



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2537416 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.

A01N 63/00 (2006.01)
A61K 35/14 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
C12N 15/85 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2015.03.16
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.11.12
(86)	Europeisk søknadsnr	12179377.2
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.03.31
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2012.12.26
(30)	Prioritet	2007.03.30, US, 921144 P
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(73)	Innehaver	MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER, 1275 York Avenue, New York, NY 10021, US-USA
(72)	Oppfinner	Sadelain, Michel, 444 Central Park West Apt. 8H, New York, NY 10025, US-USA Stephan, Matthias, 111 Queensberry St. Apt. 14, Boston, MA 02215, US-USA
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Konstitutiv uttrykking av kostimulerende ligander på adoptivt overførte T-lymfocytter
(56)	Anførte publikasjoner	KOWOLIK CLAUDIA M ET AL: "CD28-costimulation provided through a CD19-specific chimeric immunoreceptor enhances in vivo persistence and anti-tumor efficacy of adoptively transferred T cells.", BLOOD, vol. 106, no. 11, Part 1, November 2005 (2005-11), page 372A, XP009130374, & 47TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-SOCIETY-OF-HEMATOLOGY; ATLANTA, GA, USA; DECEMBER 10 -13, 2005 ISSN: 0006-4971 GADE TERENCE P F ET AL: "Targeted elimination of prostate cancer by genetically directed human T lymphocytes", CANCER RESEARCH, vol. 65, no. 19, October 2005 (2005-10), page 9080, XP002571428, ISSN: 0008-5472 MELERO I ET AL: "AMPLIFICATION OF TUMOR IMMUNITY BY GENE TRANSFER OF THE CO-STIMULATORY 4-1BB LIGAND: SYNERGY WITH THE CD28 CO-STIMULATORY PATHWAY", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WILEY - V C H VERLAG GMBH & CO. KGAA, DE, vol. 28, no. 3, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 1116-1121, XP000914703, ISSN: 0014-2980 GROSENBAACH D W ET AL: "A recombinant vector expressing transgenes for four T-cell costimulatory molecules (OX40L, B7-1, ICAM-1, LFA-3) induces sustained CD4+ and CD8+ T-cell activation, protection from apoptosis, and enhanced cytokine production", CELLULAR IMMUNOLOGY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 222, 1 March 2003 (2003-03-01), pages 45-57, XP002995005, ISSN: 0008-8749 BRENTJENS RENIER J ET AL: "Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15", NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 9, no. 3, 1 March 2003 (2003-03-01), pages 279-286, XP002389127, ISSN: 1078-8956 STEPHAN MATTHIAS T ET AL: "T cell-encoded CD80 and 4-1BBL induce auto- and

transcostimulation, resulting in potent tumor rejection", NATURE MEDICINE, vol. 13, no. 12, December 2007 (2007-12), pages 1440-1449, XP002571429, ISSN: 1078-8956

MAUS M V ET AL: "Ex vivo expansion of polyclonal and antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the T-cell receptor, CD28 and 4-1 BB", NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 20, no. 2, 1 February 2002 (2002-02-01), pages 143-148, XP002225278, ISSN: 1087-0156

SADELAIN M ET AL: "TARGETING TUMOURS WITH GENETICALLY ENHANCED T LYMPHOCYTES", NATURE REVIEWS. CANCER, NATUR PUBLISHING GROUP, LONDON, GB, vol. 3, no. 1, 1 January 2003 (2003-01-01) , pages 35-45, XP009026020, ISSN: 1474-175X

ZHONG ET AL: "Integrated CD28 and 4-1BB Signals Strongly Potentiate CD8+ T Cell Mediated radication of Metastatic Prostate Cancer", MOLECULAR THERAPY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 13, 1 January 2006 (2006-01-01), page S103, XP005675376, ISSN: 1525-0016

C. M. KOWOLIK ET AL: "CD28 Costimulation Provided through a CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor Enhances In vivo Persistence and Antitumor Efficacy of Adoptively Transferred T Cells", CANCER RESEARCH, vol. 66, no. 22, 15 November 2006 (2006-11-15), pages 10995-11004, XP055044266, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0160

XIAO-SONG ZHONG ET AL: "Chimeric Antigen Receptors Combining 4-1BB and CD28 Signaling Domains Augment PI3kinase/AKT/Bcl-XL Activation and CD8+ T Cell-mediated Tumor Eradication", MOLECULAR THERAPY, vol. 18, no. 2, 1 February 2010 (2010-02-01), pages 413-420, XP055023623, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2009.210

KONSTITUTIV UTTRYKKING AV KOSTIMULERENDE LIGANDER PÅ ADOPTIVT OVERFØRTE T-LYMFOCYTTER

BAKGRUNNEN FOR OPPFINNELSEN

5

Prostatakreft er den vanligste kreftformen hos menn i USA, der den er årsak til nesten 31 000 dødsfall i året. Hvis den påvises tidlig, kan kreften behandles effektivt med kirurgi eller strålebehandling. Postoperativ restsykdom krever strålebehandling og/eller hormonbehandling, som kan hindre svulstprogresjonen og metastaser. I dag er det ingen kurerende behandling mot hormonresistent metastatisk prostatakreft. Immunterapi er en målrettet behandling som i prinsippet gjør det mulig å behandle slike kreftformer. Det gjenstår forhindringer mot å utvikle immunitet mot svulsten, som forutsetter at antallet cytotoksiske T-lymfocytter økes tilstrekkelig til at de kan formidle svulstavvisningen. Blant mekanismene som begrenser effektiv priming av T-celler og svulstavvisning er det karakteristiske fraværet av kostimulerende ligander ved mange kreftformer.

SAMMENDRAG AV OPPFINNELSEN

20 Oppfinnelsen tilveiebringer generelt immunresponderende celler, blant annet T-celler og naturlige dreperceller (NK), som uttrykker enten den ene eller begge av en antigengjenkjennende reseptor og en kostimulerende ligand, og framgangsmåter for å bruke dem til å behandle neoplasier, smittsomme sykdommer og andre patologier.

25

Ett aspekt av oppfinnelsen er generelt å tilveiebringe en immunresponderende celle som omfatter en reseptor som binder et antigen og en eksogen kostimulerende ligand.

30 Et annet aspekt av oppfinnelsen er å tilveiebringe en virusspesifikk T-celle som uttrykker en vektor (f.eks. en uttrykingsvektor) som koder for et polypeptid valgt blant en eller flere av CD80, 4-1BBL, OX40L, CD70 og CD30L. I én utførelsesform gjenkjenner den virusspesifikke T-cellen et virus som velges blant en eller flere av virusantigenene cytomegalovirus (CMV), Epstein Barr-virus (EBV), human immunsvikt-virus (HIV) og influensavirus.

35

Nok et annet aspekt av oppfinnelsen er å tilveiebringe en svulstantigenspesifikk T-celle som uttrykker en vektor som koder for et polypeptid valgt fra gruppen som består av CD80, 4-1BBL, OX40L, CD70 og CD30L. I én utførelsesform uttrykker cellen CD80 og 4-1BBL. I en annen utførelsesform er vektoren en
 5 retrovirusvektor (f.eks. gammaretrovirus- eller lentivirusvektor), og den kan også være noe annet enn en virusvektor.

Enda et annet aspekt av oppfinnelsen er å tilveiebringe en framgangsmåte for å modulere immunresponsen hos en pasient, som omfatter å gi en effektiv
 10 mengde av en immunresponderende celle ifølge noen av de foregående aspektene. I én utførelsesform øker eller senker framgangsmåten immunresponsen. I en annen utførelsesform øker framgangsmåten selvtoleransen eller øker toleransen for et transplantert organ.

15 Nok et annet aspekt av oppfinnelsen er å tilveiebringe en T-celle som omfatter en reseptor som binder et tumorantigen, og de eksogene kostimulerende ligandene 4-1BBL og CD80 til bruk for å behandle eller forebygge neoplasie hos en pasient. I én utførelsesform velges neoplasien blant en eller flere av
 20 prostatakreft, tykktarmskreft, brystkreft og glioblastom. I en annen utførelsesform er svulstantigenet prostataspesifikt membranantigen, CD19, NY-ESO-1, WT-1, hTERT eller metotelin.

Et annet aspekt av oppfinnelsen er å tilveiebringe en framgangsmåte for å
 25 framtvinge toleranse hos en pasient, som omfatter å gi en effektiv mengde av en immunresponderende celle som omfatter en reseptor som binder et antigen og en vektor som koder for en kostimulerende ligand. I én utførelsesform vil framgangsmåten hindre eller svekke en autoimmunsykdom eller en sykdom som er forbundet med allogen transplantering.

30 Nok et annet aspekt av oppfinnelsen er å tilveiebringe en framgangsmåte for å behandle eller forebygge en patogeninfeksjon hos et individ, som omfatter å gi en effektiv mengde av en immunresponderende celle som omfatter en reseptor som binder et antigen og en vektor som koder for en kostimulerende ligand. I
 35 én utførelsesform er patogenet et virus, en bakterie, en sopp, en protozo eller en parasitt. I en annen utførelsesform velges viruset blant en eller flere av cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr-virus (EBV), human immunsvikt-virus

(HIV) og influensavirus. I nok en annen utførelsesform er cellen en T-celle, en naturlig drepercelle (NK) eller en cytotoksisk T-lymfocyt (CTL).

Enda et annet aspekt av oppfinnelsen er å tilveiebringe framgangsmåter for å
 5 produsere en antigenspesifikk immunresponderende celle som omfatter å innføre
 en nukleinsyresekvens som koder for en kimær antigenreseptor i den
 immunresponderende cellen, idet den kimære antigenreseptoren omfatter et
 antigenbindende domene bundet til et intracellulært signaliseringsdomene som
 aktiverer en immunresponderende celle. I én utførelsesform er den
 10 immunresponderende cellen en T-celle, CTL eller NK-celle. I en annen
 utførelsesform er det antigenbindende domenet et svulstantigenbindende
 domene. I nok en annen utførelsesform er svulstantigenet prostataspesifikt
 membranantigen (PSMA). I nok en annen utførelsesform aktiverer det
 intracellulære signaldomenet en T-celle, CTL-celle eller NK-celle. I nok en annen
 15 utførelsesform er det ζ -kjededomenet som er det intracellulære signaldomenet.

Et annet aspekt av oppfinnelsen er å tilveiebringe en framgangsmåte for å behandle
 en neoplasi hos en pasient med behov for det, som omfatter å gi pasienten en
 terapeutisk effektiv mengde av en T-celle som omfatter et tumorantigen og et
 20 antigenpresenterende kompleks som omfatter minst to kostimulerende ligander, der
 minst en av de to kostimulerende ligandene velges blant en eller flere av
 tumornekrosefaktorligand (TNF-ligand) og en immunoglobulinsuperfamilieligand (Ig)
 og kombinasjoner av disse, og dermed behandle kreften til pasienten.

25 Et annet aspekt av oppfinnelsen er å tilveiebringe en framgangsmåte for å
 behandle en neoplasi hos en pasient, som omfatter å gi pasienten en terapeutisk
 effektiv mengde av en naturlig drepercelle (NK-celle) som omfatter et
 tumorantigen og et antigenpresenterende kompleks som omfatter minst to
 kostimulerende ligander, der minst en av de to kostimulerende ligandene velges
 30 blant en eller flere av tumornekrosefaktorligand (TNF-ligand) og en
 immunoglobulinsuperfamilieligand (Ig) og kombinasjoner av disse, og dermed
 behandle kreften til pasienten. I én utførelsesform velges TNF-liganden blant en
 eller flere av 4-1BBL, OX40L, CD70, CD30L og LIGHT. I en annen utførelsesform
 velges Ig-superfamilieliganden blant CD80 og CD86. I nok en annen
 35 utførelsesform uttrykker cellen minst to kostimulerende ligander, den ene en TNF-
 ligand (f.eks. 4-1BBL) og den andre en Ig-superfamilieligand (f.eks. CD80).

- Et annet aspekt av oppfinnelsen er å tilveiebringe en framgangsmåte for å behandle en infeksjonssykdom hos en pasient med behov for det, som omfatter å gi pasienten en terapeutisk effektiv mengde av en T-celle som omfatter en reseptor spesifikk for et virusantigen og et antigenpresenterende kompleks som
- 5 omfatter minst to kostimulerende ligander, der minst en av de to kostimulerende ligandene velges blant en eller flere av tumornekrosefaktorligand (TNF-ligand) og en immunoglobulinsuperfamilieligand (Ig) og kombinasjoner av disse, og dermed behandle kreften til pasienten.
- 10 Nok et annet aspekt av oppfinnelsen er å tilveiebringe en framgangsmåte for å behandle en infeksjonssykdom hos en pasient, som omfatter å gi pasienten en terapeutisk effektiv mengde av en naturlig drepercelle (NK-celle) som omfatter en reseptor spesifikk for et virusantigen og et antigenpresenterende kompleks som omfatter minst to kostimulerende ligander, der minst en av de to kostimulerende
- 15 ligandene velges blant en eller flere av tumornekrosefaktorligand (TNF-ligand) og en immunoglobulinsuperfamilieligand (Ig) og kombinasjoner av disse, og dermed behandle kreften til pasienten. I én utførelsesform er pasienten en pasient med immunsvikt. I en annen utførelsesform velges TNF-liganden blant en eller flere av 4-1BBL, OX40L, CD70, LIGHT og CD30L. I nok en annen utførelsesform velges Ig-superfamilieliganden blant en eller flere av CD80 og CD86. I nok en annen
- 20 utførelsesform er de minst to kostimulerende ligandene en TNF-ligand og en Ig-superfamilieligand. I en annen utførelsesform er TNF-liganden 4-1BBL mens Ig-superfamilieliganden er CD80. I en annen utførelsesform uttrykkes det antigengjenkjennende komplekset konstitutivt på celleoverflaten. I en annen
- 25 utførelsesform er virusantigenet et antigen som er spesifikt for cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr-virus (EBV), human immunsvikt-virus (HIV) eller influensavirus. I en annen utførelsesform uttrykkes de minst to kostimulerende ligandene konstitutivt på celleoverflaten.
- 30 Et annet aspekt av oppfinnelsen er å tilveiebringe en farmasøytisk sammensetning som omfatter en effektiv mengde av en immunresponderende celle ifølge alle de ovenstående aspektene i et farmasøytisk aksepterbart hjelpestoff.
- Et annet aspekt av oppfinnelsen er å tilveiebringe en farmasøytisk
- 35 sammensetning til bruk ved behandling av en neoplasi som omfatter en effektiv mengde av en svulstantigensspesifikk T-celle som omfatter en reseptor

som binder et svulstantigen, og de kostimulerende ligandene 4-1BBL og CD80 i et farmasøytisk aksepterbart hjelpestoff.

