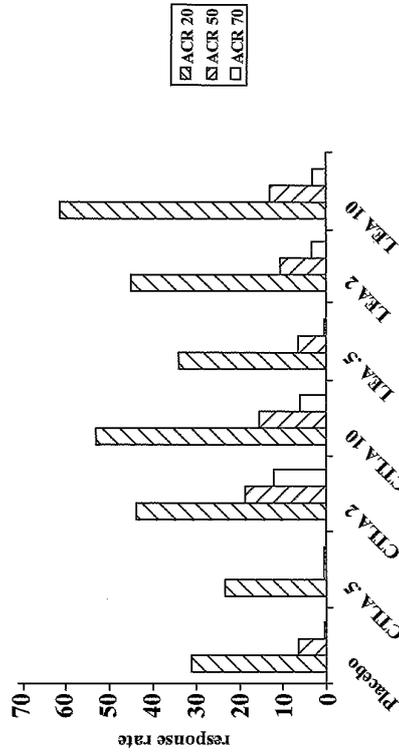
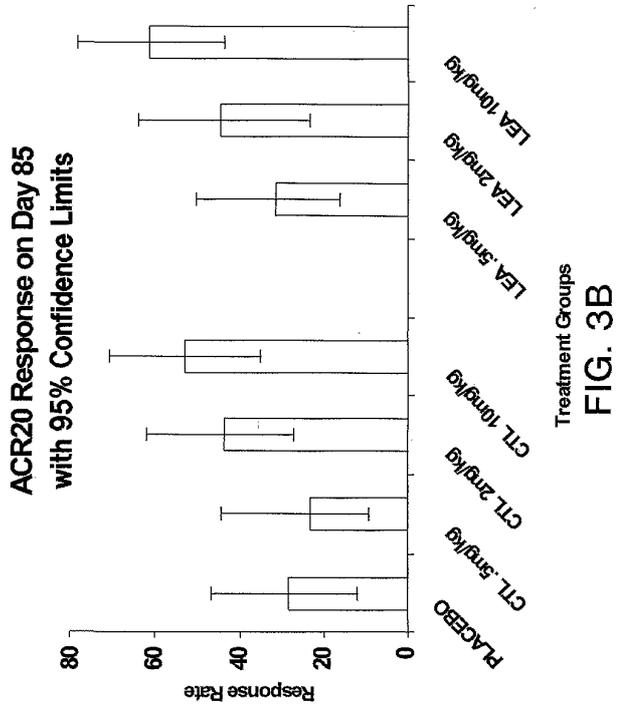


FIG. 3A



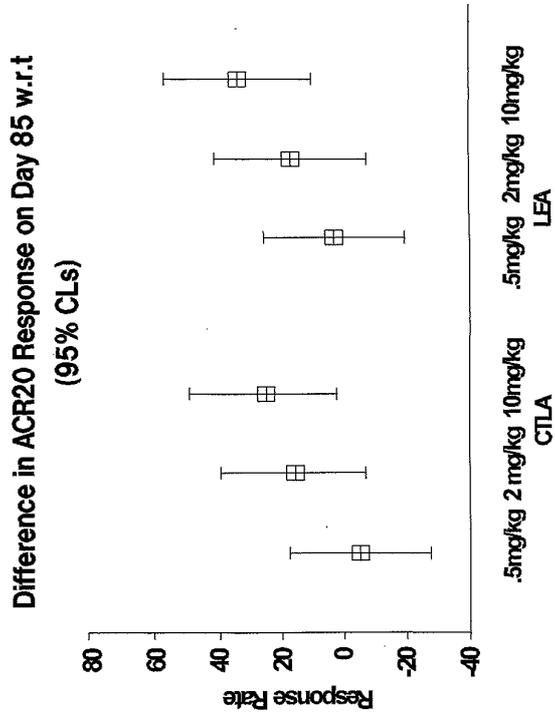


FIG. 3C

Basic (20%) Clinical Response in swollen & tender joint count

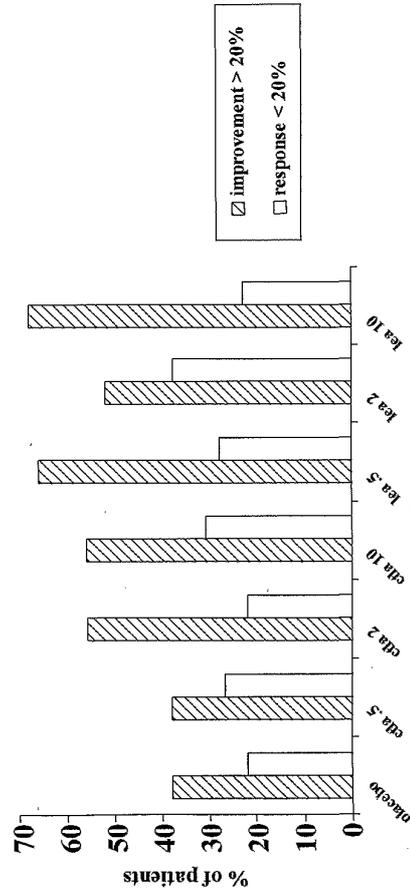
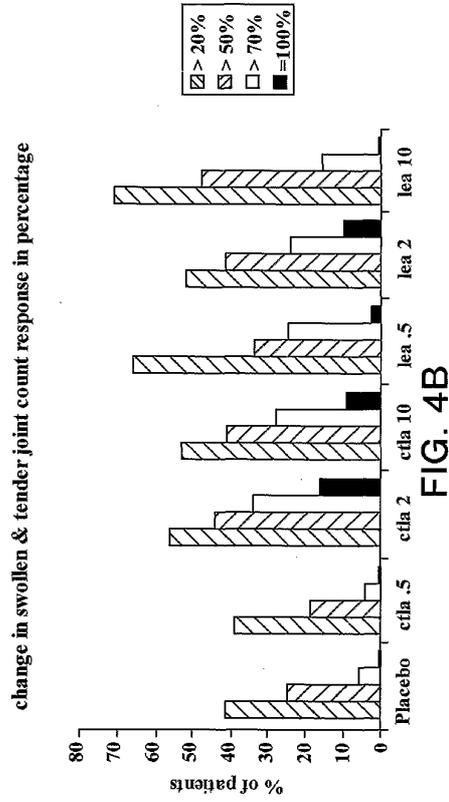


FIG. 4A

11/52

Clinical Response at Day 85



Pain (Likert scale unit changes)

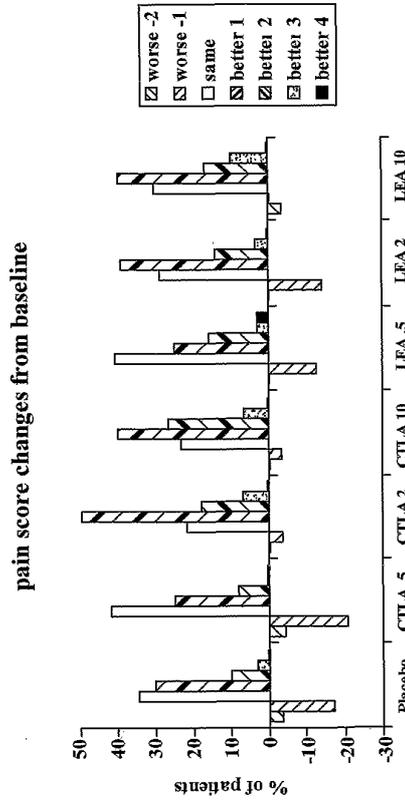


FIG. 5A

Patient Global Disease Changes (Likert scale unit changes) score changes from baseline

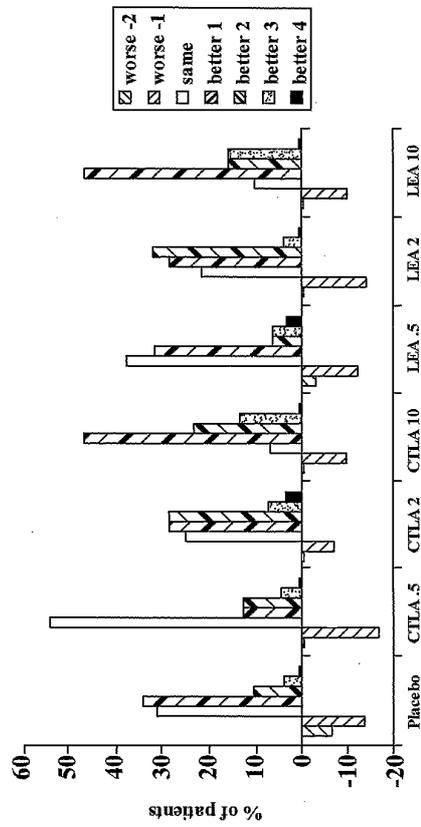


FIG. 5B

Physician Global Disease Changes (Likert scale unit changes)