Et annet aspekt av oppfinnelsen er å tilveiebringe en farmasøytisk sammensetning for behandling av en patogeninfeksjon som omfatter en effektiv mengde av en virusspesifikk T-celle ifølge det foregående aspektet i et farmasøytisk aksepterbart hjelpestoff. I én utførelsesform omfatter sammensetningen også et cytokin valgt blant en eller flere av IL-2, IL-3, IL-6, IL-11, IL7, IL12, IL15, IL21, granulocyttkolonistimulerende faktor, alfa-, beta- eller gammainterferon og erytropoetin.

Et annet aspekt av oppfinnelsen er å tilveiebringe et sett som omfatter en immunresponderende celle som omfatter en reseptor som binder et antigen og en eksogen kostimulerende ligand. I én utførelsesform omfatter settet også skriftlige instruksjoner for bruk av denne cellen til å behandle en pasient med neoplasi, en patogeninfeksjon, en autoimmunsykdom eller et allogent transplantat.

I forskjellige utførelsesformer av ethvert av de foregående aspektene omfatter framgangsmåten også trinnet å framstille den immunresponderende cellen eller den kostimulerende liganden. I andre utførelsesformer av de foregående aspektene uttrykkes den kostimulerende liganden konstitutivt eller indukterbart. I ytterligere utførelsesformer av de foregående aspektene uttrykkes den kostimulerende liganden konstitutivt. I forskjellige utførelsesformer av ethvert av de foregående aspektene velges cellen blant en eller flere av en T-celle, en naturlig drepercelle (NK), en cytotoksisk lymfocyt (CTL) og en regulatorisk T-celle. I ytterligere utførelsesformer av de foregående aspektene er antigenet et svulstantigen eller patogenantigen, f.eks. en eller flere av prostataspesifikt membranantigen (PSMA), karsinoembryonisk antigen (CEA), IL13Ralpha, her-2, CD19, NY-ESO-1, HIV-1 Gag, Lewis Y, Mart-1, gp100, tyrosinase, WT-1, hTERT, mesotelin. I ytterligere utførelsesformer av de foregående aspektene uttrykker cellen en rekombinant og/eller en endogen antigenreseptor. I ytterligere utførelsesformer av de foregående aspektene er den kostimulerende liganden en ligand for svulstnekrosefaktor (TNF) (f.eks. 4-1BBL, OX40L, CD70, LIGHT og CD30L) eller en ligand for immunoglobulinsuperfamilien (Ig) (f.eks. CD80 og CD86). I ytterligere utførelsesformer av de foregående aspektene uttrykker den immunresponderende cellen minst én TNF-ligand og minst én Ig-

superfamilieligand. I ytterligere utførelsesformer av de foregående aspektene uttrykker cellen 4-1BBL og CD80. I ytterligere utførelsesformer av de foregående aspektene uttrykkes et antigenpresenterende kompleks og/eller kostimulerende ligander konstitutivt eller indukterbart på overflaten av T-cellen. I ytterligere utførelsesformer av de foregående aspektene uttrykkes den kostimulerende liganden i en retrovirusvektor. I en annen utførelsesform er svulstantigenet prostataspesifikt membranantigen, CD19, NY-ESO-1, WT-1 eller hTERT. I ytterligere utførelsesformer uttrykker cellen en rekombinant og/eller en endogen reseptor for antigenet. I ytterligere utførelsesformer er den kostimulerende liganden en ligand for svulstnekrosefaktor (TNF) eller en ligand for immunoglobulinsuperfamilien (Ig). I ytterligere utførelsesformer er TNF-liganden valgt blant en eller flere av 4-1BBL, OX40L, CD70, LIGHT og CD30L. I forskjellige utførelsesformer er det intracellulære signaldomenet et ζ -kjededomene. I andre utførelsesformer fås det ene kostimulerende signalet gjennom en modifisert antigenreseptor og det andre ved å overuttrykke en kostimulerende ligand. I ytterligere utførelsesformer velges Ig-superfamilieliganden fra gruppen som består av CD80 og CD86.

Definisjoner

«CD80-polypeptid» står for et protein som er minst 85 % identisk med NCBI-referansenr: NP_005182 eller er fragment av dette som fungerer som Ig-superfamilieligand.

«CD80-nukleinsyremolekyl» står for ethvert polynukleotid som koder for et CD80-polypeptid. Et eksempel på et CD80-nukleinsyremolekyl er NM_005191.

«4-1BBL-polypeptid» står for et protein som er minst 85 % identisk med NCBI-referansenr: P41273 eller NP_001552 eller et fragment av dem som fungerer som en ligand for svulstnekrosefaktor (TNF).

«4-1BBL-nukleinsyremolekyl» står for et polynukleotid som koder for et 4-1BBL-polypeptid.

«OX40L-polypeptid» står for et protein som er minst 85 % identisk med NCBI-referansenr: BAB 18304 eller NP_003317 eller et fragment av dem som er en ligand for svulstnekrosefaktor (TNF).

«OX40L-nukleinsyremolekyl» står for et polynukleotid som koder for et OX40L-polyprotein.

5 «CD70-polyprotein» står for et protein som er minst 85 % identisk med NCBI-referansenr: NP_001243 eller et fragment av det som fungerer som en ligand for svulstnekrosefaktor (TNF).

«CD70-nukleinsyremolekyl» står for et polynukleotid som koder for et CD70-polyprotein.

10

«LIGHT-polyprotein» står for et protein som er minst 85 % identisk med NCBI-referansenr: NP_742011 eller et fragment av det som fungerer som en ligand for svulstnekrosefaktor (TNF).

15 «LIGHT-nukleinsyremolekyl» står for et polynukleotid som koder for et LIGHT-polyprotein.

«CD30L-polyprotein» står for et protein som er minst 85 % identisk med NCBI-referansenr: AAB97877 eller et fragment av det som fungerer som en ligand
20 for svulstnekrosefaktor (TNF).

«CD30L-nukleinsyremolekyl» står for et polynukleotid som koder for et CD30L-polyprotein.

25 «CD86-polyprotein» står for et protein som er minst 85 % identisk med NCBI-referansenr: P42081 eller et fragment av det som fungerer som Ig-superfamilieligand.

30 «CD86-nukleinsyremolekyl» står for et polynukleotid som koder for et CD86-polyprotein.

«Pz1-polyprotein» står for et protein som er minst 85 % identisk med proteinet som beskrives av Gong et al., Neoplasia 1:123-7, 1999 eller et fragment av det.

35 «P28z-polyprotein» står for et protein som er minst 85 % identisk med proteinet som beskrives av Maher m.fl. Nature Biotechnology, bd 20, jan 2002,

70–75 eller et fragment av det. Også ζ -kjedesignaldomenet beskrives av Maher et al. *Nature Biotechnology*, bd 20, jan 2002, 70–75.

Nukleinsyremolekyler som kan brukes i framgangsmåtene ifølge oppfinnelsen
 5 inkluderer alle nukleinsyremolekyler som koder for et polypeptid ifølge oppfinnelsen eller et fragment av det. Slike nukleinsyremolekyler trenger ikke å være 100 % identiske med en endogen nukleinsyresekvens, men vil vanligvis ha en betydelig grad av identitet. Polynukleotider som har «betydelig grad av identitet» med en endogen sekvens vil vanligvis kunne hybridiseres med minst
 10 én streng av et tostrengt nukleinsyremolekyl. «Hybridisere» betyr å slå seg sammen til et tostrengt molekyl i komplementære polynukleotidsekvenser (f.eks. et gen som beskrives her) eller deler av dem, under varierende stringens. (Se f.eks. Wahl, G. M. og S. L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399; Kimmel, A. R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507).

15 For eksempel vil stringent saltkonsentrasjon vanligvis være mindre enn rundt 750 mM NaCl og 75 mM trinatriumsitrat, fortrinnsvis mindre enn omtrent 500 mM NaCl og 50 mM trinatriumsitrat og mer foretrukket mindre enn rundt 250 mM NaCl og 25 mM trinatriumsitrat. Hybridisering med lav stringens kan oppnås i fravær av
 20 organisk løsningsmiddel, f.eks. formamid, mens hybridisering med høy stringens kan fås i nærvær av minst rundt 35 % formamid, fortrinnsvis minst rundt 50 % formamid. Stringente temperaturforhold inkluderer vanligvis temperaturer på minst rundt 30 °C, fortrinnsvis minst rundt 37 °C og mer foretrukket minst rundt 42 °C. Å variere andre parametere, for eksempel hybridiseringstid, konsentrasjon
 25 av detergens, f.eks. natriumdodekylsulfat (SDS), og inkludering eller ekskludering av bærer-DNA, er velkjent for fagfolk. Det kan oppnås forskjellig stringensgrad ved å kombinere disse forskjellige forholdene etter behov. I en foretrukket utførelsesform vil hybridiseringen skje ved 30 °C i 750 mM NaCl, 75 mM trinatriumsitrat og 1 % SDS. I en mer foretrukket utførelsesform vil
 30 hybridiseringen skje ved 37 °C i 500 mM NaCl, 50 mM trinatriumsitrat, 1 % SDS, 35 % formamid og 100 µg/ml denaturert DNA fra laksemelke (ssDNA). I en mest foretrukket utførelsesform vil hybridiseringen skje ved 42 °C i 250 mM NaCl, 25 mM trinatriumsitrat, 1 % SDS, 50 % formamid og 200 µg/ml ssDNA. Det vil være lett for fagfolk å tenke seg nyttige variasjoner av disse forholdene.

35 For de fleste bruksområdene vil også vasketrinnene som følger hybridiseringen ha varierende stringens. Vaskestringensforhold kan defineres ved saltkonsentrasjon og

- temperatur. Som ovenfor kan vaskestringensen øke ved å senke saltkonsentrasjonen eller ved å øke temperaturen. For eksempel vil stringent saltkonsentrasjon for vasketrinnene vanligvis være mindre enn rundt 30 mM NaCl og 3 mM trinatiurmsitrat, fortrinnsvis mindre enn omtrent 15 mM NaCl og 1,5 mM trinatiurmsitrat. Stringente temperaturforhold for vasketrinnene vil vanligvis inkludere en temperatur på minst rundt 25 °C, fortrinnsvis minst rundt 42 °C, og mer foretrukket minst rundt 68 °C. I en foretrukket utførelsesform vil vasketrinnene skje ved 25 °C i 30 mM NaCl, 3 mM trinatiurmsitrat og 0,1 % SDS. I en mer foretrukket utførelsesform vil vasketrinnene skje ved 42 °C i 15 mM NaCl, 1,5 mM trinatiurmsitrat og 0,1 % SDS. I en mer foretrukket utførelsesform vil vasketrinnene skje ved 68 °C i 15 mM NaCl, 1,5 mM trinatiurmsitrat og 0,1 % SDS. Det vil være lett for fagfolk å tenke seg andre variasjoner av disse forholdene. Hybridiseringsmetoder er velkjente for fagfolk og beskrives for eksempel i Benton og Davis (Science 196:180, 1977); Grunstein og Hogness (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 72:3961, 1975); Ausubel m.fl. (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York, 2001); Berger og Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, New York) og Sambrook m.fl., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- «Betydelig identitet» betyr at et polypeptid eller en nukleinsyre er minst 50 % identisk med en aminosyresekvens (for eksempel en av aminosyresekvensene som beskrives her) eller nukleinsyresekvens (for eksempel en av nukleinsyresekvensene som beskrives her) som det sammenliknes med. Det foretrekkes at denne sekvensen er minst 60 %, fortrinnsvis 80 eller 85 % og mer foretrukket 90, 95 eller til og med 99 % identisk på aminosyrenivået eller nukleinsyrenivået med sekvensen det sammenliknes med.

- Sekvensidentitet måles gjerne med sekvensanalyseprogrammer (for eksempel Sequence Analysis Software Package fra Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, USA, BLAST, BESTFIT, GAP eller PILEUP/PRETTYBOX). Slike programmer matcher identiske eller liknende sekvenser ved å tilordne homologigrad til forskjellige substitusjoner, delesjoner og/eller andre modifikasjoner. Konservative substitusjoner inkluderer vanligvis substitusjoner innenfor de følgende gruppene: glycin, alanin, valin, isoleucin, leucin; asparaginsyre, glutaminsyre, asparagin, glutamin; serin, treonin; lysin, arginin; og fenylalanin, tyrosin. I et eksempel på en

tilnærming til å bestemme identitetsgraden kan det brukes et BLAST-program, der sannsynlighetspoeng mellom e-3 og e-100 tyder på en nær beslektet sekvens.

«Analog» betyr et strukturelt beslektet polypeptid- eller nukleinsyremolekyl som
5 har samme funksjon som et polypeptid- eller nukleinsyremolekyl det henvises til.

Betegnelsen «ligand» står her for et molekyl som bindes til en reseptor. Nærmere bestemt bindes liganden til en reseptor på en annen celle slik at en celle kan gjenkjenne en annen.

10

Betegnelsen «konstitutiv uttrykking» står her for uttrykking under alle fysiologiske forhold.

15

Betegnelsen «kimær antigenreseptor» (CAR) står her for et svulstantigenbindende domene fusjonert med et intracellulært signaldomene som kan aktivere T-celler. Vanligvis stammer det ekstracellulære bindingsdomenet til CAR fra et murint eller humanisert monoklonalt antistoff.

20

«Sykdom» betyr enhver lidelse som skader eller forstyrrer den normale funksjonen til en celle, et vev eller et organ. Eksempler på sykdommer er neoplasie og patogeninfeksjon av en celle.

25

«Effektiv mengde» betyr en mengde som er tilstrekkelig til å stoppe, lindre eller hemme fortsatt proliferering, vekst eller metastaser (f.eks. invasjon eller migrasjon) av en neoplasie.

Å «framtvinge toleranse» betyr å hindre aktiviteten til selvreaktive celler eller immunresponderende celler som er rettet mot transplanterte organer eller vev.