score changes from baseline

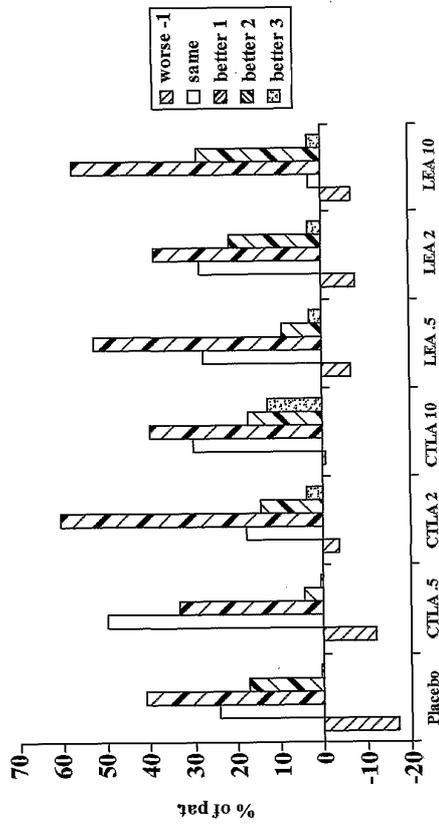


FIG. 5C

Pain

- Changes from Baseline -

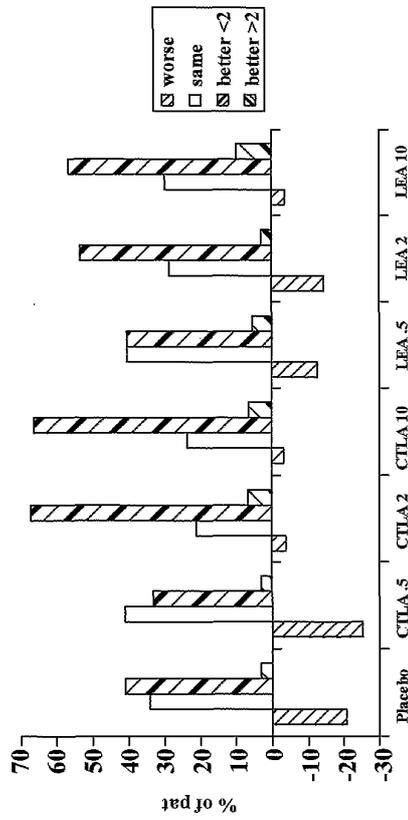


FIG. 5D

Patient Global Assessment - Disease Activity Change from Baseline -

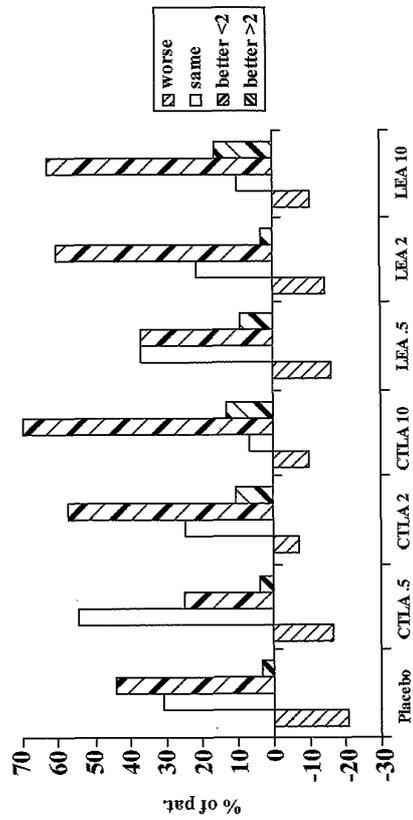


FIG 6A

17/52

Physician Global Assessment -Disease Activity Changes from Baseline -

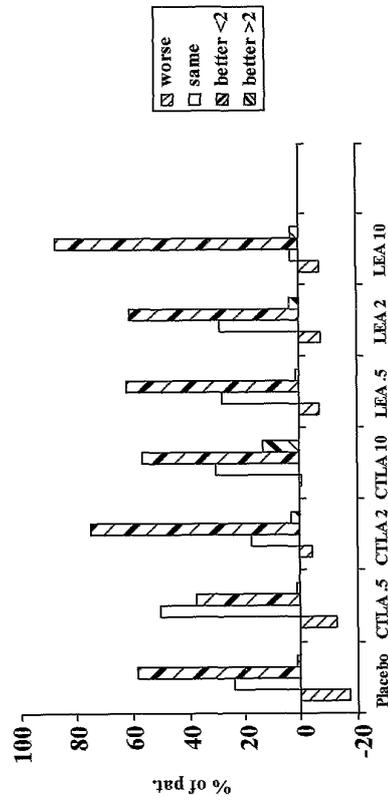
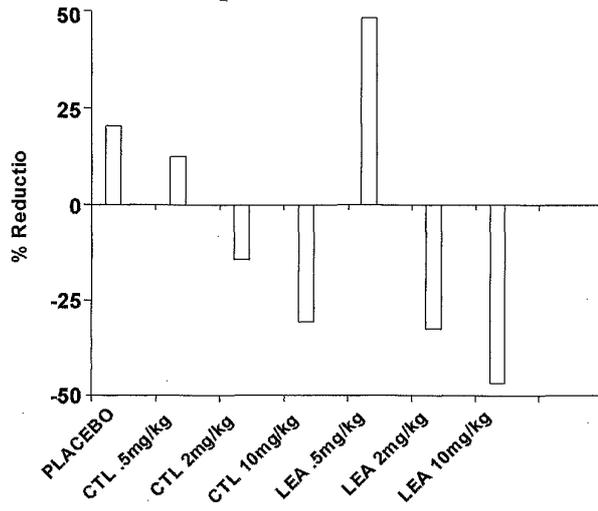


FIG. 6B

**Percent Reduction in CRP Levels on Day 85
compared to Baseline**



Treatment Groups
FIG. 7A

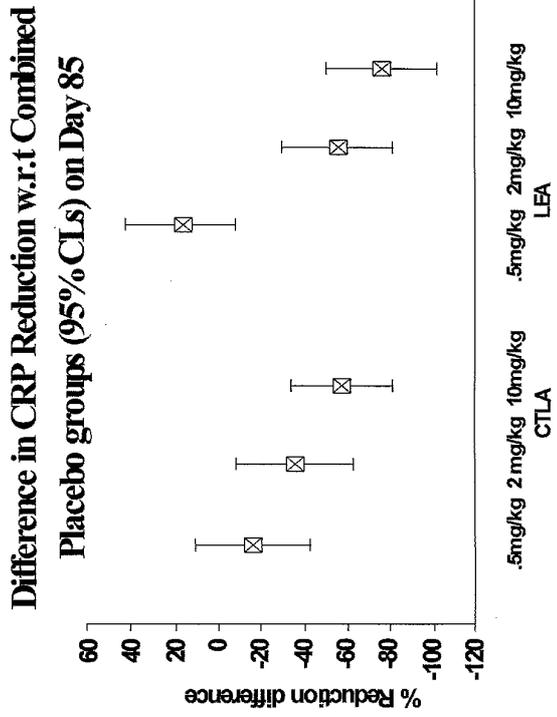


FIG. 7B

WO 02/02638

PCT/US01/21204

20/52

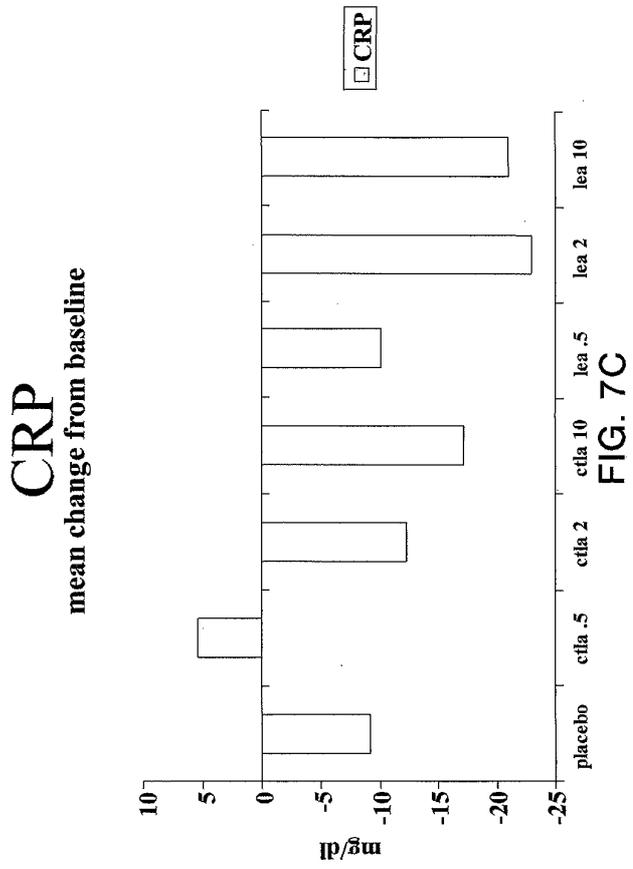
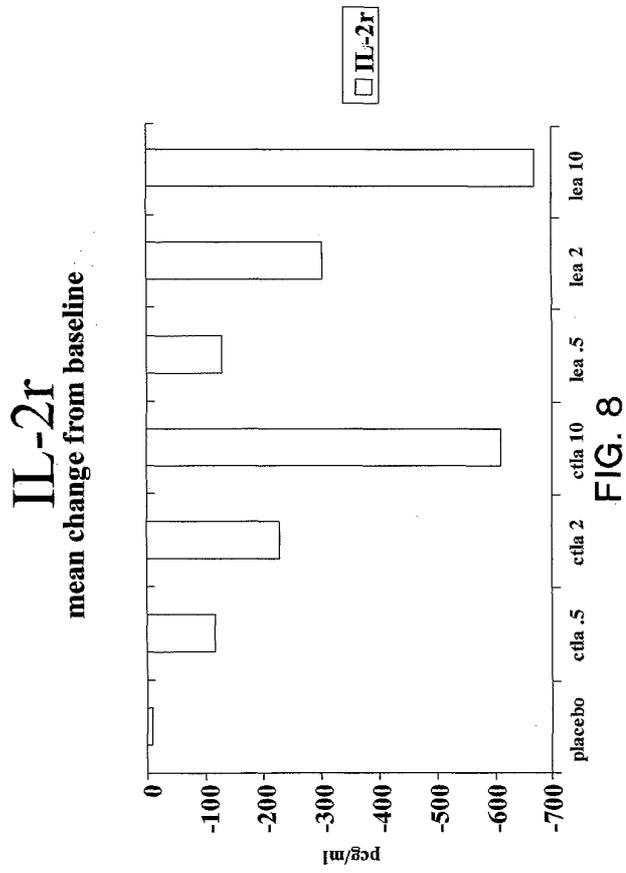