30

«Eksogen» betyr et nukleinsyremolekyl eller polypeptid som ikke er endogent til stede i cellen eller ikke finnes i en konsentrasjon som er tilstrekkelig for å oppnå den funksjonelle virkningen som fås når det er overuttrykt. Betegnelsen «eksogen» vil derfor inkludere alle rekombinante nukleinsyremolekyler eller polypeptider som uttrykkes i en celle, for eksempel fremmede, heterologe og
35 overuttrykte nukleinsyremolekyler og polypeptider.

Et «heterologt nukleinsyremolekyl eller polypeptid» står for en nukleinsyremolekyl (f.eks. et cDNA-, DNA- eller RNA-molekyl) eller polypeptid som ikke normalt er til stede i en celle eller i en prøve tatt fra en celle. Denne nukleinsyren kan være fra en annen organisme eller for eksempel et mRNA-molekyl som ikke normalt uttrykkes i en celle eller en prøve.

«Immunresponderende celle» betyr en celle som fungerer i en immunrespons eller en forløper eller avkom fra den.

10 «Isolert celle» betyr en celle som er skilt ut fra molekylet og/eller cellekomponenter som naturlig følger med cellen.

Betegnelsen «svulstantigenbindende domene» står her for et domene som kan binde spesifikt en bestemt antigendeterminant eller et sett av
15 antigendeterminanter som finnes i en svulst.

Betegnelsen «frambringe» som i «frambringe midlet» er ment å inkludere kjøp, syntese eller andre måter å anskaffe midlet på (eller andre nevnte stoffer eller materialer).

20

«Modulere» betyr å endre positivt eller negativt. Eksempler på modulasjoner er endringer på 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 % eller 100 %.

«Neoplasi» står for en sykdom som er karakterisert ved at en celle eller et vev
25 prolifererer patologisk og så migrerer til eller invaderer andre vev eller organer. Neoplasiveksten er vanligvis ukontrollert og progressiv og foregår under forhold som ikke ville utløse eller ville stoppe formeringen av normale celler. Neoplasier kan ramme mange forskjellige celletyper, vev eller organer, inkludert, men ikke innskrenket til et organ valgt fra gruppen som består av urinblære, skjelett,
30 hjerne, bryst, brusk, glia, spiserør, eggleder, galleblære, hjerte, tarm, nyre, lever, lunge, lymfeknute, nervevev, eggstokker, bukspyttkjertel, prostata, skjelettmuskel, hud, ryggmarg, milt, magesekk, testikler, brissel, skjoldkjertel, luftrør, urogenitalsystem, urinleder, urinrør, livmor og skjede, eller et vev eller en celletype fra disse. Neoplasier inkluderer kreft, for eksempel sarkom,
35 karsinom eller plasmacytom (ondartet svulst av plasmaceller). Illustrerende neoplasier som oppfinnelsen kan brukes til inkluderer, men er ikke innskrenket til, leukemi (f.eks. akutt leukemi, akutt lymfocytisk leukemi, akutt myelocytisk

leukemi, akutt myeloblastisk leukemi, akutt promyelocytisk leukemi, akutt myelomonocytisk leukemi, akutt monocytisk leukemi, akutt erytroleukemi, kronisk leukemi, kronisk myelocytisk leukemi, kronisk lymfocytisk), polycythemia vera, lymfom (Hodgkins sykdom, ikke-Hodgkins sykdom),

5 Waldenströms makroglobulinemi, tungkjedesykdom, og faste svulster som sarkomer og karsinomer (f.eks. fibrosarkom, myksosarkom, liposarkom, kondrosarkom, osteogent sarkom, kordom, angiosarkom, endoteliosarkom, lymfangiosarkom, lymfangioendoteliosarkom, synoviom, mesoteliom, Ewings svulst, leiomyosarkom, rbdomyosarkom, tykktarmskreft, bukspyttkjertelkreft,

10 brystkreft, eggstokkreft, prostatakreft, skvamøscellekreft, basalcellekreft, adenokarsinom, svettekjertelkarsinom, talgkjertelkarsinom, papillærkarsinom, papillæradenokarsinom, cystadenokarsinom, medullærkarsinom, bronkogen karsinom, nyrecellekarsinom, hepatom, gallegangkarsinom, korikarsinom, seminom, fosterkarsinom, Wilms svulst, livmorhalskreft, livmorkreft,

15 testikkelkreft, lungekarsinom, småcellet lungekarsinom, blærekreft, epitelkreft, gliom, astrocytom, medulloblastom, kraniofaryngiom, ependymom, pinealom, hemangioblastom, akustisk nevrom, oligodendrogliom, schwannom, meningiom, melanom, nevroblastom og retinoblastom). I én utførelsesform identifiserer utsilingsmetodene ifølge oppfinnelsen sammensetninger som kan brukes til å

20 behandle bryst- eller lungekreft.

«Reseptor» betyr et polypeptid eller en del av et polypeptid som finnes på en cellemembran og binder en eller flere ligander selektivt.

25 «Gjenkjenne» betyr å binde et mål selektivt. En T-celle som gjenkjenner et virus uttrykker vanligvis en reseptor som binder et antigen som viruset uttrykker.

«Patogen» betyr et virus, en bakterie, en sopp, en parasitt eller en protozo som kan forårsake sykdom.

30

Eksempler på virus inkluderer, men er ikke innskrenket til, *retroviridae* (f.eks. humane immunsviktivirus, som HIV-1 (også kalt HDTV-III, LAVE eller HTLV-III/LAV, eller HIV-III; og andre isolater, som HIV-LP); *Picornaviridae* (f.eks. poliovirus, hepatitt A-virus; enterovirus, humane Cocksackie-virus, rhinovirus,

35 ECHO-virus); *calciviridae* (f.eks. stammer som forårsaker gastroenteritt); *togaviridae* (f.eks. hesteencefalittvirus, rubellavirus); *flaviridae* (f.eks. denguevirus, encefalittvirus, gulfebervirus); *coronaviridae* (f.eks. koronavirus);

rhabdoviridae (f.eks. vesikulær stomatittvirus, rabiesvirus); *filoviridae* (f.eks. ebolavirus); *paramyxoviridae* (f.eks. parainfluenzavirus, kusmavirus, meslingvirus, respiratorisk syncytialvirus); *orthomyxoviridae* (f.eks. influensavirus); *bungaviridae* (f.eks. Hantaan-virus, bungavirus, flebovirus og Nairo-virus); *arenaviridae* (hemoragisk febervirus); *reoviridae* (f.eks. reovirus, orbivirus og rotavirus); *Birnaviridae*; *Hepadnaviridae* (hepatitt B-virus); *Parvovirida* (parvovirus); *Papovaviridae* (papillomvirus, polyomvirus); *Adenoviridae* (de fleste adenovirus); *Herpesviridae* (herpes simplex-virus (HSV) 1 og 2, varicella zoster-virus, cytomegalovirus (CMV), herpesvirus); *Poxviridae* (variolavirus, vacciniavirus, koppevirus) og *Iridoviridae* (f.eks. afrikansk svinepestvirus) og uklassifiserte virus (f.eks. smittestoffet for deltahepatitt (antas å være en defekt satellitt av hepatitt B-virus), smittestoffene for ikke-A, ikke B-hepatitt (klasse 1 = intern smitte, klasse 2 = parenteral smitte (dvs. hepatitt C); Norwalk og beslektede virus, og astrovirus).

15

Eksempler på bakterier inkluderer, men er ikke innskrenket til, *Pasteurella*, *Staphylococci*, *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*-arter, og *Salmonella*-arter. Spesifikke eksempler på smittsomme bakterier inkluderer, men er ikke innskrenket til, *Helicobacter pylori*, *Borelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria*-arter (f.eks. *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansaii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (gruppe A-Streptococcus), *Streptococcus agalactiae* (gruppe B-Streptococcus), *Streptococcus* (viridans-gruppen), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (anaerobe arter), *Streptococcus pneumoniae*, patogene *Campylobacter*-arter, *Enterococcus*-arter, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium*-arter, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides*-arter, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus* *moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia*, og *Actinomyces israeli*.

«Binder spesifikt» betyr at et polypeptid eller et fragment av et polypeptid gjenkjenner og binder et polypeptid av interesse men ikke i betydelig grad gjenkjenner og binder andre molekyler i en prøve, for eksempel en biologisk prøve, og dette inkluderer naturligvis et polypeptid ifølge oppfinnelsen.

35

Betegnelsen «svulstantigen» står her for ethvert polypeptid som uttrykkes av en svulst og kan utløse en immunrespons.

5 «Virusantigen» betyr et polypeptid som uttrykkes av et virus og kan utløse en immunrespons.

Det er meningen at ordet «omfatter» skal ha den vide betydningen som tilskrives «comprises», «comprising» i amerikansk patentlovgivning, og at de kan bety «inkluderer» eller liknende.

10

«Behandling» står her for klinisk intervensjon i et forsøk på å forandre sykdomsforløpet til individet eller cellen som behandles, og kan utføres enten for å forebygge eller i løpet av en klinisk patologi. Terapeutisk virkning av behandlingen inkluderer, uten innskrenking, å hindre at det oppstår eller
 15 gjenoppstår sykdom, lindre symptomer, minske eventuelle direkte eller indirekte patologiske følger av sykdommen, hindre metastaser, sinke sykdomsprogresjonen, lindre eller pleie sykdomsstadiet, og remisjon eller forbedret prognose. Ved å hindre progresjonen av en sykdom kan en behandling hindre nedbryting på grunn av en sykdom hos et rammet eller diagnostisert
 20 individ eller et individ som mistenkes for å ha sykdommen, men en behandling kan også hindre utbrudd av sykdommen eller et symptom på sykdommen hos et individ med risiko for sykdommen eller mistanke om sykdommen.

Betegnelsen «individ» står her for et virveldyr, fortrinnsvis et pattedyr, mer
 25 foretrukket et menneske.

Betegnelsen «immunkompromittert» brukes her om et individ som har immunsvikt. Individet er svært sårbart for opportunistiske infeksjoner, infeksjoner som skyldes organismer som ikke framkaller sykdom til vanlig hos
 30 personer med friskt immunsystem, men kan ramme folk med immunsystem som fungerer dårlig eller er undertrykt.

Nedenfor beskrives andre aspekter av oppfinnelsen som er innenfor gyldighetsområdet for oppfinnelsen.

35

KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE

Den detaljerte beskrivelsen nedenfor er i form av eksempler som ikke er ment å skulle innskrenke oppfinnelsen til de spesifikke beskrevne utførelsesformene, og den kan forstås i sammenheng med illustrasjonene som følger med.

- 5 Figur 1a–1f viser at samtidig uttrykking av CD80 og 4-1BBL i menneskelige T-celler utløser robust proliferative respons etter sykliske stimuleringer gjennom den endogene T-cellereseptoren deres eller gjennom en kimær antigenreseptor uten kostimulering fra antigenpresenterende celler (APC). $0,4 \times 10^6$ rensede humane T-lymfocytter ble aktivert med antistoff mot CD3 (OKT3) og kvantifiserte
- 10 ekspansjonen av T-lymfocytter som var omformet retroviralt enten med CD80, 4-1BBL, begge to samtidig eller en kontrollvektor (figur 1a,b). Omformingseffektiviteten ble evaluert ved FACS-analyse 48 timer etter genoverføringen (figur 1a). Figur 1b er en graf av absoluttellingen av CD8⁺ T-celler omformet med den angitte kostimulerende liganden og stimulert ukentlig
- 15 med 10 µg/ml blodplatebundet OKT3. Undersøkelsen ble videreført til cytomegaloviruspesifikke (CMV) minnedonor-T-celler (figur 1c,d) og genetisk omdirigerte autologe T-celler (figur 1e,f), CMV-pp65-spesifikke T-lymfocytter, kortvarig ekspandert på HLA-A*0201⁺pp65⁺ kunstige APC og omformet med CD80, 4-1BBL, eller begge samtidig (figur 1c). Figur 1d viser absolutte tellinger av
- 20 CD8⁺pp65⁺-T-celler anrikt og omformet som beskrevet i c etter ukentlig omstimulering med HLA-A*0201⁺ pp65-presenterende Caco-2-svulstceller. For å danne prostatakreftreaktive menneskelige T-lymfocytter (figur 1e,f) raskt, ble T-celler fra perifert blod retrovirusomformet med den kimære antigenreseptoren Pz1 (Gade m.fl., Cancer Res. 65:9080-9088, 2005), en ikke-HLA-begrenset
- 25 antigenreseptor som er spesifikk for svulstantigenet PSMA. Pz1-reseptoren omfatter et PSMA-bindende enkjedet antistoffragment som er fusjonert med det humane CD3 ζ-signaldomenet. På figur 1e ble primære menneskelige CD3⁺ T-lymfocytter retrovirusomformet med Pz1 alene eller i kombinasjon med CD80 og 4-1BBL. Omformingseffektiviteten ble vurdert ved FACS-analyse. T-
- 30 celleekspansjonen av Pz1-omformede menneskelige T-lymfocytter dyrket ukentlig sammen med LNCaP-svulstenkeltlag er framstilt på figur 1f. Kostimulerende ligander ble uttrykt på T-cellen (øverst) eller svulstcellen (nederst). De enkelte aktiveringsforholdene er avbildet i tegninger i diagrammene til høyre i b, d og f. Dataene representerer tre uavhengige forsøk. Hvert punkt i b, d og f representerer
- 35 gjennomsnittet ± standardfeil for tre tilfeldige valgte brønner. * betyr $<10^4$ celler.

Figur 2a–2c viser hvordan etablerte prostatakarsinomsvulster med prostataspesifikt membranantigen (PSMA) hos Scid/beige-mus uttryddes av Pz1⁺ T-celler omformet med CD80 og 4-1BBL. Figur 2a viser bioluminescensbilder og tilhørende koronale MRI-bilder av ildflueluciferase⁺PC3-PSMA-svulster hos Scid/beige-mus fire uker etter systemisk inkulering med 4×10^6 svulstceller (dag 0 av T-cellebehandlingen), og atten dager etter adoptiv overføring av 4×10^6 CD8⁺Pz1⁺ eller Pz1⁺CD80⁺4-1BBL⁺ T-lymfocytter. Samme antall T-celler med den humane CD19-målrettede kimære antigenreseptoren 19z ble injisert i kontrollgruppen. Figuren viser bilder med falske farger som er lagt over konvensjonelle fotografier. Figuren viser de samme dyrene som ble fotografert med bioluminescensfotografering og MRI før og etter behandlingen. De to musene representerer et totalantall på $n = 10$. Figur 2b viser tre grafer. Bioluminescenssignaler fra svulster kvantifisert per dyr annenhver dag gjennom 28 dager. Bilder med mettede piksler ble ikke brukt til fotokvantifisering selv om de er tatt med i figuren for å kunne sammenlikne direkte visuelt mellom gruppene. I stedet ble de tatt om igjen med kortere eksponeringstid. Grafene viser fotoner/sekund/cm²/overflateradius (sr) mot dager etter T-celleinjeksjonen. Hver linje svarer til ett dyr og hver prikk representerer det gjennomsnittlige fototallet for rygg- og magebildene for hvert dyr ved ethvert gitt tidspunkt. Overlevelsen er illustrert med Kaplan-Meier-kurven på figur 2c.