FIG. 7C

WO 02/02638

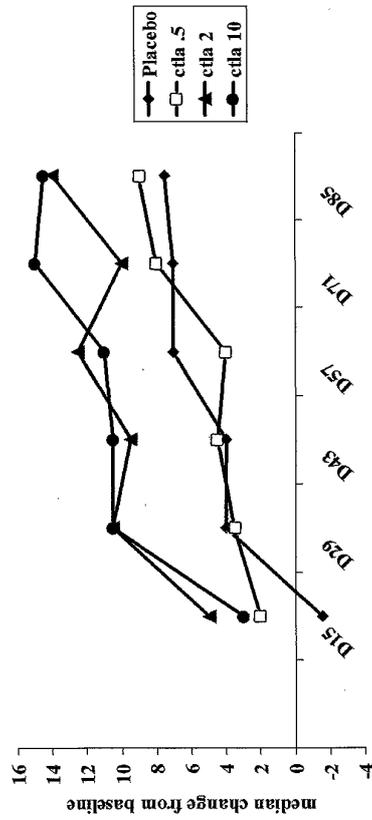
PCT/US01/21204

21/ 5 2



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

CTLA tender joints - median difference from baseline -



visit days
FIG. 9A

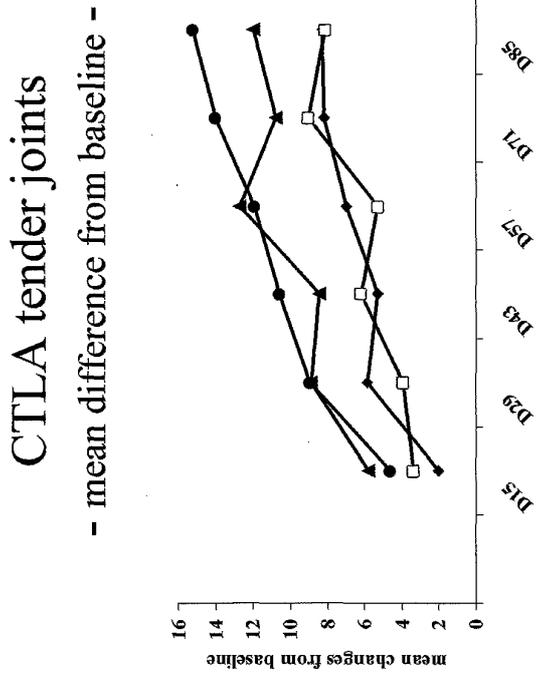


FIG. 9B

CTLA swollen joints - median difference from baseline -

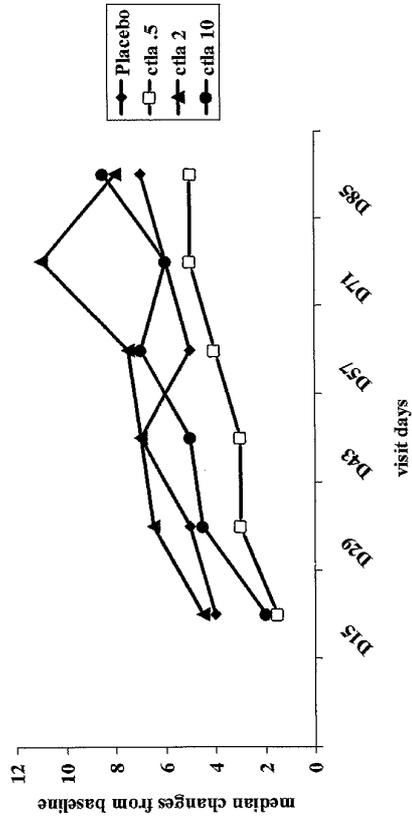


FIG. 10A

CTLA swollen joints

- mean difference from baseline -

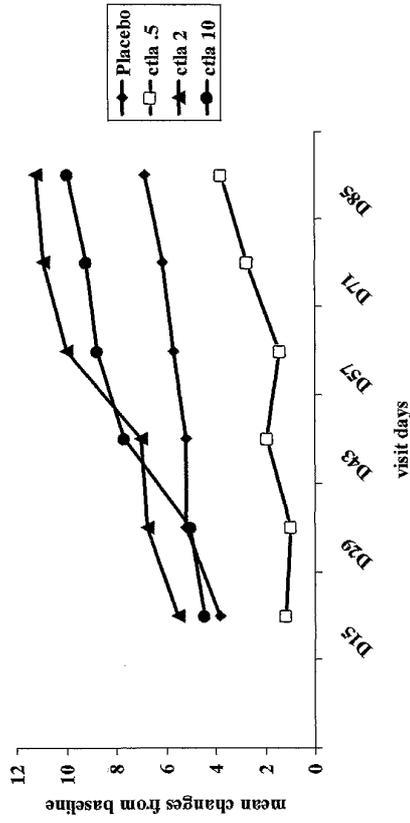


FIG. 10B

CTLA Pain Assessment

- mean difference from baseline -

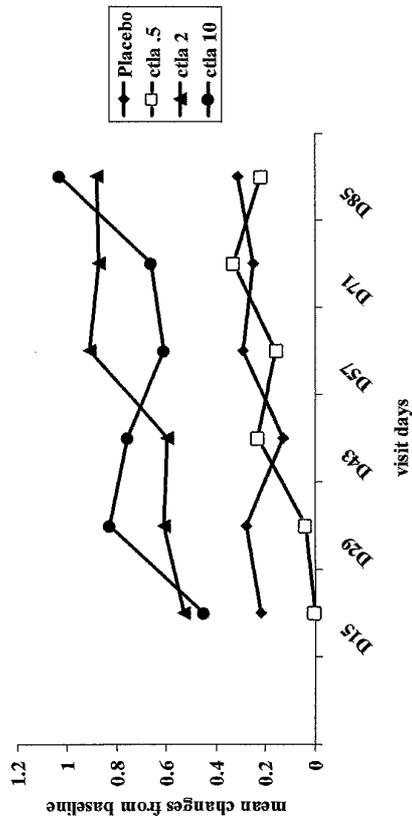


FIG. 11

27/52

CTLA

Patient Assessment Disease Activity

- mean difference from baseline -

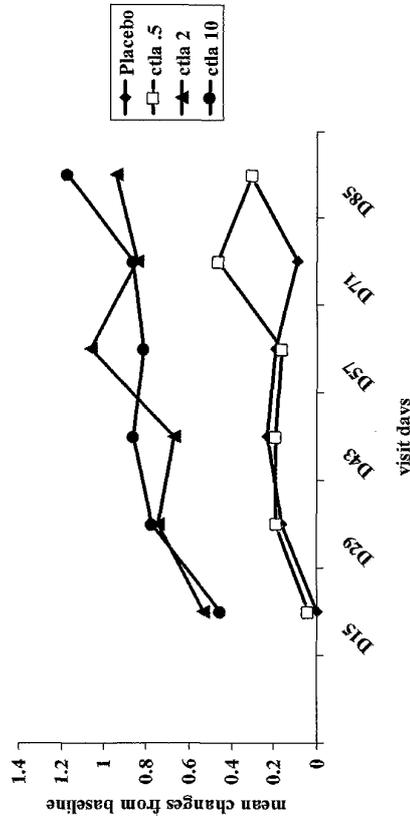


FIG. 12A

CTLA Physician Assessment Disease Activity

- mean difference from baseline -

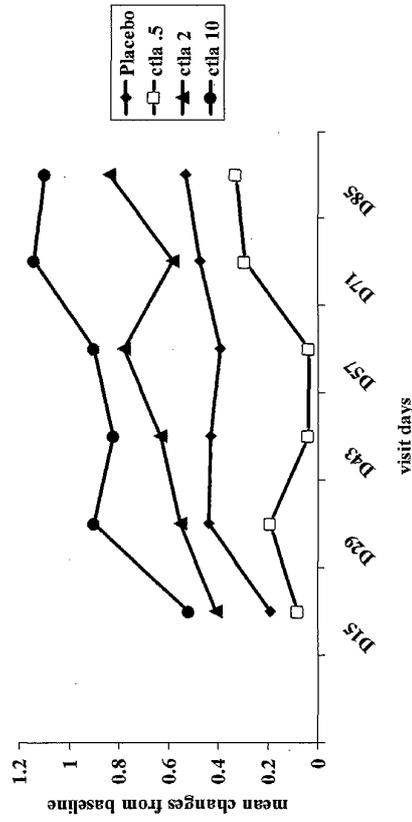
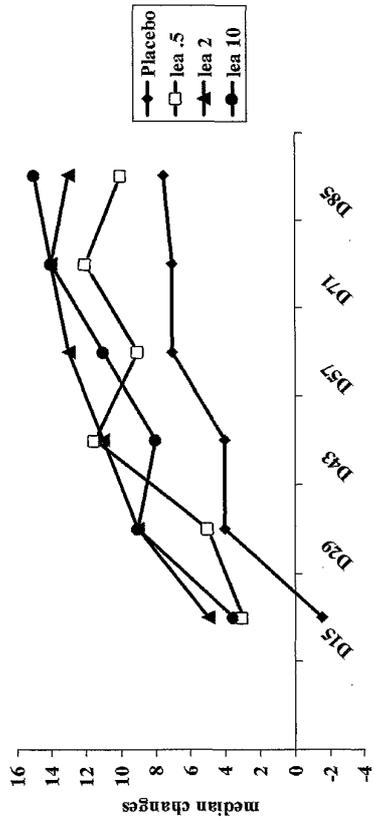


FIG. 12B

LEA tender joints
- median difference from baseline -



visit days
FIG. 13A

LEA tender joints

- mean change from baseline -

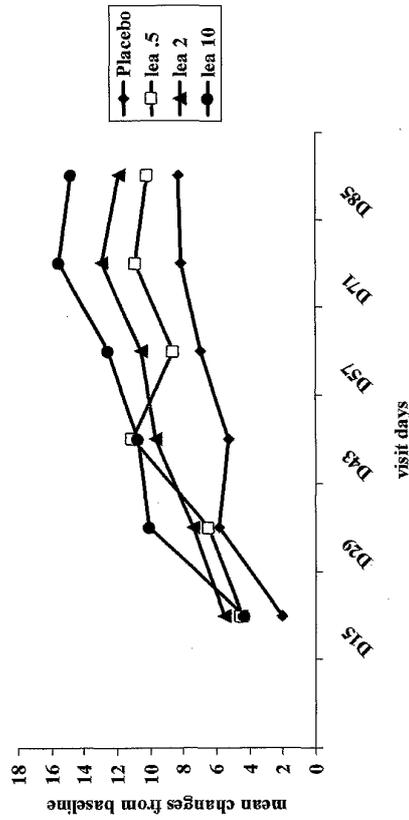


FIG. 13B

LEA swollen joints - median difference from baseline -

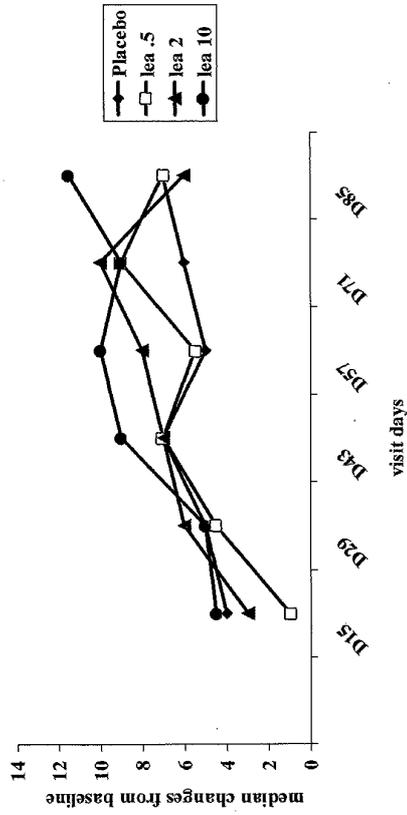


FIG. 14A

32 / 52

LEA swollen joints - mean change from baseline -

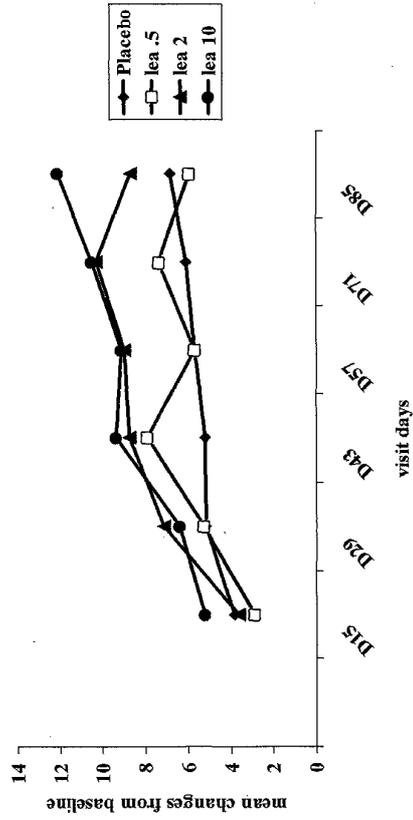


FIG. 14B

LEA Pain Assessment - mean change from baseline -

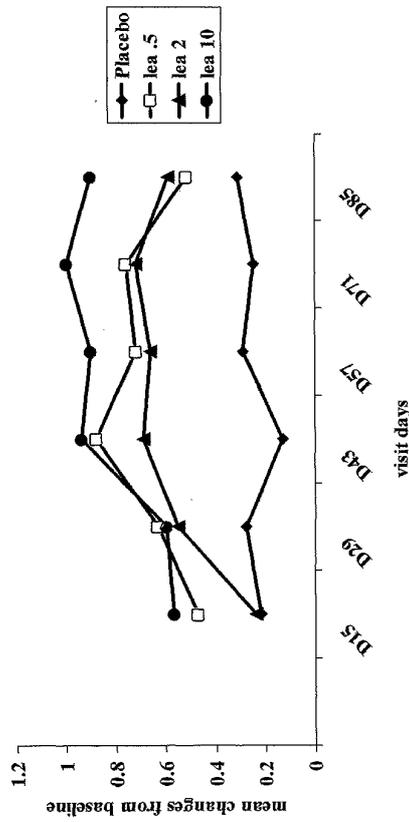


FIG. 15

34/52

LEA

Patient Assessment Disease Activity

- mean difference from baseline -

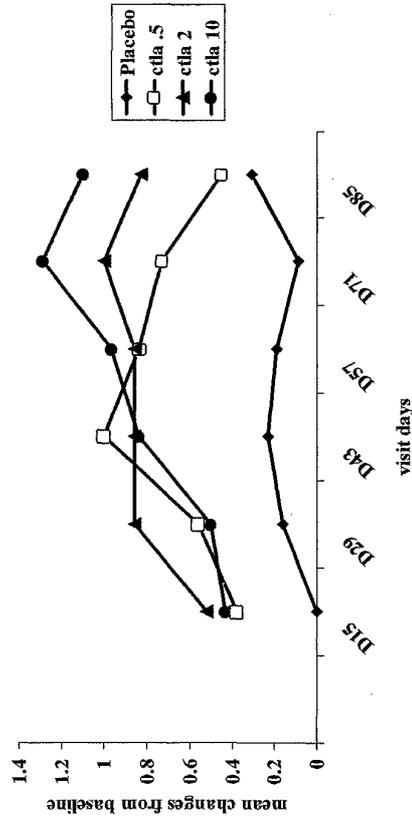


FIG. 16A

LEA

Physician Assessment Disease Activity

- mean difference from baseline -

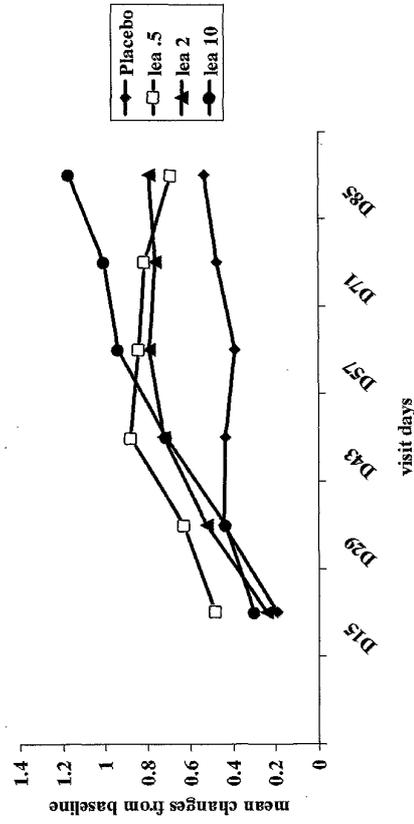
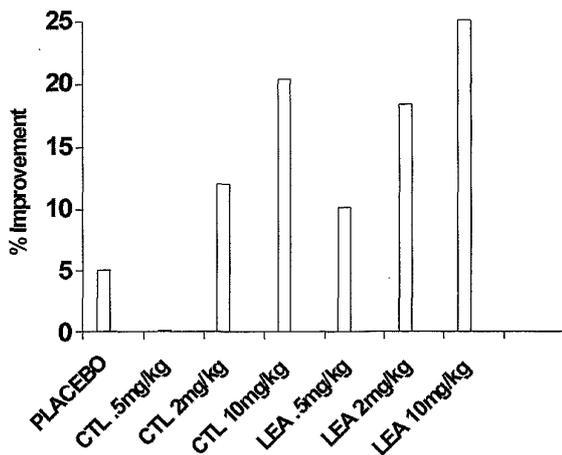


FIG. 16B

Percent Improvement in HAQ Levels on Day 85 compared to Baseline



Treatment Groups
FIG. 17

WO 02/02638

PCT/US01/21204

37/52

ATGGGTACTGCTCACACAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCTGCACTCCTGTTTCCA -19
M--G--V--L--L--T--R--Q--R--L--L--S--L--V--L--A--L--F--P-- -7

AGCATGGCCAGCATGGCATTGCACTGGCCAGCCTGCTGTGTTACTGGCCAGCCGA +42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R-- +14
+1

GGCATGCTAGCTTTGTGTGTGACTATGCATCTCCAGGCAGGCCACTGAGTCCGGGTG +102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--A--T--E--V--R--V-- +34

ACAGTGTCTCGGCGAGCTGACAGCCAGTGAAGTCTGTGGCCACCTACATGATG +162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M-- +54

GGGATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCATCTGCAAGGCACTCCAGTGGAAATCAA +222
G--N--E--L--T--F--L--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q-- +74

GTGAACTCCTATCCAGGACTGAGGCGCATGGACCGGACTCTACATCTGCAAGGTG +282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V-- +94

GAGCTCATGTACCCACCCATACTACGAGGGCATAGGCAACCCAGATTTATGTA +342
T--L--P--Y--P--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V-- +114