Figur 3a–3d viser robust proliferering av CD80⁺4-1BBL⁺-T-lymfocytter *in vivo* som likevel er avhengig av svulstantigener. Figur 3a viser sammenliknende bioluminescensbilder *in vivo* av adoptivt overførte T-celler hos Scid/beige-mus med PC3-PSMA-svulster på dag 0, 8 og 18 etter injeksjon av 4×10^6 CD8⁺ smellerluciferase(click-luc)-uttrykkende Pz1-omformede eller Pz1⁺CD80⁺4-1BBL⁺-omformede T-lymfocytter. Som kontroll av antigenspesifisitet ble det infusert like mange 19z⁺CD80⁺4-1BBL⁺-T-celler. T-cellebehandlingen begynte som på figur 2 fire uker etter den systemiske injeksjonen av 4×10^6 PC3-PSMA-svulstceller. De fem musene per gruppe som er framstilt i hvert diagram, representerer et totalantall på $n = 8$ /gruppe. Bilder med mettede piksler ble ikke brukt til fotokvantifisering selv om de er tatt med i figuren for direkte visuell sammenlikning. I stedet ble de tatt om igjen med kortere eksponeringstid. Figur 3b viser tre grafer. Det ble samlet signalintensiteter for smellerluciferase fra sekvensiell bioluminescensfotografering annenhver dag etter T-celleoverføringen gjennom en seksten dagers tidsperiode. Hver linje svarer til ett dyr og hver prikk representerer det gjennomsnittlige fototallet på rygg- og magebildene for hvert

av dyrene ved ethvert gitt tidspunkt. Figur 3c viser en flerfarget FACS-analyse av en suspensjon av enkeltlungeceller framstilt av et representativt dyr infusert enten med $Pz1^{+/-}$ eller $Pz1^{+}CD80^{+}4-1BBL^{+}$ -T-lymfocytter, 6 dager etter T-celleoverføringen. Cellene ble farget med idiotypisk antiserum spesifikt for den kimære antigenreseptoren Pz1. Figur 3d viser absolutte pulmonære $Pz1^{+}$ -T-celletall (totalt celletall for levedyktige trypanblått-negative celler x prosentandelen av $Pz1^{+}$ -T-cellene). Søylediagrammene representerer gjennomsnitt $\pm$ standardfeil for tre mus. Figur 4a-4f viser kostimulering av T-celler i cis som følge av samlokalisering av CD80, 4-1BBL og reseptorene deres, CD28 og 4-1BB, i den immunologiske synapsen etter sammenklumping av indukert T-celle/svulstcelle. På figur 4a-d ble humane T-lymfocytter fra perifert blod omformet med Pz1 og omstimulert med LNCaP-CD80-celler før en andre genoverføring med den bicistroniske vektoren som koder for deRed-monomer-4-1BBL-fusjonsprotein og CD80. Etter negativ magnetisk $CD8^{+}$ -isolering ble T-cellene merket med FITC-koleratoksin B (CTB) og inkubert med umodifiserte LNCaP-svulstceller eller alene. Fikserte konjugater ble permeabilisert, farget med de angitte antiserumene og visualisert ved konfokal mikroskopi. Det ble tilfeldig valgt celleklumper av T-celle/LNCaP-celler fra tre uavhengige forsøk. Skalasøyler, 10 μ m. Antall klumper med klare konsentrasjoner av de angitte kostimuleringsligandene eller reseptorene ved T-celle/APC-overgangen gjennom hele antallet av analyserte klumper er framstilt på diagrammene nederst til høyre på figur 4a og b. Figur 4a er et sett på ti konfokale mikrogram som viser eksempler på polarisering av 4-1BBL – uttrykt som et ds-Red-fusjonsprotein i kombinasjon med CD80 på $CD8^{+}$ -Pz1-omformede T-celler – inn i den immunologiske synapsen. T-celle/LnCaP-svulstklumper ble inkubert i 50 minutter før fiksering, permeabilisering og inkubering med antiserum mot 4-1BB. På figur 4b ble fikserte T-celle/svulstcelleklumper inkubert med antiserum mot CD80 og CD28. Igjen visualiseres samlokaliseringen av CD80 og reseptoren CD28 i den immunologiske synapsen etter møtet med svulstantigenet. Figur 4c illustrerer den forbedrede opphopingen av granzym-B i den immunologiske synapsen. Denne opphopingen er avhengig av at 4-1BB kobles funksjonelt til liganden sin, 4-1BBL, som uttrykkes på overflaten av samme T-celle. Primære humane T-lymfocytter ble modifisert genetisk som på figur 4a, 4b. Som vist på figuren uttrykker retrovirusvektorer som koder for Pz1 også kontroll-shRNA eller 4-1BB-spesifikk shRNA under kontroll av U6-promotoren i 3'LTR som beskrevet nedenfor. Cellekonjugatene i øverste ($Pz1^{+}$ -kontroll-shRNA) og midterste (og $Pz1^{+}CD80^{+}$ -dsred-4-1BBL⁺-kontroll-shRNA) rekke representerer $CD80^{+}$ -dsred-4-

1BBL – henholdsvis uomformede og omformede T-lymfocytter, dyrket i samme brønn og konfigurert til LnCaP på samme objektglass. Figur 4d viser relativ rekrutteringsindeks (RRI) og relativ intensitet, beregnet som beskrevet nedenfor, for granzym B-Alexa 647 ved interfasen mellom T-celle og antigenpresenterende celle. Datapunktene i hver gruppe viser den beregnede verdien av 35 analyserte konjugater (symboler) og gjennomsnittet (-) av tre uavhengige forsøk. *P = 0,0001; **P < 0,0001. Figur 4e,f viser NF-κB-luciferaseanalyser i isolerte enkelt-T-cellekloner. Disse resultatene bekrefter egenkostimulering som en virksom mekanisme for å levere kostimuleringssignaler. En CD3⁺CD28⁺-4-1BB-Jurkat-T-celleklon stabilt transfektert med en NF-κB-luciferaserapportør ble retrovirusomformet med en tricistronisk vektor som samtidig uttrykte 4-1BB, 4-1BBL og CD80 eller en kontrollvektor. For å hindre tilskuerkostimulering ble omformede T-lymfocytter underklont til OKT-3-belagte 96-brønners plater før den første detekterbare uttrykkingen av proteinene det kodes for. Tolv timer etter aktiveringen ble nærvær av enkelte T-celler i brønnene bekreftet mikroskopisk, og bioluminescenssignalet ble målt på enkeltcellenivået. Figur 4e viser 36 bioluminescensbilder av omformede enkelte T-celler sammensatt ved hjelp av Adobe Illustrator. De respektive bioluminescenssignalene fra enkeltceller ble kvantifisert, normalisert til bakgrunnsbioluminescens og plottet på figur 4f.

Figur 5a–5e viser at T-lymfocytter som viser CD80 og 4-1BBL transkostimulerer umodifiserte antigenspesifikke tilskuer-T-celler ved fysisk kontakt. Figur 5a viser et sett på 4 konfokale mikrogram av en Pz1⁺-T celle som kobler seg til en LNCaP-svulstcelle mens den er i fysisk T-celle/T-celle-kontakt med en Pz1⁺-tilskuer-T-lymfocytt omformet med CD80 og dsRed-4-1BBL. Celleklumpene ble induktert og analysert som beskrevet under figur 4a,b. Skalasøyler, 10 μm. På figur 5b–d ble perifere T-lymfocytter fra en cytomegalovirus(CMV)-seropositiv HLA A2.1⁺-donor omformet med Pz1 eller samtidig med Pz1, CD80 og 4-1BBL. Parallelt ble CMV-spesifikke genetisk umodifiserte cytotoksiske T-lymfocytter (CTL) fra den samme donoren anriket med en samkultur av kunstige antigenpresenterende celler (AAPC) som beskrevet nedenfor. Disse cellene ble merket med karboksylfluoresceinsuksinimidylester (CFSE). Mikrokulesorterte Pz1⁺ (figur 5b)- eller Pz1⁺CD80⁺4-1BBL⁺(figur 5c)-T-lymfocytter ble blandet til CMV-reaktive pp65⁺ CTL i forholdet 1:1 og eksponert for bestrålte Caco-2-svulstceller retrovirusomformet for å vise pp65 på overflaten både på en HLA A2.1-avhengig måte og PSMA på en HLA-uavhengig måte. Alternativt ble Pz1⁺CD80⁺4-1BBL⁺-T-

cellene skilt fra pp65⁺T-cellene med en Transwell-membran, mens begge koblet seg til Caco-2-svulster (figur 5d). De enkelte samkulturforholdene er framstilt i tegninger til venstre på figuren. To dager etter svulstantigenkontakten ble intracellulære granzym B-konsentrasjoner som var sortert på CD8⁺-T-celler målt ved FACS-analyse (midterste kolonne). Gjennomsnittlige fluorescensintensiteter (MFI) for granzym B-antigenpresenterende celler (APC) fra T-celleunderpopulasjonene CFSE-(Pz1⁺) og CFSE⁺ (pp65⁺) er oppsummert øverst på hver profil. På dag 7 ble CFSE-fortynningene Pz1⁺ sammenliknet med pp65⁺-T-cellefraksjoner analysert med flowcytometri etter farging med pp65-tetramer og CD8 (høyre kolonne). CFSE-MFI-verdiene øverst i hver profil bygger på pp65⁺-populasjoner etter CD8⁺-sortering. Totale celleantall for CD8⁺ pp65⁺-T-celler etter 7-dagerskulturene er framstilt grafisk på (figur 5e). Hver av søylegrafene representerer gjennomsnitt ± standardfeil for tre tilfeldig valgte brønner. Dataene representerer to uavhengige forsøk. Det ble ikke tilsatt eksogene cytokiner på noe tidspunkt av samkulturen.

Figur 6a og 6b viser at opphopingen av adoptivt overførte PSMA-omdirigerte T-lymfocytter i svulstseter øker med Pz1⁺CD80⁺4-1BBL⁺-T-celler, men ikke med 19z⁺CD80⁺4-1BBL⁺-T-celler hos Scid/beige-mus. Figur 6a viser dobbelte bioluminescensbilder in vivo av ekstern Gaussia-luciferase (x-gaus-luc) i RM1.PGLS- og Raji-svulster i tillegg til smellerluciferase (Click-luc) i svulstspesifikke T-celler. To uker etter den systemiske injeksjonen av 1 x 10⁶ CD19⁺x-gaus-luc⁺-Raji-svulster og to dager etter den påfølgende infusjonen med 5 x 10⁵ PSMA⁺x-gaus-luc⁺RM1.PGLS-svulstceller mot de samme dyrene ble etablerte svulster i beinmargen (Raji) og lungene (RM1) behandlet med en kombinasjon av tre cellepopulasjoner av T-celler omformet slik det går fram av betegnelsene. Hvert dyr fikk totalt 12 x 10⁶ CD8⁺kimær antigenreseptor⁺-T-celler (4 x 10⁶ T-celler/omformingsforhold). Det kan bemerkes at T-cellepopulasjonen som er oppført som nr. tre (Pz1⁺, Pz1⁺CD80⁺4-1BBL⁺, 19z⁺CD80⁺4-1BBL⁺, henholdsvis venstre, midtre og høyre rad) ble injisert tolv timer etter den kombinerte injeksjonen av T-celler som er oppført som nr. én og to, for å unngå interaksjon mellom T-cellene i lungene på grunn av overpopulasjon og ikke på grunn av selektiv svulstantigenbinding. X-gaus-luc⁺-svulstceller og click-luc⁺-T-celler ble registrert ved bioluminescensfotografi på de angitte tidspunktene. På dag 0 og dag 4 sikret en tidsperiode på minst 4 timer mellom svulst- og T-cellefotografering at bioluminescenssignalet vendte tilbake til bakgrunnsnivået. Det ble fotografert totalt n = 5 Scid/beige-mus i hver behandlingsgruppe. Figur 5b

viser en serie på 6 grafer som framstiller signalintensiteten til smellerluciferase fra sekvensiell bioluminescensfotografering hver dag etter T-celleoverføring gjennom en fire dagers periode. Hver linje representerer ett dyr og hver prikk viser gjennomsnittlig fotontelling målt henholdsvis i lungeområdet (øverst) og begge

5 lårbeina (nederst) på ethvert gitt tidspunkt.

Figur 7 viser at dobbelt T-celleuttrykt CD80 og 4-1BBL utløser overlegen T-celleekspansjon sammenliknet med signalelementene CD28 og/eller 4-1BB fusjonert i serie med ζ -signaldomenet til den kimære Pz1-antigenreseptoren.

10 Primære T celler ble omformet med Pz1, P28z (Maher m.fl. *Nature Biotechnology*, bd 20, jan 2002, 70–75), som inneholder CD28-signaldomenet i serie med ζ -kjeden, eller P284-1BBz, som inkluderer begge signalregionene CD28 og 4-1BB. Alternativt ble T-lymfocytene omformet med både P28z og 4-1BBL (merket P28Z og 4-1BBL). Pz1 + CD80 + 4-1BBL står for Pz1+ T-celler

15 som uttrykker begge ligandene, CD80 og 4-1BBL. Omformede T-celler ble stimulert ukentlig (vist med piler) på LNCaP-svulstenkeltlag under forhold som skisseres i detalj under figur 1. Antall ganger ekspansjon av den CD8⁺-Pz1-omformede humane T-lymfocyttopulasjonen er framstilt grafisk.

20 Figur 8 viser aminosyresekvenser for CD80, 4-1BBL, OX40L, CD70, LIGHT og CD30L.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

25 Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer generelt celler, blant annet genetisk modifiserte immunresponderende celler (f.eks. T-celler, naturlige dreperceller (NK), cytotoksiske T-lymfocytter (CTL-celler)) som uttrykker minst én av en antigengjenkjennende reseptor og en kostimulerende ligand, og framgangsmåter for å bruke dem til å behandle neoplasier og andre patologier der man ønsker

30 økt antigenspesifikk immunrespons. Oppfinnelsen bygger i det minste delvis på oppdagelsen av at den konstitutive retrovirusuttrykkingen av CD80 og 4-1BBL i dobbeltomformede humane T-celler rettet mot prostataspesifikt membranantigen ga opphav til en robust svulstantigenavhengig T-celleproliferering og samtidig dyp avvisning av spredde veietablerte prostatakarsinomsvulster. Dessuten

35 stimulerte T-celler som uttrykte CD80 og 4-1BBL også tilskuer-T-celler i trans på en kontaktavhengig og antigenspesifikk måte i svulstsetet. Konseptet med genetisk modifiserte T-celler som konstitutivt forråd av kostimulerende ligander

som kostimulerer seg selv optimalt i tillegg til at de er mer immunogene i mikromiljøet til svulsten, representerer til sammen et vesentlig framskritt i forhold til konvensjonell adoptiv T-cellebehandling. Dessuten, som det er påvist *ex vivo* med anrikede CMV-spesifikke T-lymfocytter, er ikke denne tilnærmingen

5 innskrenket til behandling av neoplasier, men er også åpen for et bredt utvalg av bruksområder der man ønsker å øke en antigenspesifikk immunrespons, og slike bruksområder inkluderer ikke bare behandling av neoplasier, men også å øke immunresponsen mot en patogeninfeksjon eller en smittsom sykdom og å forsterke immuntoleransen til regulatoriske T-celler i sammenheng med

10 autoimmunitet eller allogene transplantasjoner.

Hematopoetiske cellestammer

Hematopoetiske celler (blodceller) fra pattedyr står for et bredt utvalg av fysiologiske aktiviteter. Hematopoetiske celler fordeler seg på lymfoide, myeloide og

15 erytroide stammer. Den lymfoide stammen, som omfatter B-celler, T-celler og naturlige dreperceller (NK-celler), sørger for å produsere antistoffer, regulere det cellulære immunsystemet, registrere fremmedelementer i blodet, registrere celler som er fremmede for verten og liknende oppgaver. Betegnelsen «T-celler» står her for lymfocytter som modner i brisselen og er hovedansvarlig for den cellebaserte

20 immuniteten. T-cellene er involvert i det adaptive immunsystemet. Betegnelsen «naturlige dreperceller (NK-celler)» står her for lymfocytter som er en del av den celleformidlete immuniteten og opererer i den medfødte immunresponsen. De trenger ikke å aktiveres før de kan utøve den cytotoksiske virkningen sin på målcellene. Cytotoksiske T-celler (CTL eller dreper-T-celler) er en undergruppe av T-

25 lymfocytter som kan utløse død hos infiserte somatiske celler eller kreftceller.

Celler til bruk i framgangsmåtene

Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer celler som uttrykker minst én av en antigengjenkjennende reseptor og en kostimulerende ligand og framgangsmåter for

30 å bruke disse cellene til å behandle en sykdom som krever økt immunrespons. I én tilnærming brukes svulstantigenspesifikke T-celler, NK-celler, CTL-celler eller andre immunresponderende celle som skytler for selektiv anriking av en eller flere kostimulerende ligander for å behandle eller forebygge neoplasie. For eksempel blir de kostimulerende ligandene 4-1BBL og CD80 konstitutivt uttrykt sammen i en T-

35 celle som uttrykker en kimær antigenreseptor PZ1 som gjenkjenner og binder prostataspesifikt membranantigen (PSMA). Slike celler gis til en menneskelig pasient med behov for det, for å behandle eller forebygge prostatakreft. I en annen

tilnærming kan virusantigenspesifikke T-celler, NK-celler eller CTL-celler brukes til å behandle virussykdommer. Som behandling mot cytomegalovirus (CMV) uttrykkes for eksempel CD80 og 4-1BBL i CMV-spesifikke cytotoksiske T-lymfocytter.

5 Svulstantigenspesifikke T-lymfocytter (og NK-celler)

10 Typer av svulstantigenspesifikke humane lymfocytter som kan brukes i framgangsmåtene er, uten innskrenkinger, perifere donorlymfocytter som er genetisk modifisert for å uttrykke kimære antigenreseptorer (CAR) (Sadelain, M., m.fl. 2003 *Nat Rev Cancer* 3:35–45), perifere donorlymfocytter som er genetisk
15 modifisert for å uttrykke et svulstantigenspesifikt T-cellereseptorkompleks i full lengde som omfatter både α - og β -heterodimeren (Morgan, R.A., m.fl. 2006 *Science* 314:126–129), lymfocyttkulturer som stammer fra svulstinfiltrerende lymfocytter (TIL) i svulstbiopsier (Panelli, M.C., m.fl. 2000 *J Immunol* 164:495–504; Panelli, M.C., m.fl. 2000 *J Immunol* 164:4382–4392), og selektivt in vivo-
20 ekspanderte antigenspesifikke perifere blodleukocytter ved hjelp av kunstige antigenpresenterende celler (AAPC) eller pulsede dendrittiske celler (Dupont, J., m.fl. 2005 *Cancer Res* 65:5417–5427; Papanicolaou, G.A., m.fl. 2003 *Blood* 102:2498–2505). T-cellene kan være autologe, allogene eller dannet in vitro av genteknisk modifiserte stamceller.

20

Alle egnede svulstantigener (antigenpeptider) egner seg til bruk i de svulstrelaterte utførelsesformene som beskrives her. Antigenkilder inkluderer, men er ikke innskrenket til, kreftproteiner. Antigenet kan uttrykkes som et peptid eller som et intakt protein eller en del av et protein. Det intakte proteinet eller en del av det kan
25 være naturlig eller mutagenisert. Et egnet antigen er prostataspesifikt membranantigen (PSMA).

Virusantigenspesifikke T-lymfocytter (og NK-celler)

Egnede antigener til bruk i behandling av patogeninfeksjoner eller andre
30 infeksjonssykdommer, for eksempel hos et immunkompromittert individ inkluderer, uten innskrenkninger, virusantigener som finnes i cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr-virus (EBV), humant immunsviktivirus (HIV) og influensavirus.

Den urensede kilden til CTL kan være alle kjente kilder, for eksempel
35 beinmarg, kilder for hematopoetiske celler som fostre, nyfødte, voksne eller andre, f.eks. fosterlever, perifert blod eller navlestrengblod. Det kan brukes forskjellige metoder til å separere cellene. For eksempel kan negative

seleksjonsmetoder fjerne alt annet enn CTL i begynnelsen. mAb er spesielt nyttig til å identifisere markører forbundet med bestemte cellestammer og/eller differensieringstrinn for både positive og negative seleksjoner.

- 5 En stor andel av de endelig differensierte cellene kan fjernes i begynnelsen med en relativt grov separasjon. For eksempel kan det i begynnelsen brukes separering med magnetiske mikrokuler for å fjerne store mengder irrelevante celler. Det foretrekkes at minst rundt 80 %, vanligvis minst 70 % av alle hematopoetiske celler fjernes før celleisoleringen.

10

Prosedyrer for separasjon inkluderer, men er ikke innskrenket til, tetthetsgradientsentrifugering, rosetting, binding til partikler som modifiserer celletettheten, magnetisk separasjon med antistoffbelagte magnetiske mikrokuler, affinitetskromatografi, cytotoksiske midler bundet til eller brukt sammen med et mAb, inkludert, men ikke innskrenket til, komplement og cytotoksiner, og panning med antistoff bundet til en fast matriks, f.eks. plate, brikke, elutriering eller enhver annen praktisk metode.

15

Metoder for separasjon og analyse inkluderer, men er ikke innskrenket til, flowcytometri, som kan være mer eller mindre avansert, f.eks. mange fargekanaler, lysspredningsdetekterende kanaler i spiss og stump vinkel, impedanskanaler.

20

Cellene kan selekteres mot døde celler ved hjelp av fargestoff som forbinder seg med døde celler, for eksempel propidiumjodid (PI). Det foretrekkes å samle cellene i et medium som omfatter 2 % kalvefosterserum (FCS) eller 0,2 % bovint serumalbumin (BSA) eller ethvert annet, fortrinnsvis sterilt, isotont medium.

25

Altså tilveiebringer oppfinnelsen generelt en immunresponderende celle, for eksempel et virus eller en svulstspesifikk T-celle som omfatter en reseptor som binder et antigen og en eksogen kostimulerende ligand (f.eks. CD80, 4-1BBL, OX40L, CD70 og CD30L).

30

Vektorer

Immunresponderende celler (f.eks. T-celler, CTL-celler, NK-celler) kan modifiseres genetisk ved å omforme en stort sett homogen cellesammensetning med en rekombinant DNA-konstruksjon. Det foretrekkes å bruke en retrovirusvektor (enten gammaretrovirus eller lentivirus) til å innføre DNA-konstruksjonen i cellen.

35

- For eksempel kan et polynukleotid som koder for et kostimulerende ligandprotein (f.eks. svulstnekrosefaktorligand (TNF), som 4-1BBL, OX40L, CD70, LIGHT og CD30L, eller en Ig-superfamilieligand, som CD80 og CD86), eller en reseptor som binder et antigen eller en variant eller et fragment av antigenet, klones inn i en
- 5 retrovirusvektor, og uttrykkingen kan drives fra den endogene promotoren dens, fra den lange repetisjonsenden til retroviruset eller fra en promotor som er spesifikk for en aktuell målcelletype. Det kan også brukes ikke-virale vektorer.

Kostimulerende ligander

- 10 Interaksjonen med minst én kostimulerende ligand gir et ikke antigenspesifikt signal som kreves for full aktivering av en T-celle. Kostimulerende ligander inkluderer, uten innskrenking, svulstnekrosefaktorligander (TNF), cytokiner (f.eks. IL-2, IL-12, IL-15 eller IL-21) og immunoglobulinsuperfamilieligander (Ig).

15

TNF-ligander

- Svulstnekrosefaktor (TNF) er et cytokin som er involvert i systemisk inflammasjon, der den stimulerer akutfasereaksjonen. Den viktigste rollen er å regulere immunceller. Svulstnekrosefaktorligander (TNF-ligander) har flere trekk
- 20 til felles. Flertallet av ligandene framstilles som transmembranproteiner av type II (ekstracellulær C-ende) som inneholder et kort cytoplasmasegment og en forholdsvis lang ekstracellulær region. TNF-ligander inkluderer, uten innskrenking, nervevekstfaktor (NGF), CD40L (CD40L)/CD154, CD137L/4-1BBL, svulstnekrosefaktor alfa (TNF α), CD134L/OX40L/CD252, CD27L/CD70, Fas-
- 25 ligand (FasL), CD30L/CD153, svulstnekrosefaktor beta (TNF β)/lymfotoksin-alfa (LT α), lymfotoksin-beta (LT β), CD257/B-celleaktiverende faktor (BAFF)/Blys/THANK/Tall-1, glukokortikoidinduktert TNF-reseptorligand (GITRL), og TNF-relatert apoptoseindukterende ligand (TRAIL), LIGHT (TNFSF14).

Ig-superfamilieligander

- Immunoglobulinsuperfamilien (Ig) er en stor gruppe av celleoverflateproteiner og løselige proteiner som er involvert i gjenkjennings-, bindings- og adhesjonsprosesser i cellene. Disse proteinene har strukturelle fellestrekk med immunoglobuliner – de har et immunoglobulindomene (immunoglobulinfold).
- 35 Ligandene av immunoglobulinsuperfamilien inkluderer, uten innskrenking, CD80 og CD86, begge ligander for CD28.

- Det brukes generelt en retrovirusvektor til den innledende genetiske modifisering av cellene for å lage svulst- eller virusantigenspesifikke celler, men alle egnede virusvektorer eller leveringssystemer kan brukes. Det er også effektivt med retrovirusgenoverføring (omforming) ved den påfølgende genmodifiseringen av cellene for å lage celler som omfatter et antigenpresenterende kompleks som omfatter minst to kostimulerende ligander. Kombinasjoner av retrovirus og en passende innpakningsstamme er også egnet, hvis kapsidproteinene er funksjonelle til å infisere menneskeceller. Det er kjent forskjellige amfotrofe virusproduserende cellestammer, inkludert, men ikke innskrenket til, PA12 (Miller, *m.fl.* (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:431–437); PA317 (Miller, *m.fl.* (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:2895–2902) og CRIP (Danos, *m.fl.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6460–6464). Ikke-amfotrope partikler egner seg også, f.eks. partikler psevdotypert med VSVG-, RD114- eller GALV-kappe og enhver annen kjent ikke-amfotrop partikkel.
- Mulige framgangsmåter for omforming inkluderer også direkte dyrking av cellene sammen med produsentceller, f.eks. med framgangsmåten i Bregni, *m.fl.* (1992) *Blood* 80:1418–1422, eller dyrking med virussupernatant alene eller konsentrerte vektorforråd med eller uten passende vekstfaktorer og polykationer, f.eks. med framgangsmåten i Xu, *m.fl.* (1994) *Exp. Hemat.* 22:223–230 og Hughes, *m.fl.* (1992) *J. Clin. Invest.* 89:1817.

- Det kan også brukes andre omformende virusvektorer til å uttrykke en kostimulerende ligand ifølge oppfinnelsen i en immunresponderende celle. Det foretrekkes at den valgte vektoren har høy infiseringseffektivitet og uttrykking (se f.eks. Cayouette *m.fl.*, *Human Gene Therapy* 8:423–430, 1997; Kido *m.fl.*, *Current Eye Research* 15:833–844, 1996; Bloomer *m.fl.*, *Journal of Virology* 71:6641–6649, 1997; Naldini *m.fl.*, *Science* 272:263–267, 1996 og Miyoshi *m.fl.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:10319, 1997). Andre virusvektorer som kan brukes er for eksempel adenovirusvektorer, lentivirusvektorer og adenotilknyttede virusvektorer, vacciniavirus, et bovint papillomvirus eller et herpesvirus, som Epstein-Barr-virus (se for eksempel også vektorene i Miller, *Human Gene Therapy* 15–14, 1990; Friedman, *Science* 244:1275–1281, 1989; Eglitis *m.fl.*, *BioTechniques* 6:608–614, 1988; Tolstoshev *m.fl.*, *Current Opinion in Biotechnology* 1:55–61, 1990; Sharp, *The Lancet* 337:1277–1278, 1991; Cornetta *m.fl.*, *Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 36:311–322, 1987; Anderson, *Science* 226:401–409, 1984; Moen, *Blood Cells* 17:407–416, 1991; Miller *m.fl.*, *Biotechnology* 7:980–990, 1989; Le Gal La Salle *m.fl.*, *Science*

259:988–990, 1993 og Johnson, Chest 107:77S–83S, 1995). Retrovirusvektorer er spesielt velutviklet og har vært brukt i kliniske situasjoner (Rosenberg m.fl., N. Engl. J. Med 323:370, 1990; Anderson m.fl., U.S. Pat. No. 5,399,346).