ATTGATCCAGAACCGTCCAGATTCGATCAGGAGCCAAATCTCTGACAAAATCAC +402
I--D--P--E--P--C--D--D--S--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H-- +134

ACATCCCACCGTCCCGACCTGAATCCTGGGGGATCGTCACTCTCCCTTCCCC +462
T--S--P--S--P--A--P--E--L--L--G--S--S--V--F--L--F--P-- +154

CCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCOCTGAGGTACATGCGTGGTGGT +522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V-- +174

GACGTGAGCCACGAGACCCCTGAGGTCAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG +582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V-- +194

CATAATGCCAAGACAAGCCGCGGAGGAGCAGTACACAGCACGTACCGTETGGTCAGC +642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S-- +214

GTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAGTGAAGGTCTCC +702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S-- +234

AACAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA +762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--Q--P--R-- +254

GAAACACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTGAGC +822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S-- +274

CTGACCTGCTGTCAAGGCTTCTATCCAGGACATCGCCTGGAGTGGGAGAGCAAT +882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N-- +294

GGGCGCCGAGAACACTACAGACCAGGCTCCCGTGTGACTCCGACGGTCTCTTC +942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F-- +314

FTCCTCTACAGCAGCTCACCGTGGACAGAGCAGGTGGCAGCGGGACGTCTTCTCA +1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S-- +334

TGCTCGTGAATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACAGCAGAGAGGCTCTCCCTGTCT +1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S-- +354

CGGGTAATGA
P--G--K--*

FIG. 18

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/02638

PCT/US01/21204

38/52

ATGGGTCTACTGCTCACACAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCTGCACTCCTGTTTCCA -19
H--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P-- -7

AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACCTGGCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA +42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R-- +14
+1

GGCATCGTACCTTTGTGTCTGAGTATGCATCTCCAGGCAAAATACTGAGGTCGGGGTG +102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--F--G--K--Y--T--E--V--R--V-- +34

ACAGTGCCTTGGCGAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAGTCTGTGCGGCACCTACATGATG +162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M-- +54

GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA +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

GAGCTCATGTACCCACCGCCACTACTACGAGGGCATAGGCAACGGRAACCAGATTATGTA +342
E--L--M--P--P--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V-- +114

ATTGATCCAGAACCCGTGCCAGATTCTGATCAGGAGCCCAATCTTCTGACAAAATCAC +402
I--D--P--E--P--C--P--D--D--S--D--Q--E--P--K--S--D--K--T--H-- +134

ACATCCCCACCGTCCCGACCTGAACTCCTGGGGGATCGTCACTTCTCTTCCCC +462
T--K--P--S--P--P--A--P--B--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P-- +154

CCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTG +522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V-- +174

GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG +582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V-- +194

CATAATGCCAAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGTCAGC +642
H--N--A--K--T--K--R--R--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S-- +214

GTCCCTACCGTCTGACCCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCC +702
V--L--T--V--L--H--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S-- +234

AACAAGCCCTCCAGCCCCATGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGGA +762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--F--R-- +254

GAACCAAGGATGACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACAGCTCAGC +822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--E--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S-- +274

CTGACCTGCTGTGCAAGGCTTCTATCCCAAGCAGTCCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT +882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--R--V--E--N--E--S--N-- +294

GGCAGCCGGAGAACACTACAGACCACGCTCCCGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTC +942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F-- +314

TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCGGGGACGTCTCTCA +1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--N--Q--G--N--V--F--S-- +334

TGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACTACACGCAAGAGGCTCTCCCTGTCT +1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S-- +354

CCGGTAAATGA
P--G--K--*

FIG. 19

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/02638

PCT/US01/21204

42/52

ONCOSTATIN M SIGNAL PEPTIDE

M G V L L T Q R T L L S L V L 45
 ATG GGT GTA CCG CTC ACA CAG AGG ACG CCG CTC AGT CTG GTC CTT

A L L F P S M A S M A M H V A 90
 GCA CTC CTG TTT CCA AGC ATG GCG AGC ATG GCA ATG CAC GTG GCC

Q P A V V L A S S R G I A S F 135
 CAG CCT GCT CCG GTA CTG GCC AGC AGC CGA GGC ATC GCC AGC TTT

V C E Y A S P G K A T E V R V 180
 GTG TGT GAG TAT GCA TCT CCA GGC AAA GCC ACT GAG GTC CGG GTG

T V L R Q A D S Q V T E V C A 225
 ACA CTG CTT CCG CAG GCT GAC AGC CAG GTG ACT GAA GTC TGT GCG

A T Y M M G N E L T F L D D S 270
 GCA ACC TAC ATG ATG GGG AAT GAG TTG ACC TTC CTA GAT GAT TCC

I C T G T S S G N Q V N L T I 315
 ATC TGC ACG GGC ACC TCC AGT GGA AAT CAA GTG AAC CTC ACT ATC

Q G L R A M D T G L Y I C K V 360
 CAA GCA CTG AGG GCC ATG GAC ACG GGA CTC TAC ATC TGC AAG GTG

GLYCOSYLATION SITE

E L M Y P P P Y Y L G I G N G 405
 GAG CTC ATG TAC CCA CCG CCA TAC TAC CTG GGC ATA GGC AAC GGA

T Q I Y V I D P E P C P D S D 450
 ACC CAG AAT TAT GTA ATT GAT CCA GAA CCG TGC CCA GAT TCT GAC

F L L H I L A A V S S G L F F 495
 TTC CTC CTC TGG ATC CTT GCA GCA GTT AGT TCG GGG TTG TTT TTT

Y S F L L T A V S L S K M L K 540
 TAT AGC TTT CTC CTC ACA GCT GTT TCT TTG AGC AAA ATG CTA AAG

K R S P L T T G V Y V K M P P 585
 AAA AGA AGC CCT CTT ACA ACA GGG GTC TAT GTG AAA ATG CCC CCA

T E P E C E K Q F Q P Y F I P 630
 ACA GAG CCA GAA TGT GAA AAG CAA TTT CAG CCT TAT TTT ATT CCC

I N 636
 ATC AAT

FIG. 23

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/02638

PCT/US01/21204

43/52

ATGGGTGACTGCTCACACAGAGGACCGTCTCAGTCTGGTCTTGCACCTCTGTTTCCA -19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P-- -7

AGCATGGCAGCATGGCAATGCACCTGGCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA +42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--R--V--V--L--A--S--S--R-- +14
+1

GGCATCGTAGCTTTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAGCCACTGAGTCCGGGTG +102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--A--T--E--V--R--V-- +34

ACAGTCTTGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGGGGCAACCTACATGATG +162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M-- +54

GGAAATG>GACCTTCCATAGATGATCCATCTGCACGGGCACTCCAGTGGAAATCAA +222
G--N--E--T--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--G--L--Y--I--C--K--V-- +94

GAGCTCAITGACCCAGCCATACTACTCTGGGCATAGGCAACGGAAACCCAGATTTATGTA +342
E--L--P--E--P--P--P--Y--L--L--G--I--N--G--T--Q--I--Y--V-- +114

ATTGATCCAGAACCCTGCCAGATTTCTGATCAGGAGCCCAATCTCTGACAAAACCTCAC +402
I--D--P--P--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--D--K--T--H-- +134

ACATCCCACCCCTCCCAGCACCTGAACCTCTGGGTGGATCGTCACTCTCCCTCTCCCC +462
T--S--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P-- +154

CCAAAACCCAAAGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACACATGCGTGGTGTG +522
P--K--P--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V-- +174

GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCTGGAGGTG +582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V-- +194

CATAATCCCAAGACAAGCCCGGGAGGAGCAGTACACACGACACSTACCCGGTGGTCAGC +642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S-- +214

GTCTCCACCGTCTGACACAGGACTGGCTGAATGGCABGAGTACAGTGCAGGTCTCC +702
V--L--T--V--L--H--Q--D--H--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S-- +234

AACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCGACCCCGA +762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R-- +254

GAACACAGGTGTACACCCCTGCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGC +822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S-- +274

CTGACCTGCTGGTCAAGGCTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT +882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N-- +294

GGCAGCCGAGAGAACAATAACAGACCAAGCCCTCCCGTGTGGACTCGACGGCTCCTTC +942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--V--L--D--S--D--G--S--F-- +314

TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAGTCTTCTCA +1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--G--N--V--F--S-- +334

TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCGCAGAGAGCCTCTCCCTGTCT +1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S-- +354

CCGGTAAATGA
P--G--K--*

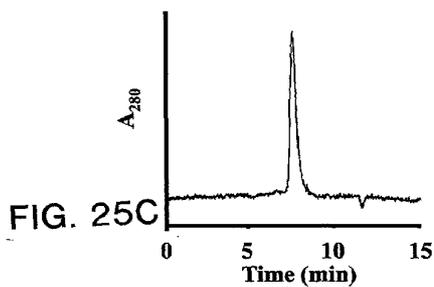
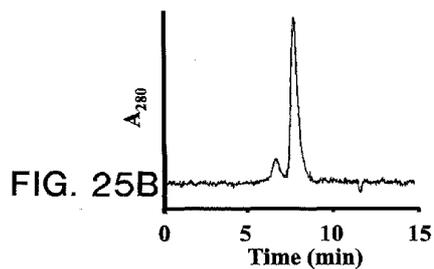
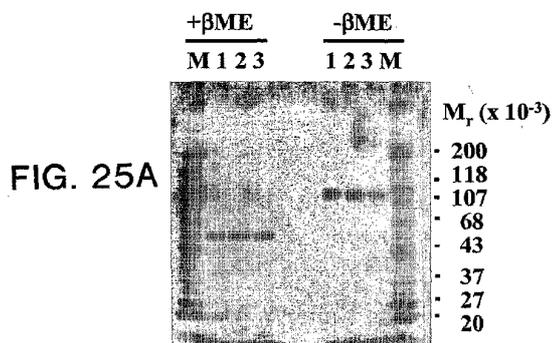
FIG. 24

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/02638

PCT/US01/21204

44/52



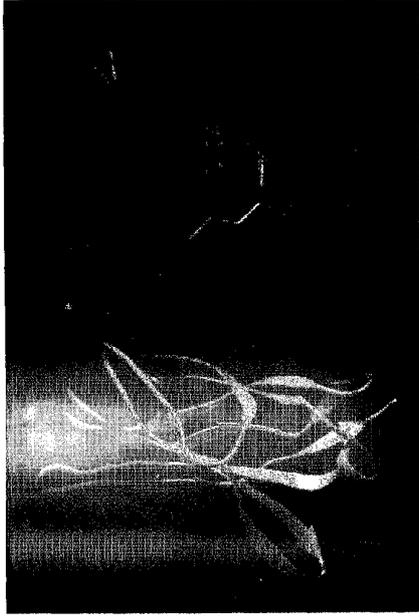


FIG. 26

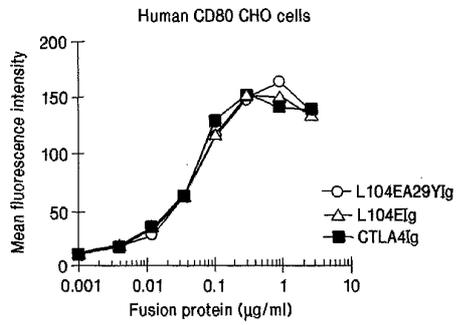


FIG. 27A

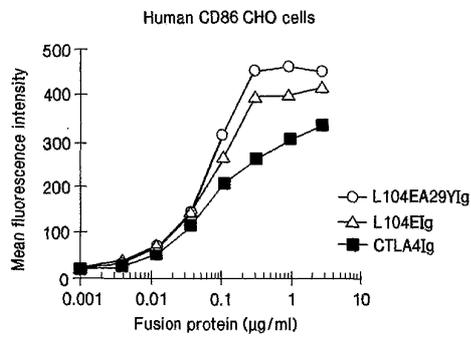


FIG. 27B

47/52

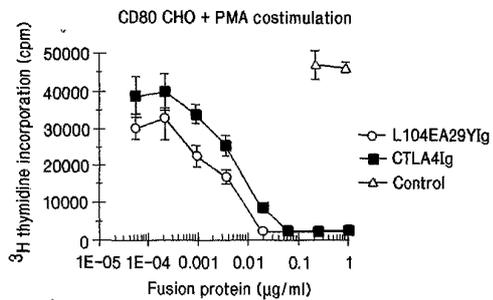


FIG. 28A

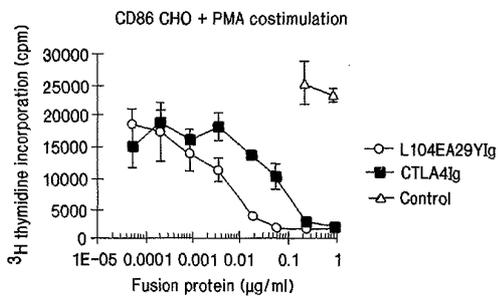


FIG. 28B

48/52

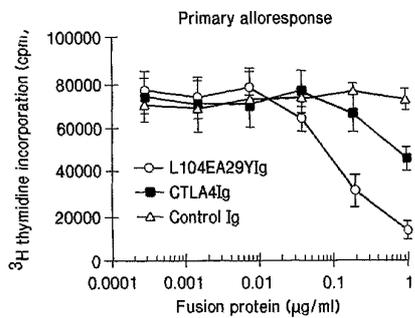


FIG. 29A

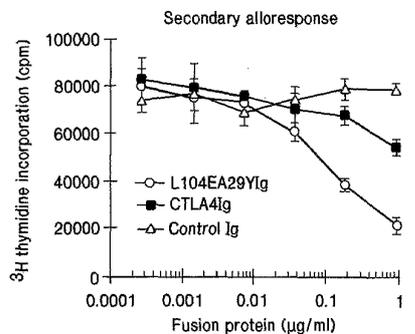


FIG. 29B

WO 02/02638

PCT/US01/21204

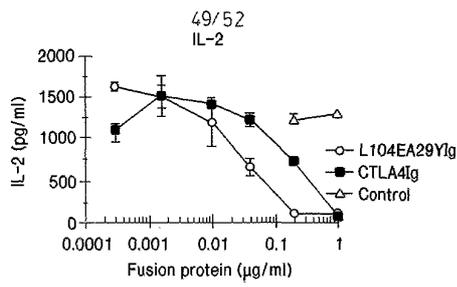


FIG. 30A

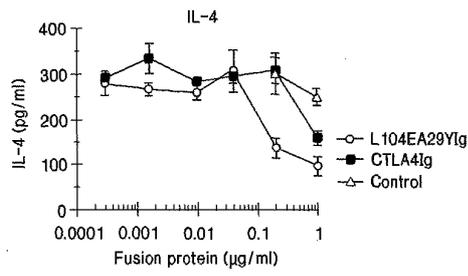


FIG. 30B

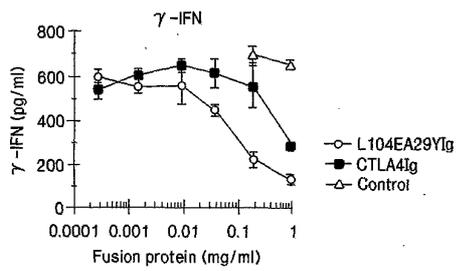


FIG. 30C

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

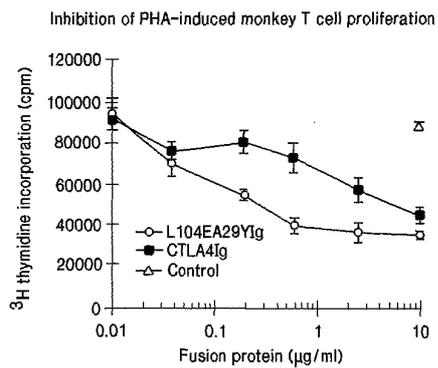


FIG. 31

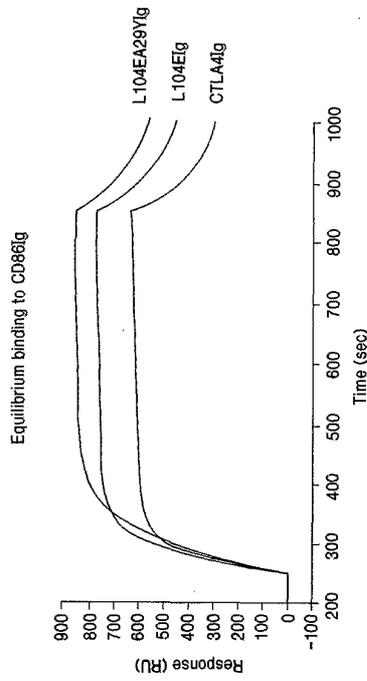


FIG. 32

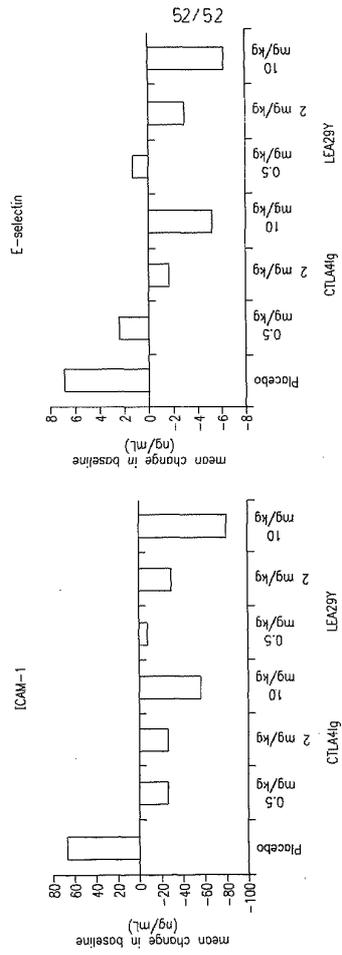


FIG. 33

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 January 2002 (10.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/002638 A3

- (51) International Patent Classification: A61K 38/17, 45/06, A61P 19/02, 37/04 (74) Agents: SHER, Audrey, F.; Bristol-Myers Squibb Company, P.O. Box 4000, Lawrenceville-Princeton Road, Princeton, NJ 08543-4000 et al. (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/21204 (81) Designated States (national): AL, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) International Filing Date: 2 July 2001 (02.07.2001) (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KH, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/215,913 3 July 2000 (03.07.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY [US/US]; P.O. Box 4000, Lawrenceville-Princeton Road, Princeton, NJ 08543 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): COHEN, Robert [US/US]; 130 Meadowview Drive, Newton, PA 18940 (US), CARR, Suzette [US/US]; 579 Province Line Road, Hopewell, NJ 08525 (US), HAGERTY, David [US/US]; 3 Nohodser Drive, Pennington, NJ 08534 (US), PEACH, Robert, J. [NZ/US]; 12848 Via Caballo Rojo, San Diego, CA 92129 (US), BECKER, Jean-Claude [FR/US]; 16 Halstead Place, Princeton, NJ 08543 (US).
- Published:
— with international search report
- (88) Date of publication of the international search report:
30 October 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/002638 A3