- 5 Ikke-virale tilnærminger kan også brukes til å uttrykke et protein i en celle. For eksempel kan det innføres et nukleinsyremolekyl i en celle ved å administrere nukleinsyren i nærvær av lipofeksjon (Feigner m.fl., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:7413, 1987; Ono m.fl., Neuroscience Letters 17:259, 1990; Brigham m.fl., Am. J. Med. Sci. 298:278, 1989; Staubinger m.fl., Methods in Enzymology 101:512, 10 1983), konjugering mellom asialoorosomukøst protein og polylysin (Wu m.fl., Journal of Biological Chemistry 263:14621, 1988; Wu m.fl., Journal of Biological Chemistry 264:16985, 1989), eller ved mikroinjeksjon under kirurgiske forhold (Wolff m.fl., Science 247:1465, 1990). Andre ikke-virale måter å overføre gener på er ved transfektering *in vitro* med kalsiumfosfat, DEAE-dekstran, elektroporering og 15 protoplastfusjon. Liposomer kan også være potensielt nyttige for å levere DNA til en celle. Det er også mulig å transplantere normale gener til sykt vev hos en pasient ved å overføre en normal nukleinsyre til en dyrkbar celletype *ex vivo* (f.eks. en autolog eller heterolog primær-celle eller avkom av den), og deretter injisere cellen (eller avkommet fra den) i et målvev eller systemisk.
- 20 cDNA-uttrykking til bruk i polynukleotidterapeutiske framgangsmåter kan dirigeres fra enhver egnet promotor (f.eks. humant cytomegalovirus (CMV), simiant virus 40 (SV40) eller metallotioneinpromotorer), og reguleres med ethvert passende pattedyrreguleringsselement. Hvis det er ønskelig, kan det til å 25 dirigere uttrykkingen av en nukleinsyre for eksempel brukes forøkere som er kjent for å dirigere genuttrykkingen selektivt i bestemte celletyper. Forøkerne som brukes kan inkludere, uten innskrenking, slike som karakteriseres som vevs- eller cellespesifikke forøkere. Hvis det brukes en genomisk klon som terapeutisk konstruksjon, kan reguleringen alternativt formidles med de 30 tilsvarende reguleringssekvensene eller hvis man ønsker det med reguleringssekvenser som stammer fra en heterolog kilde, blant annet en hvilken som helst av promotorene og reguleringsselementene som beskrives ovenfor.

- De resulterende cellene kan så dyrkes under forhold som tilsvarer forholdene 35 for umodifiserte celler, slik at de modifiserte cellene kan ekspanderes og brukes til diverse formål.

Polypeptider med analoger

Oppfinnelsen inkluderer også polypeptidene PZ1, P28z, 4-1BBL, OX40L, CD70, LIGHT og CD30L eller fragmenter av dem, modifisert på måter som forbedrer den antineoplastiske aktiviteten når de uttrykkes i en immunresponderende celle.

- 5 Oppfinnelsen tilveiebringer framgangsmåter for å optimalisere en aminosyresekvens eller nukleinsyresekvens ved å lage en forandring i sekvensen. Slike forandringer kan inkludere visse mutasjoner, deleasjoner, innersjoner eller posttranslasjonelle modifikasjoner. Oppfinnelsen inkluderer også analoger av alle naturlige polypeptider ifølge oppfinnelsen. Analogene kan skille seg fra et naturlig polypeptid i
 - 10 aminosyresekvensen ved posttranslasjonelle modifikasjoner eller begge. Analogene vil vanligvis være minst 85 %, fortrinnsvis 90 % og mer foretrukket 95 % eller til og med 99 % identiske med hele eller en del av en naturlig aminosyresekvens. Lengden for sekvenssammenlikningen er minst 5, 10, 15 eller 20 aminosyrerester, fortrinnsvis minst 25, 50 eller 75 aminosyrerester, og det foretrekkes mest at den
 - 15 er mer enn 100 aminosyrerester. Igjen kan det brukes et BLAST-program i et eksempel på en tilnærmingsmåte å bestemme identitetsgraden med, der sannsynlighetspoeng mellom e^{-3} og e^{-100} tyder på en nær beslektet sekvens. Modifikasjonene inkluderer kjemisk derivatisering av polypeptider in vivo eller in vitro, f.eks. acetylering, karboksylering, fosforylering eller glykosylering, og slik
 - 20 modifisering kan skje under polypeptidsyntesen eller polypeptidbearbeidingen eller etter behandling med isolerte modifiserende enzymer. Analogene kan også skille seg fra de naturlige polypeptidene ved forandringer i primærsekvensen. Dette inkluderer genetiske varianter, både naturlige og kunstige (for eksempel på grunn av tilfeldig mutagenese ved bestråling eller eksponering for etanmetylsulfat eller ved
 - 25 posisjonsspesifikk mutagenese som beskrevet i Sambrook, Fritsch og Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2. utg.), CSH Press, 1989 eller Ausubel m.fl., se ovenfor). Det inkluderer også ringformede peptider, molekyler og analoger som inneholder andre rester enn L-aminosyrerester, f.eks. D-aminosyrer eller ikke-naturlige eller syntetiske aminosyrer, f.eks. beta- eller gammaaminosyrer.

30

I tillegg til polypeptider i full lengde tilveiebringer oppfinnelsen også fragmenter av alle polypeptidene eller peptiddomenene. Slik det brukes her betyr uttrykket «et fragment» minst 5, 10, 13 eller 15 aminosyrer. I andre utførelsesformer er et fragment minst 20 sammenhengende aminosyrer, minst

- 35 30 sammenhengende aminosyrer eller minst 50 sammenhengende aminosyrer, og i andre utførelsesformer minst 60 til 80, 100, 200, 300 eller flere sammenhengende aminosyrer. Fragmenter kan lages ved framgangsmåter som

er kjent for fagpersoner eller kan komme fra normal proteinbearbeiding (f.eks. fjerne aminosyrer som ikke er nødvendig for den biologiske aktiviteten fra det nylagde polypeptidet eller fjerne aminosyrer ved alternativ mRNA-spleising, eller alternativ proteinbearbeiding).

5

Ikke-proteiniske analoger har en kjemisk struktur som er utformet for å etterlikne den funksjonelle aktiviteten til et protein. Slike analoger administreres ifølge framgangsmåtene til oppfinnelsen. Slike analoger kan ha høyere aktivitet enn det opprinnelige polypeptidet. Framgangsmåter for å utforme analoger er velkjente, og analoger kan framstilles ifølge slike framgangsmåter ved å modifisere de kjemiske strukturene slik at analogene som lages øker den antineoplastiske aktiviteten til det opprinnelige polypeptidet når det uttrykkes i en immunresponderende celle. Disse kjemiske modifikasjonene inkluderer, men er ikke innskrenket til, å substituere alternative R-grupper og variere metningsgraden for bestemte karbonatomer i et referansepolypeptid. Det foretrekkes at karbonanalogene er forholdsvis motstandsdyktige mot nedbrytning *in vivo*, slik at de får mer langvarig terapeutisk virkning etter administreringen. Analyser for å måle den funksjonelle aktiviteten inkluderer, men er ikke innskrenket til, de analysene som beskrives i eksemplene nedenfor.

20

Administrering

Sammensetninger som omfatter genmodifiserte immunresponderende celle (f.eks. T-celler, NK-celler, CTL-celler eller forløperne deres) kan gis systemisk eller direkte til et individ for å behandle neoplasi, patogeninfeksjon eller smittsomme sykdommer. I én utførelsesform injiseres cellene direkte i et aktuelt organ (f.eks. et organ som er rammet av neoplasi). Alternativt gis sammensetninger som omfatter genmodifiserte immunresponderende celle indirekte til det aktuelle organet, for eksempel ved å administreres til sirkulasjonssystemet (f.eks. blodårene i svulsten). Det kan gis ekspansjons- og differensieringsmidler før, under eller etter administreringen av cellene for å øke produksjonen av T-celler, NK-celler eller CTL-celler *in vitro* eller *in vivo*.

30

De modifiserte cellene kan administreres i alle fysiologisk aksepterbare bærere, vanligvis intravaskulært, men de kan også innføres i skjelettet eller andre praktiske steder der cellene kan finne et passende sted å regenerere og differensiere seg på (f.eks. brisselen). Vanligvis blir det gitt minst 1×10^5 celler, og etter hvert opp til 1×10^{10} eller mer. Genmodifiserte immunresponderende

35

celler kan omfatte en rensset populasjon av celler. Fagpersoner kan lett bestemme prosentandelen av genmodifiserte immunresponderende celle i en populasjon med forskjellige velkjente framgangsmåter, for eksempel fluorescensaktivert cellesortering (FACS). Foretrukne renhetsgrader i

5 populasjoner som omfatter genmodifiserte immunresponderende celle er omtrent 50 til omtrent 55 %, omtrent 55 til omtrent 60 % og omtrent 65 til omtrent 70 %. Det foretrekkes mer at renheten er omtrent 70 til omtrent 75 %, omtrent 75 til omtrent 80 %, omtrent 80 til omtrent 85 %, og det foretrekkes enda mer at renheten er omtrent 85 til omtrent 90 %, omtrent 90

10 til omtrent 95 % og omtrent 95 til omtrent 100 %. Fagpersoner kan lett justere dosene (f.eks. kan lavere renhet kreve økt dose). Cellene kan gis ved injeksjon, kateter eller liknende. Hvis man ønsker det, kan det også tas med faktorer, inkludert, men ikke innskrenket til, interleukiner, f.eks. IL-2, IL-3, IL-6 og IL-11 og de andre interleukinene, de kolonistimulerende faktorene, som

15 G-, M- og GM-CSF, interferoner, f.eks. gammainterferon, og erythropoetin.

Sammensetningene inkluderer farmasøytiske sammensetninger som omfatter genmodifiserte immunresponderende celler eller forløpere for dem, og en farmasøytisk akseptert bærer. Administreringen kan være autolog eller

20 heterolog. For eksempel kan man ta immunresponderende celler fra ett individ og gi dem til det samme individet eller et annet forlikelig individ.

Immunresponderende celler fra perifert blod eller avkom av dem (f.eks. framstilt in vivo, ex vivo eller in vitro) kan gis ved lokalisert injeksjon, inkludert

25 kateteradministrering, systemisk injeksjon, lokalisert injeksjon, intravenøs injeksjon eller parenteral administrasjon. Når man administrerer en terapeutisk sammensetning (f.eks. en farmasøytisk sammensetning som omfatter en genmodifisert immunresponderende celle), vil den generelt være formulert i en injiserbar enhetsdoseform (løsning, suspensjon, emulsjon).

30

Formuleringer

Sammensetninger ifølge oppfinnelsen som omfatter genmodifiserte immunresponderende celle er praktiske å tilveiebringe som sterile flytende preparater, f.eks. isotone vannløsninger, suspensjoner, emulsjoner, dispersjoner

35 eller viskøse sammensetninger, som kan bufres til en valgt pH. Flytende preparater er normalt lettere å tilberede enn geler, andre viskøse sammensetninger og faste sammensetninger. Dessuten er flytende

sammensetninger noe mer praktisk å administrere, spesielt ved injeksjon. Viskøse sammensetninger kan derimot formuleres innenfor det passende viskositetsområdet for å oppnå lengre kontakttid med spesifikke vev. Flytende eller viskøse sammensetninger kan omfatte bærere, som kan være et

5 løsningsmiddel eller dispergeringsmiddel som for eksempel inneholder vann, saltløsning, fosfatbufret saltløsning, polyol (for eksempel glyserol, propylenglykol, flytende polyetylenglykol eller liknende) og passende blandinger av dem.

Sterile injiserbare løsninger kan tilberedes med de genmodifiserte

10 immunresponderende cellene i den nødvendige mengden av det passende løsningsmidlet og med forskjellige mengder av de andre bestanddelene etter ønske. Slike sammensetninger kan foreligge i blanding med en passende bærer, et passende fortynningsmiddel eller et passende hjelpestoff, for eksempel sterilt vann, fysiologisk saltvann, glukose, dekstrose eller liknende. Sammensetningene kan også

15 frysetørkes. Sammensetningene kan inneholde hjelpestoffer som for eksempel fuktemidler, dispergeringsmidler eller emulgatorer (f.eks. metylcellulose), pH-bufringsmidler, geleringsmidler eller viskositetsøkende tilsetninger, konserveringsmidler, smaksstoffer, fargestoffer eller liknende, det kommer an på den ønskede administreringsmåten og tillagingsmåten. Standardtekster som

20 «REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE», 17. utgave, 1985 kan konsulteres for å tillage passende preparater uten unødig eksperimentering.

Det kan også brukes forskjellige tilsetninger som øker stabiliteten og steriliteten til sammensetningene, blant annet antimikrobielle konserveringsmidler,

25 antioksidanter, kelatdannere og buffere. Man kan sikre seg mot aktiviteten til mikroorganismer med forskjellige antibakterielle midler og soppmidler, for eksempel parabener, klorbutanol, fenol, sorbinsyre eller liknende. Langvarig opptak av den injiserbare farmasøytiske formen kan oppnås ved å bruke midler som forsinker opptaket, for eksempel aluminiummonostearat og gelatin. Men alle

30 bærere, fortynningsmidler eller tilsetningsstoffer som brukes må være forenlig med de genmodifiserte immunresponderende cellene eller forløperne deres.

Sammensetningen kan være isoton, dvs. den kan ha samme osmotiske trykk som blod og tårevæske. Den ønskede isotoniteten til sammensetningene kan oppnås

35 med natriumklorid eller andre farmasøytisk aksepterbare midler som dekstrose, borsyre, natriumtartrat, propylenglykol eller andre uorganiske eller organiske løste stoffer. Natriumklorid foretrekkes spesielt for buffere som inneholder natriumioner.

- Viskositeten til sammensetningene kan opprettholdes på et valgt nivå hvis man ønsker det, ved hjelp av et farmasøytisk aksepterbart fortykningsmiddel. Metylcellulose foretrekkes fordi den er lett og økonomisk tilgjengelig og er lett
- 5 å arbeide med. Andre egnede fortykningsmidler er for eksempel xantangummi, karboksymetylcellulose, hydrokspropylcellulose, karbomer eller liknende. Den foretrukne konsentrasjonen av fortykningsmidlet er avhengig av det valgte midlet. Det viktige er å bruke en mengde som vil gi den valgte viskositeten. Valget av egnede bærere og andre tilsetningsstoffer er åpenbart avhengig av
- 10 den eksakte administreringsmåten og den aktuelle doseformen, f.eks. flytende doseform (f.eks. om sammensetningen skal formuleres i en løsning, en suspensjon, gel eller en annen flytende form, for eksempel en form med langvarig frigjøring eller en væskefylt form).
- 15 Fagpersoner vil være klar over at bestanddelene av sammensetningene bør velges slik at de er kjemisk inerte og ikke vil påvirke levedyktigheten eller effektiviteten til de genmodifiserte immunresponderende cellene som beskrives her. Dette vil ikke være noe problem for personer med kjennskap til kjemiske og farmasøytiske prinsipper, ellers kan man lett unngå problemer ved å slå opp
- 20 i standardverk eller ved enkle eksperimenter (uten unødig eksperimentering) ut fra denne bekjentgjørelsen og dokumentene som siteres her.
- Når det gjelder terapeutisk bruk av genmodifiserte immunresponderende celler er én vurdering man må gjøre å finne ut hvor mange celler som trengs for å oppnå
- 25 optimal virkning. Mengden av celler som må gis vil variere med individet som skal behandles. I én utførelsesform gis mellom 10^4 og 10^{10} , mellom 10^5 og 10^9 eller mellom 10^6 og 10^8 genmodifiserte immunresponderende celler til et menneskelig individ. I foretrukne utførelsesformer gis minst rundt 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 og 5×10^8 genmodifiserte immunresponderende celler til et menneskelig
- 30 individ. Det kan bestemmes eksakt hva som ville blitt regnet som en effektiv dose ut fra faktorer som er individuelle for hvert individ, blant annet størrelsen, alderen, kjønnnet, veksten og tilstanden til det enkelte individet. Dosene kan enkelt fastslås av fagpersoner ut fra egen fagkunnskap og denne bekjentgjørelsen.
- 35 Fagkyndige personer kan enkelt bestemme hvor mange celler og eventuelle tilsetninger og/eller bærere som skal være med i sammensetninger og administreres i framgangsmåtene. Vanligvis foreligger eventuelle tilsetninger (i

- tillegg til aktiv(e) stamcelle(r) og/eller middel/midler) i en mengde på 0,001 til 50 (vekt-)% løsning i fosfatbufret saltløsning, og virkestoffet foreligger i en størrelsesorden på mikrogram til milligram, for eksempel rundt 0,0001 til rundt 5 vekt-%, fortrinnsvis rundt 0,0001 til rundt 1 vekt-%, mer foretrukket rundt 5 0,0001 til rundt 0,05 vekt-% eller rundt 0,001 til rundt 20 vekt-%, fortrinnsvis rundt 0,01 til rundt 10 vekt-%, og enda mer foretrukket rundt 0,05 til rundt 5 vekt-%. Naturligvis foretrekkes det for alle sammensetninger som skal gis til et dyr eller et menneske og for enhver særskilt administreringsmåte at det først bestemmes: giftighet, for eksempel ved å bestemme dødelig dose (LD) og 10 LD50 med en passende dyreforsøksmodell, f.eks. en gnager, som mus; og hvilken dosering av sammensetningen(e), konsentrasjon av bestanddelene samt hvilke tidspunkt for administrering av sammensetningen(e) som gir en passende respons. Med kunnskapene til kyndige fagpersoner, denne bekjentgjørelsen og dokumentene som siteres her, krever ikke disse 15 bestemmelsene unødig eksperimentering. Og tidspunktene for sekvensiell administrering kan fastslås uten unødig eksperimentering.

Behandlingsmetoder

- Her tilveiebringes det framgangsmåter for å behandle neoplasi hos en pasient. 20 Her overveies det også framgangsmåter for å behandle en patogeninfeksjon eller andre infeksjonssykdommer hos et individ, for eksempel en immunkompromittert menneskelig pasient. Framgangsmåtene omfatter å gi en T-celle, NK-celle eller CTL-celle i en mengde som er effektiv til å oppnå den ønskede virkningen, enten gjelder å lindre en eksisterende sykdom eller å 25 hindre tilbakefall. Med hensyn til behandlingen er mengden som gis en mengde som er effektiv til å gi den ønskede virkningen. Det kan tilveiebringes en effektiv mengde i en administrasjon eller en serie administrasjoner. En effektiv mengde kan tilveiebringes i en bolus eller ved kontinuerlig perfusjon.
- 30 En «effektiv mengde» (eller «terapeutisk effektiv mengde») er en mengde som er tilstrekkelig til å oppnå et gunstig eller ønsket klinisk resultat etter behandlingen. En effektiv mengde kan gis til et individ i én eller flere doser. Når det gjelder behandling, er en effektiv mengde en mengde som er tilstrekkelig til å lindre, mildne, stabilisere, reversere eller bremse progresjonen 35 til en sykdom, eller forøvrig redusere de patologiske følgene av sykdommen. Den effektive mengden bestemmes generelt av legen fra tilfelle til tilfelle, og dette ligger innenfor kunnskapsområdet til en fagperson. Vanligvis tas flere

faktorer i betraktning når man skal bestemme passende dose for å oppnå en effektiv mengde. Disse faktorene inkluderer alderen, kjønn og vekten til individet, sykdommen som behandles, hvor alvorlig den er og formen og den effektive konsentrasjonen til det antigenbindende fragmentet som gis.

5

Til adoptiv immunterapi med antigenspesifikke T-celler blir det vanligvis infusert celledoser i området 10^9 . Etter at de genmodifiserte celler er gitt til verten og deretter differensiert, aktiveres det T-celler som er spesielt rettet mot det spesifikke antigenet. «Induktering» av T-celler kan inkludere å inaktivere antigenspesifikke T-celler, for eksempel delesjon eller anergi. Inaktivering er spesielt nyttig for å etablere eller reetablere toleranse, for eksempel ved autoimmunlidelser. De modifiserte cellene kan gis ved enhver kjent framgangsmåte, inkludert, men ikke innskrenket til, intravenøst, subkutanøst, intranodalt, intratumoralt, intratekalt, intraplevralt, intraperitonealt og direkte i brisselen.

15

Terapeutiske framgangsmåter

Oppfinnelsen tilveiebringer framgangsmåter for å øke immunresponsen hos et individ som har behov for det. I én utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen framgangsmåter for å behandle eller forebygge neoplasia hos en pasient. Oppfinnelsen tilveiebringer terapier som er spesielt nyttige til behandling av pasienter som har prostatakrefte eller metastatisk prostatakrefte og ikke er mottakelige for konvensjonelle terapeutiske intervensjoner. Menneskelige pasienter som egner seg for behandlingen omfatter vanligvis to behandlingsgrupper som kan skilles fra hverandre med kliniske kriterier. Pasienter med «framskreden sykdom» eller «høy svulstbyrde» er slike som har en klinisk målbar svulst. En klinisk målbar svulst er en svulst som kan detekteres på grunnlag av tumormassen (f.eks. ved palpasjon, CAT-skanning, sonogram, mammogram eller røntgen, og positive biokjemiske eller histopatologiske markører alene er ikke tilstrekkelige til å identifisere denne populasjonen). Det gis en farmasøytisk sammensetning som er nedfelt i denne bekjentgjørelsen til disse pasientene for å utløse en respons mot svulsten, med hensikt om å mildne sykdommen. Ideelt fører dette til at massen av svulsten reduseres, men alle kliniske forbedringer er en fordel. Klinisk forbedring innebærer å senke risikoen for progresjon eller hastigheten til progresjonen eller redusere de patologiske følgene av kreften.

35

En annen gruppe egnede pasienter er kjent som «adjuvantgruppen». Dette er individer som har hatt neoplasia, men har respondert på en annen form for

terapi. Den tidligere terapien kan ha inkludert (men er ikke innskrenket til), kirurgisk fjerning, radioterapi og tradisjonell kjemoterapi. På grunn av dette har ikke disse individene noen klinisk målbar svulst. Men de er under mistanke for å ha risiko for progresjon av sykdommen, enten nær det opprinnelige svulstsetet eller ved metastaser. Gruppen kan deles opp ytterligere i individer med høy og lav risiko. Denne oppdelingen gjøres på grunnlag av trekk som observeres før eller etter den opprinnelige behandlingen. Disse trekkene er kjent i det kliniske faget, og defineres med tilpasning hver av de forskjellige neoplasier. Trekk som er typiske for undergrupper med høy risiko er at svulsten har invadert nabovæv, eller at lymfeknutene er involvert.

En annen gruppe er genetisk disponert for neoplasier, men har ennå ikke vist noen kliniske tegn på det. For eksempel kan kvinner med positiv test på en genetisk mutasjon som er forbundet med brystkreft, men ennå er i fertil alder, ønske å motta ett eller flere av de antigenbindende fragmentene som beskrives her i en forebyggende behandling for å forebygge neoplasier, inntil det ikke er noe til hinder for preventiv kirurgi lenger.

Menneskelige neoplasipasienter som har en av de følgende neoplasier: glioblastom, melanom, nevroblastom, adenokarsinom, gliom, bløtvevssarkom og forskjellige karsinomer (blant annet prostatakraft og småcellet lungekreft), er spesielt godt egnede pasienter. Egnede karsinomer inkluderer også alle som er kjente i onkologien, inkludert, men ikke innskrenket til, astrocytom, fibrosarkom, myksosarkom, liposarkom, oligodendrogliom, ependymom, medulloblastom, primitiv nevral ektodermal svulst (PNET), kondrosarkom, osteogent sarkom, adenokarsinom i bukspyttkjertelgangene, små- og storcellet lungeadenokarsinom, kordom, angiosarkom, endoteliosarkom, skvamøscellekarsinom, bronkoalveolarkarsinom, epiteladenokarsinom, og levermetastaser av denne, lymfangiosarkom, lymfangioendoteliosarkom, hepatom, kolangiokarsinom, synoviom, mesoteliom, Ewings svulst, rabdomyosarkom, tykktarmskarsinom, basalcellekarsinom, svettekjertelkarsinom, papillært karsinom, talgkjertelkarsinom, papillært adenokarsinom, cystadenokarsinom, medullært karsinom, bronkogent karsinom, nyrecellekarsinom, gallegangskarsinom, koriokarsinom, seminom, fosterkarsinom, Wilms svulst, testikkelsvulst, medulloblastom, kraniofaryngiom, ependymom, pinealom, hemangioblastom, akustisk nevrom, oligodendrogliom, meningiom, nevroblastom, retinoblastom, leukemi,

multippelt myelom, Waldenströms makroglobulinemi og tungkjedesykdom, brystkreftformer som duktalt og lobulært adenokarsinom, skvamøst karsinom og adenokarsinom i livmorhalsen, epitelkarsinom i livmor og eggstokker, prostataadenokarsinom, overgangsformer for skvamøscellet blærekarsinom, B- og T-cellelymfomer (nodulære og diffuse), plasmacytom, akutt og kronisk leukemi, malignt melanom, bløtvevssarkom og leiomyosarkom.

Pasientene kan ha en framskreden form for sykdommen, og i så fall kan behandlingsmålet inkludere å dempe eller reversere sykdomsprogresjonen og/eller lindre bivirkninger. Pasienten kan ha en forhistorie med sykdommen og allerede behandlet for den, og i så fall vil behandlingsmålet vanligvis inkludere å senke eller forsinke risikoen for tilbakefall.

Derfor tilveiebringer oppfinnelsen en framgangsmåte for å behandle eller forebygge neoplasia hos en pasient, som omfatter å gi en effektiv mengde av en immunresponderende celle som omfatter en reseptor som binder et antigen, og en vektor som koder for en kostimulerende ligand. I én utførelsesform velges neoplasien fra gruppen som består av prostatakraft, tykktarmskreft, brystkreft og glioblastom. I en annen utførelsesform er svulstantigenet prostataspesifikt membranantigen, CD19, NY-ESO-1, WT-1 eller hTERT.

Et annet aspekt av oppfinnelsen er å tilveiebringe en framgangsmåte for å tvinge fram toleranse hos en pasient, som omfatter å gi en effektiv mengde av en immunresponderende celle som omfatter en reseptor som binder et antigen, og en vektor som koder for en kostimulerende ligand. I én utførelsesform vil framgangsmåten hindre eller svekke en autoimmunsykdom eller en sykdom som er forbundet med allogen transplantering.

På grunn av den konstitutive overflateuttrykkingen av kostimulerende ligander har adoptivt overførte humane T- eller NK-celler forsterkede proliferative og cytolytiske evner og overlever bedre i en svulst som i seg selv er lite immunogen eller i et immunsvekket miljø som mangler kostimulerende ligander. Etter at de er lokalisert til svulsten eller virusinfeksjonen og har proliferert, gjør T-cellene som uttrykker kostimulerende ligander dessuten svulstsetet eller setet for virusinfeksjonen om til et godt tilrettelagt miljø for et bredt utvalg av immunceller som er involvert i den fysiologiske responsen mot svulsten eller viruset (svulstinfiltrerende lymfocytter, NK-, NKT-celler, dendritiske celler og makrofager).

- I andre utførelsesformer tilveiebringer oppfinnelsen framgangsmåter for å behandle pasienter med patogeninfeksjon (f.eks. virusinfeksjon, parasittinfeksjon eller protozoainfeksjon). Oppfinnelsen er spesielt nyttig til å forbedre en immunrespons hos et immunkompromittert individ. Eksempler på virusinfeksjoner som er mottakelige for behandling med en framgangsmåte ifølge oppfinnelsen inkluderer, men er ikke innskrenket til, infeksjoner med cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr-virus (EBV), humant immunsviktvirus (HIV) og influensavirus.
- 10 Altså tilveiebringer oppfinnelsen en framgangsmåte for å behandle eller forebygge en patogeninfeksjon hos et individ, som omfatter å gi en effektiv mengde av en immunresponderende celle slik den beskrives her.