(54) Title: METHODS FOR TREATING RHEUMATIC DISEASES USING A SOLUBLE CTLA4 MOLECULE

(57) Abstract: The present invention relates to compositions and methods for treating rheumatic disease by administering to a subject, soluble CTLA4 molecules that block endogenous B7 molecules from binding their ligands.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. Application No. PL/US 01/21204
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K38/17 A61K45/06 A61P19/02 A61P37/04		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, SEQUENCE SEARCH, CHEM ABS Data, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 968 510 A (LEDBETTER JEFFREY A ET AL) 19 October 1999 (1999-10-19) column 8, line 31 - column 11, line 45 column 34, line 4 - line 14 column 38, line 1 - line 25; table 2 ---	1,3,4, 26,32-34
X	US 5 844 095 A (LEDBETTER JEFFREY A ET AL) 1 December 1998 (1998-12-01) column 4 - column 5 column 11, line 14 - line 45 examples 2,6; table 2 column 9, line 13 - line 30 ---	1,3,4, 26,32-34
E	WO 01 92337 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO ;BAJORATH JURGEN (US); LINSLEY PETER S (US) 6 December 2001 (2001-12-06) the whole document --- -/--	1,3-38
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 17 March 2003		Date of mailing of the international search report 16 07 2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer: Bayrak, S

Form PCT/ISA210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		In Application No PC17US 01/21204
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MORTON P A ET AL: "Differential effects of CTLA-4 substitutions on the binding of human CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2binding of human)" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, vol. 156, no. 3, 1 February 1996 (1996-02-01), pages 1047-1054, XP002098032 ISSN: 0022-1767 the whole document ---	1,3-38
A	PEACH R J ET AL: "COMPLEMENTARITY DETERMINING REGION 1 (CDR1)- AND CDR3-ANALOGOUS REGIONS IN CTLA-4 AND CD28 DETERMINE THE BINDING TO B7-1" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, TOKYO, JP, vol. 180, no. 6, 1 December 1994 (1994-12-01), pages 2049-2058, XP000199779 ISSN: 0022-1007 the whole document -----	1,3-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 01/21204
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input checked="" type="checkbox"/>	<p>Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 1,3-25, 32-33 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.</p>
2.	<input checked="" type="checkbox"/>	<p>Claims Nos.: 1,3-38 (all partially) because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210</p>
3.	<input type="checkbox"/>	<p>Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
see additional sheet		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input checked="" type="checkbox"/>	<p>No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</p> <p>1, 3-38</p>
Remark on Protest		
	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US 01/21204

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1,3-38

Pharmaceutical composition or use of any soluble CTLA4 mutant molecule that binds a B7 molecule, for the therapy of rheumatic diseases, excluding invention 2:

1.1. Claim : 5

Pharmaceutical composition or use of a soluble CTLA4 mutant molecule that binds a B7 molecule (SEQ ID NO 17) having a mutation at position 104, wherein leucine is substituted with any other amino acid, for the therapy of rheumatic diseases.

1.2. Claim : 6

Pharmaceutical composition or use of a soluble CTLA4Ig mutant (1 through 357; SEQ ID NO 7) that binds a B7 molecule with a mutation at position 104, wherein leucine is substituted with glutamic acid, for the therapy of rheumatic diseases.

1.3. Claim : 7

Pharmaceutical composition or use of a soluble CTLA4Ig mutant (-1 through 357) (SEQ ID NO 7) that binds a B7 molecule with a mutation at position 104, wherein leucine is substituted with glutamic acid, for the therapy of rheumatic diseases.

1.4. Claims: 8, 13,17-25,27-30,32-33,35-38 (all partially)

Pharmaceutical composition or use of soluble CTLA4 mutant molecules (SEQ ID NO 17) that bind a B7 molecule having a double mutations at positions: a) L104EA29X (claims 8, 13,17-25,27-30,32-33,35-38 (all partially)); b) L104EG105X (claims 8 partially); c) L104ES25 (claims 8 partially); d) L104ET30X (claims 8 partially), for the therapy of rheumatic diseases.

1.5. Claims: 9,11,14,28,36(all partially), and15, 29,37

Pharmaceutical composition or use of a soluble CTLA4Ig mutant (1 through 357; SEQ ID NO 9) that binds a B7 molecule with a mutation at positions 104 (leucine is substituted with glutamic acid), and 29 (alanine is substituted by tyrosine), for the therapy of rheumatic diseases.

1.6. Claim : 9 (partially)

International Application No. PCT/US 01/21204

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Pharmaceutical composition or use of a soluble CTLA4Ig mutant (1 through 357; SEQ ID NO 11) that binds a B7 molecule with a mutation at positions 104 (leucine is substituted with glutamic acid), and 29 (alanine is substituted by leucine), for the therapy of rheumatic diseases.

1.7. Claim : 9 (partially)

Pharmaceutical composition or use of a soluble CTLA4Ig mutant (1 through 357; SEQ ID NO 13) that binds a B7 molecule with a mutation at positions 104 (leucine is substituted with glutamic acid), and 29 (alanine is substituted by threonine), for the therapy of rheumatic diseases.

1.8. Claim : 9 (partially)

Pharmaceutical composition or use of a soluble CTLA4Ig mutant (1 through 357; SEQ ID NO 15) that binds a B7 molecule with a mutation at positions 104 (leucine is substituted with glutamic acid), and 29 (alanine is substituted by tryptophan), for the therapy of rheumatic diseases.

1.9. Claims: 10,16,30,38, and partially 11,14,28,36

Pharmaceutical composition or use of a soluble CTLA4Ig mutant (-1 through 357; SEQ ID NO 9) that binds a B7 molecule with a mutation at positions 104 (leucine is substituted with glutamic acid), and 29 (alanine is substituted by tyrosine), for the therapy of rheumatic diseases.

1.10. Claim : 10

Pharmaceutical composition or use of a soluble CTLA4Ig mutant (-1 through 357; SEQ ID NO 11) that binds a B7 molecule with a mutation at positions 104 (leucine is substituted with glutamic acid), and 29 (alanine is substituted by leucine), for the therapy of rheumatic diseases.

1.11. Claim : 10

Pharmaceutical composition or use of a soluble CTLA4Ig mutant (-1 through 357) (SEQ ID NO 13) that binds a B7 molecule with a mutation at positions 104 (leucine is substituted with glutamic acid), and 29 (alanine is substituted by threonine) for the therapy of rheumatic diseases.

1.12. Claim : 10

International Application No. PCT/US 01/21204

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Pharmaceutical composition or use of a soluble CTLA4Ig mutant (-1 through 357; SEQ ID NO 15) that binds a B7 molecule with a mutation at positions 104 (leucine is substituted with glutamic acid), and 29 (alanine is substituted by tryptophan), for the therapy of rheumatic diseases.

1.13. Claim : 12

Pharmaceutical composition or use of a soluble CTLA4 mutant molecules (SEQ ID NO 17) that binds a B7 molecule having a first mutation at position 104 (L to E), a second mutation at positions 29 (A to Y), and a third mutation at position 25 (any other amino acid), for the therapy of rheumatic diseases.

1.14. Claims: 13, and partially 17-25,27-30,32-33,35-38

Pharmaceutical composition or use of a soluble CTLA4 binds a B7 mutant molecules (SEQ ID NO 17) that molecule having a mutation at position 104 (L to E), and a second mutation at positions 29 (A to Y) for the therapy of rheumatic diseases.

2. Claims: 2,39

Pharmaceutical composition or use of any soluble CTLA4 mutant molecules that binds a B7 molecule further having an immuno suppressive agent, for the therapy of rheumatic diseases.

Please note that all inventions mentioned under item 1, although not necessarily linked by a common inventive concept, could be searched without effort justifying an additional fee.

International Application No. PCT/US 01/21204

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box 1.2

Claims Nos.: 1,3-38 (all partially)

1. Present claims 1,3-5,8,12,13,17-27,31-34 relate to an extremely large number of possible compounds, namely "soluble CTLA4 mutants", or "soluble CTLA4 mutant molecule comprises a mutation...". Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the compounds claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible.

2. Claims 1,3-16,18-38 relate to the use of a pharmaceutical preparation for prophylaxis or treatment of "rheumatic diseases", which encompasses a multitude of different diseases. The claims thus cover a rather large number of diseases, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of diseases. Consequently, the claims lack support and the application lacks disclosure. Independent of the above reasoning, the claims 1,3-16,18-38 also lack clarity because it is not fully possible to determine the diseases for which protection might legitimately be sought (Article 6 PCT).

3. Claim 18 is related to the prevention or treatment of diseases which are not clearly defined, namely conditions related to "alleviating a symptom associated with a rheumatic disease selected...". Due to the functional definition of the claimed subject-matter, the scope of protection of the claim 18 is obscure and not limited to the treatment of said specified conditions in the description and/or the claims but, by contrast, embraces an undefined number of other conditions allegedly capable of being improved or prevented by the administration of soluble CTLA4 mutants. Therefore, the claim 18 lacks support (Article 6 PCT) and the application lacks disclosure (Article 5 PCT). Independent of the above reasoning the terms such as "structural damage", "pain", and "elevated level of..." are vague and unclear and leave the reader in doubt as to the meaning of the technical feature to which they refer, thereby rendering the definition of the subject-matter of claim 18 unclear (Article 6 PCT).

Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the use of the specific mutants as mentioned in claims 6,7,9,10,14,15 in the treatment of rheumatoid arthritis; and with due regard to the general concept of the invention, i.e. CTLA4 molecules having mutations at positions 25,29,30,104, or 105, and which may be embedded within a sequence.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant

International Application No. PCT/US 01/21204

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No. PLI/US 01/21204	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
US 5968510 A	19-10-1999	US 5885796 A	23-03-1999		
		US 5844095 A	01-12-1998		
		US 6090914 A	18-07-2000		
		US 5770197 A	23-06-1998		
		US 5851795 A	22-12-1998		
		US 5977318 A	02-11-1999		
		US 5885579 A	23-03-1999		
		AU 701310 B2	28-01-1999		
		AU 1645895 A	26-10-1995		
		CA 2146895 A1	16-10-1995		
		EP 0682039 A1	15-11-1995		
		FI 951801 A	16-10-1995		
		JP 8047391 A	20-02-1996		
		NO 951436 A	16-10-1995		
		US 5773253 A	30-06-1998		
		AU 682325 B2	02-10-1997		
		AU 5390194 A	28-07-1994		
		CA 2113744 A1	23-07-1994		
		EP 0613944 A2	07-09-1994		
		FI 940270 A	23-07-1994		
		IL 108374 A	29-02-2000		
		JP 7069914 A	14-03-1995		
		NO 940228 A	25-07-1994		
		AT 170562 T	15-09-1998		
		AU 661854 B2	10-08-1995		
		AU 2240092 A	25-01-1993		
		CA 2110518 A1	07-01-1993		
		DE 69226871 D1	08-10-1998		
		DE 69226871 T2	12-05-1999		
		DK 606217 T3	09-11-1998		
		EP 0606217 A1	20-07-1994		
		ES 2123001 T3	01-01-1999		
		FI 935795 A	22-12-1993		
		FI 20022285 A	30-12-2002		
		IE 922111 A1	30-12-1992		
		JP 6508989 T	13-10-1994		
		JP 2002017349 A	22-01-2002		
		JP 2002003399 A	09-01-2002		
		JP 2003012546 A	15-01-2003		
		JP 2003096097 A	03-04-2003		
KR 238712 B1	15-01-2000				
MX 9203605 A1	01-11-1993				
NO 934801 A	21-02-1994				
NO 20020491 A	21-02-1994				
NZ 243286 A	26-03-1996				
NZ 264712 A	26-03-1996				
PT 100637 A ,B	31-05-1994				
US 5844095 A	01-12-1998	US 6090914 A	18-07-2000		
		US 5770197 A	23-06-1998		
		US 5851795 A	22-12-1998		
		US 5885796 A	23-03-1999		
		US 5977318 A	02-11-1999		
		US 5968510 A	19-10-1999		
		US 5885579 A	23-03-1999		
		AU 701310 B2	28-01-1999		
		AU 1645895 A	26-10-1995		
		CA 2146895 A1	16-10-1995		

Form PC 1/ASA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				Int'l Application No PCT/JP01/21204		
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date			
US 5844095	A	EP 0682039	A1	15-11-1995		
		FI 951801	A	16-10-1995		
		JP 8047391	A	20-02-1996		
		NO 951436	A	16-10-1995		
		US 5773253	A	30-06-1998		
		AU 682325	B2	02-10-1997		
		AU 5390194	A	28-07-1994		
		CA 2113744	A1	23-07-1994		
		EP 0613944	A2	07-09-1994		
		FI 940270	A	23-07-1994		
		IL 108374	A	29-02-2000		
		JP 7069914	A	14-03-1995		
		NO 940228	A	25-07-1994		
		AT 170562	T	15-09-1998		
		AU 661854	B2	10-08-1995		
		AU 2240092	A	25-01-1993		
		CA 2110518	A1	07-01-1993		
		DE 69226871	D1	08-10-1998		
		DE 69226871	T2	12-05-1999		
		DK 606217	T3	09-11-1998		
		EP 0606217	A1	20-07-1994		
		ES 2123001	T3	01-01-1999		
		FI 935795	A	22-12-1993		
		FI 20022285	A	30-12-2002		
		IE 922111	A1	30-12-1992		
		JP 6508989	T	13-10-1994		
		JP 2002017349	A	22-01-2002		
		JP 2002003399	A	09-01-2002		
		JP 2003012546	A	15-01-2003		
		JP 2003096097	A	03-04-2003		
		KR 238712	B1	15-01-2000		
		MX 9203605	A1	01-11-1993		
		NO 934801	A	21-02-1994		
		NO 20020491	A	21-02-1994		
		NZ 243286	A	26-03-1996		
		NZ 264712	A	26-03-1996		
		PT 100637	A ,B	31-05-1994		
		-----	-----	-----	-----	-----
		WO 0192337	A	06-12-2001	AU 6346601	A
CA 2409748	A1				06-12-2001	
EP 1248802	A2				16-10-2002	
NO 20025656	A				25-11-2002	
WO 0192337	A2				06-12-2001	
US 2002182211	A1				05-12-2002	
-----	-----	-----	-----	-----		

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 7/04	A 6 1 P 7/04	
A 6 1 P 7/06	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/02	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 21/02	A 6 1 P 21/02	
A 6 1 P 21/04	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 25/04	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 27/02	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/00	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 37/02	
// C 0 7 K 14/705	A 6 1 P 43/00	1 0 5
	A 6 1 P 43/00	1 1 1
	A 6 1 P 43/00	1 2 1
	C 0 7 K 14/705	Z N A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, S D, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(74) 代理人 100103230

弁理士 高山 裕貴

(72) 発明者 ロバート・コーエン

アメリカ合衆国 1 8 9 4 0 ペンシルベニア州ニュートン、メドービュー・ドライブ 1 2 0 番

(72) 発明者 スゼット・カー

アメリカ合衆国 0 8 5 2 5 ニュージャージー州ホープウェル、プロビンス・ライン・ロード 5 7 9 番

(72) 発明者 デイビッド・ハガーティ

アメリカ合衆国 0 8 5 3 4 ニュージャージー州ペニンントン、ノバディア・ドライブ 3 番

(72) 発明者 ロバート・ジェイ・ピーチ

アメリカ合衆国 9 2 1 2 9 カリフォルニア州サンディエゴ、ピア・カパロ・ロホ 1 2 8 4 8 番

(72) 発明者 ジャン・クロード・ベッカー

アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャージー州プリンストン、ハルステッド・プレイス 1 6 番

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA19 BA01 BA02 BA22 BA23 BA41 CA18 ZA081 ZA151

ZA331 ZA531 ZA551 ZA681 ZA751 ZA891 ZA941 ZA961 ZB021 ZB071

ZB151 ZB211 ZB261 ZB271 ZC412 ZC751

4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 DA50 DA75 EA22 FA74

专利名称(译)	使用可溶性CTLA4分子治疗风湿性疾病的方法		
公开(公告)号	JP2004517806A	公开(公告)日	2004-06-17
申请号	JP2002507889	申请日	2001-07-02
[标]申请(专利权)人(译)	百时美施贵宝公司		
申请(专利权)人(译)	布里斯托尔 - 迈尔斯宝公司		
[标]发明人	ロバートコーエン スゼットカー デイビッドハガーティ ロバートジェイピーチ ジャンクロードベッカー		
发明人	ロバート・コーエン スゼット・カー デイビッド・ハガーティ ロバート・ジェイ・ピーチ ジャンクロード・ベッカー		
IPC分类号	A61K38/00 A61K38/16 A61K38/17 A61K45/06 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P7/00 A61P7/04 A61P7/06 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/02 A61P21/04 A61P25/04 A61P25 /28 A61P27/02 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/06 A61P43/00 C07K C07K14/705 C07K14/725 C12N15/09 C12P21/02 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 A61K38/13 A61K38/17 A61K38/1793 A61K38/20 A61K45/06 A61P1/04 A61P1/16 A61P17 /00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/04 A61P21/02 A61P21/04 A61P25/04 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 C07K14/70521 C07K2319/00 A61K2300/00		
FI分类号	A61K37/02 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P7/00 A61P7/04 A61P7/06 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/02 A61P21/04 A61P25/04 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 A61P29 /00.101 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/02 A61P43/00.105 A61P43/00.111 A61P43/00.121 C07K14/705.ZNA		
F-TERM分类号	4C084/AA02 4C084/AA19 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/BA41 4C084 /CA18 4C084/ZA081 4C084/ZA151 4C084/ZA331 4C084/ZA531 4C084/ZA551 4C084/ZA681 4C084 /ZA751 4C084/ZA891 4C084/ZA941 4C084/ZA961 4C084/ZB021 4C084/ZB071 4C084/ZB151 4C084 /ZB211 4C084/ZB261 4C084/ZB271 4C084/ZC412 4C084/ZC751 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045 /BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/EA22 4H045/FA74		
优先权	60/215913 2000-07-03 US		
其他公开文献	JP2004517806A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及通过向受试者施用阻断内源性B7分子与其配体结合的可溶性CTLA4分子来治疗风湿性疾病的组合物和方法。

【表 1】

アミノ酸	記号	1文字記号	コドン
アラニン	Ala	A	GCU, GCC, GCA, GCG
システイン	Cys	C	UGU, UGC
アスパラギン酸	Asp	D	GAU, GAC
グルタミン酸	Glu	E	GAA, GAG
フェニルアラニン	Phe	F	UUU, UUC
グリシン	Gly	G	GGU, GGC, GGA, GGG
ヒスチジン	His	H	CAU, CAC
イソロイシン	Ile	I	AUU, AUC, AUA
リジン	Lys	K	AAA, AAG
ロイシン	Leu	L	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG
メチオニン	Met	M	AUG
アスパラギン	Asn	N	AAU, AAC
プロリン	Pro	P	CCU, CCC, CCA, CCG
グルタミン	Gln	Q	CAA, CAG
アルギニン	Arg	R	CGU, CGC, CGA, CCG, AGA, AGG
セリン	Ser	S	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
スレオニン	Thr	T	ACU, ACC, ACA, ACG
バリン	Val	V	GUU, GUC, GUA, GUG
トリプトファン	Trp	W	UGG
チロシン	Tyr	Y	UAU, UAC