Sett

- 15 Oppfinnelsen tilveiebringer sett for behandling eller forebygging av neoplasi, patogeninfeksjon, immunsykdom eller allogent transplantat. I én utførelsesform inkluderer settet en terapeutisk eller profylaktisk sammensetning som inneholder en effektiv mengde av en immunresponderende celle som omfatter en eller flere kostimulerende ligander i enhetsdoseform. I noen utførelsesformer omfatter settet en steril beholder som inneholder en terapeutisk eller profylaktisk vaksine. Slike beholdere kan være esker, ampuller, flasker, glass, rør, poser, blisterpakninger eller andre egnede kjente beholderformer. Slike beholdere kan lages av plast, glass, laminert papir, metallfolie eller andre materialer som egner seg for å oppbevare legemidler.

- Hvis det ønskes, kan den immunresponderende cellen tilveiebringes sammen med instruksjoner for å gi cellen til en pasient med neoplasi, patogeninfeksjon, immunsykdom eller allogent transplantat eller med risiko for å få det.
- 30 Instruksjonene vil generelt inkludere opplysninger om bruk av sammensetningen til å behandle eller forebygge neoplasi, patogeninfeksjon, immunsykdommer eller allogene transplantater. I andre utførelsesformer inkluderer instruksjonene minst én av følgende: beskrivelse av det terapeutiske midlet; doseplan og administrering for behandling eller forebygging av neoplasi, patogeninfeksjon, immunsykdom eller allogent transplantat eller symptomer på disse, forsiktighetsregler, advarsler, indikasjoner, kontraindikasjoner, overdoseringsopplysninger, bivirkninger,

veterinærfarmakologi, kliniske studier og/eller referanser. Instruksjonene kan trykkes direkte på beholderen (hvis det er noen), eller som en etikett festet til beholderen, eller som et eget ark, hefte, kort eller en folder som leveres i eller med beholderen.

5

Rekombinante metoder er velkjente. Hvis det ikke angis noe annet, utnytter praksisen ifølge oppfinnelsen utnytter konvensjonelle metoder i molekylærbiologien (også rekombinante metoder), mikrobiologien, cellebiologien, biokjemien og immunologien, som ligger innenfor fagets ferdighetsområde. Slike metoder forklares fullt ut i litteraturen, for eksempel «Molecular Cloning: A Laboratory Manual», andre utgave (Sambrook m.fl., 1989); «Oligonucleotide Synthesis» (Gait, red., 1984); «Animal Cell Culture» (Freshney, red., 1987); «Methods in Enzymology» (Academic Press, Inc.); «Handbook of Experimental Immunology» (Wei & Blackwell, red.); «Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells» (Miller & Calos, red., 1987); «Current Protocols in Molecular Biology» (Ausubel m.fl., eds., 1987); «PCR: The Polymerase Chain Reaction», (Mullis m.fl., red., 1994) og «Current Protocols in Immunology» (Coligan m.fl., red., 1991). Disse metodene kan brukes til å produsere polynukleotider og polypeptider, og kan vurderes i og for seg når oppfinnelsen lages og praktiseres. Spesielt nyttige metoder diskuteres i de neste avsnittene.

20

Eksempler

De følgende eksemplene tilbys som videre beskrivelse av oppfinnelsen og for å illustrere, men ikke innskrenke oppfinnelsen.

25 Eksempel 1

T-celler som samtidig uttrykker CD80 og 4-1BBL utløser robust proliferativ respons etter syklisk stimulering gjennom den endogene T-cellereseptoren deres eller gjennom en kimær antigenreseptor uten kostimulering fra antigenpresenterende celler (APC).

30

For å vurdere om konstitutiv uttrykking av kostimulerende ligander i T-celler kunne erstatte APC-formidlet kostimulering, ble T-celleresponsen til humane primære T-celler først undersøkt i tre eksperimentelle systemer. Ekspansjon av T-lymfocytter fra perifert blod, omformet med CD80 og 4-1BBL ved anti-CD3(OKT3)-formidlet T-celleaktivering ble målt (figur 1a) og sammenliknet med T-celler omformet enten med liganden alene eller ingenting. T-cellene ble ikke ekspandert ved gjentatt stimulering av T-cellereseptorene (TCR) alene i fravær av kostimulerende ligander,

35

og dette førte til en rask reduksjon av T-celletallet etter den første omstimuleringen (figur 1b). Derimot utløste OKT3-stimulerte CD80⁺- og 4-1BBL⁺-T celler en gjennomsnittlig 237-dobbelt proliferering på 21 dager. Til sammenlikning viste T-celler omformet med én av ligandene alene en gjennomsnittlig 8,1-dobbelt proliferering (p <0,0001). Ut fra disse observasjonene ble konseptet med T-celleformidlet kostimulering utvidet til to klinisk relevante bruksområder for adoptiv T-celleterapi, med cytomegaloviruspesifikke (CMV) minnedonor-T-celler og differensieringsantigenpesifikke genetisk omdirigerte autologe T-celler. CMV pp65-spesifikke T-lymfocytter som var ekspandert kort på kunstige HLA-A*0201⁺pp65⁺-APC²⁴ var enkle å omforme med CD80 og 4-1BBL (figur 1c). Etter eksponering for den HLA-A*0201⁺ pp65-omformede tykktarmskreftcellestammen Caco-2, viste T-celler utstyrt med det kostimulerende ligandparet CD80 og 4-1BBL signifikant høyere (209-dobbelt, p <0,0001) ekspansjon enn det kontinuerlig synkende T-celletallet i kontrollgruppene (figur 1d).

For å danne svulstreaktive humane T-lymfocytter raskt ble T-celler fra perifert blod retrovirusomformet med den kimære antigenreseptoren Pz1 (Gade m.fl., Cancer Res. 65:9080–9088, 2005), en ikke-HLA-innskrenket antigenreseptor som er spesifikk for svulstantigenet PSMA. Pz1-reseptoren omfatter et PSMA-bindende enkeltkjedet antistoffragment kondensert med det humane CD3 ζ-signaldomenet og er analogt i struktur med andre kimære antigenreseptorer som er i bruk i kliniske studier i dag. Pz1⁺-T-celler som uttrykker både CD80 og 4-1BBL (figur 1e) ga en robust prolifereringsrespons etter tre ukentlige stimulasjoner med PSMA⁺-, CD80⁻-, CD86⁻-, 4-1BBL⁻-LNCaP-celler (gjennomsnittlig 1042-dobbelt anriking, figur 1f, øverste diagram). Denne ekspansjonen var 9-dobbelt, og større (p <0,0001) enn når CD80 og 4-1BBL ble uttrykt i svulstcellene i stedet for T-cellene (figur 1f, nederste diagram). Videre analyser dokumenterte at IL-2 og IFN-γ ble indukert i høyere grad ved eksponering for PSMA i T-celler som uttrykte både CD80 og 4-1BBL og at de hadde høyere antigenspesifikt cytolytisk potensiale og var mindre utsatt for apoptose enn konvensjonelle stimulerte T-lymfocytter (data ikke framstilt). I parallelle studier ble andre medlemmer av TNF-ligandfamilien⁵ undersøkt, blant annet OX40L, CD27L (CD70) eller CD30L, med eller uten CD80, og man fant at kombinasjonen av CD80 og 4-1BBL var den sterkeste (data ikke framstilt).

Til sammen viser disse *in vitro*-studiene at T-lymfocytter som uttrykker både CD80 og 4-1BBL kan styrke suboptimal TCR-aktivering betydelig og dessuten erstatte mangelen på kostimulering fra APC.

5 Eksempel 2

T-celler som uttrykker både CD80 og 4-1BBL utsletter etablerte systemiske svulster. For å undersøke styrken til CD80⁺4-1BBL⁺-T-cellene våre *in vivo* ble det utviklet en modell av etablert multifokal prostatakraft med PSMA⁺-PC-3-svulstceller (Gong m.fl., Neoplasia 1:123–7, 1999). Svulstene ble visualisert fire uker etter den intravenøse inokuleringen med to bildediagnostiske metoder, bioluminescens og magnetresonans, før den adoptive T-cellebehandlingen ble startet. Lungene, halslymfeknutene, beinmargen og leveren ble identifisert som hovedsetene for sykdommen (figur 2a). I denne modellen ble dyrene behandlet fire uker etter kreftinokulasjonen med en enkelt intravenøs infusjon på 8×10^6 PSMA-spesifikke T-celler som uttrykte enten CD80, 4-1BBL, begge eller ingen av dem.

Hos kontrollmus behandlet med 8×10^6 CD 19-spesifikke T-celler, som i likhet med uomformede T-celler ikke klarer å lysere PSMA⁺-svulstmål *in vitro*, økte svulstbyrde jevnt inntil musene måtte avlives (figur 2b,c). Behandling med Pz1⁺-T-celler ga kortvarig reduksjon av svulstbyrden og så endelig svulstprogresjon (figur 2b), med en moderat overlevelsesgevinst på 12 dager ($p = 0,0001$, figur 2c). Konstitutiv uttrykking av enten CD80 eller 4-1BBL alene i PSMA-spesifikke T-celler økte denne behandlingsresponsen bare marginalt, med en gjennomsnittlig overlevelse forlenget til henholdsvis 63 og 66 dager (henholdsvis $p = 0,077$ og $p = 0,056$). T-celler som samtidig uttrykte CD80 og 4-1BBL utløste sterk respons og reduserte svulstbyrden 3,3 ganger ($p = 0,0028$) fire dager etter den adoptive T-celleoverføringen. Etter seksten dager ble det oppnådd en 1375-dobbelt økning i forhold til gruppen som ble behandlet med Pz1⁺-T-cellebehandlingsgruppe ($p = 0,0002$). Sju av de ti behandlede dyrene var fortsatt svulstfrie 200 dager etter infusjonen med Pz1⁺CD80⁺4-1BBL⁺-T-lymfocytter, men ingen i noen av de andre behandlings- eller kontrollgruppene var det (figur 2c). De tre musene som ikke fikk resultat av behandlingen, viste i begynnelsen markert svulstregresjon, før tilbakefallet (figur 2b), og overlevde i 100 dager (figur 2c).

35

Eksempel 3

T-celleekspansjonen *in vivo* er robust og antigenspesifikk.

For å følge og måle migreringen og opphopingen av T-cellene i forhold til svulstlokaliseringen og svulstbyrden *in vivo*, ble adoptivt overførte T-celler også merket med rød smellerluciferase (Ponomarev m.fl., Eur J Nucl Med Mol
 5 Imaging. 2004 mai;31(5):740–51) (CBR-luc, figur 3a). Seriebilder av mus behandlet med Pz1⁺-T-celler viste en progressiv signaløkning som nådde en topp fire dager etter T-celleinjeksjonen (figur 3b). Et svakt signal kunne detekteres inntil dag 18. For Pz1⁺CD80⁺4-1BBL⁺-T-celler ble toppsignalet detektert på dag 8 (41 ganger så høy laveste fotontelling som for Pz1⁺-T-celler, p = 0,0009), og så
 10 sank signalet gradvis, men hos noen dyr kunne det fortsatt detekteres bioluminescens inntil dag 100 (figur 3b). Det er viktig at virkningen av uttrykkingen av både CD80 og 4-1BBL ble opphevet i 19z1⁺-T-lymfocytter (figur 3b), som stemmer overens med at ekspansjonen krever antigenstimulering. Flowcytometriske analyser og T-celletegninger av suspensjoner av enkeltvise
 15 lungeceller fra tre behandlede mus per gruppe viste at det faktiske T-celletallet stemte godt overens med de målte bioluminescenssignalstyrkene (figur 3c,d). Disse studiene viser altså at T-celler som uttrykker både CD80 og 4-1BBL, ekspanderer på en antigenavhengig måte før de til slutt går over i en nedgangsfase som fører til en betydelig om ikke full utarming av T-cellene.

20

Eksempel 4

Før den funksjonelle egenkostimuleringen av T-cellene flyter de kostimulerende ligandene CD80 og 4-1BBL sammen med de respektive reseptorene sine, CD28
 25 og 4-1BB, i den immunologiske synapsen.

For å finne ut om konstitutivt uttrykte kostimulerende ligander aktiverer T-celler i *cis*, ble det først undersøkt om disse ligandene samlokaliserte seg med de tilhørende reseptorene under T-celleaktivering. Både CD28 og 4-1BB forsterker signaliseringen T-cellerreseptorene (TCR) etter rekrutteringen til sentrale
 30 membranavdelinger av den immunologiske synapsen.³¹⁻³³ Derfor er sannsynligvis samlokalisering av CD80 og 4-1BBL til kontaktområdet mellom T-cellen og svulstcellen nødvendig for egenkostimuleringen. For å visualisere 4-1BBL-fordelingen med konfokalmikroskopi ble det cytoplasmiske domenet kondensert med monomert dsRed, og dette proteinet ble uttrykt sammen med CD80 i Pz1-
 35 omformede CD8⁺-T-lymfocytter. Like før de ble blandet med umodifiserte CD28⁻, 4-1BB⁻-LNCaP-celler, ble T-cellene merket med fluoresceinisotiocyanatbundet koleratoksin, β-underenhet (FITC-CTB) for å visualisere lipidflåteklumper etter

synapsedannelsen. Etter kobling til LNCaP-svulsten ble både 4-1BBL og CD80 så vel som 4-1BB og CD28 mobilisert til koleratoksin-FITC-positive kontaktområder mellom T-cellene og svulstcellene (figur 4a,b). For å undersøke de funksjonelle følgene av denne interaksjonen, ble samlokaliseringen av granzym B (GRB. GRB-kondensasjonen var veldefinert men sparsom, og lokalisert nær kontaktsonen i klumper av Pz1-uttrykkende CD8⁺-T-celler og de tilsvarende svulstmålene (figur 4c,d)) studert og tallfestet. Medianrekrutteringen av GRB til koblinger mellom T-celler og svulstceller ble forsterket 2,2 ganger i CD80⁺4-1BBL⁺-T-cellene ($p = 0,0001$). For å bekrefte at disse observerte forskjellene faktisk skyldtes kobling mellom 4-1BBL og 4-1BB i samme celle, ble 4-1BB-uttrykkningen slått ned ved stabil samuttrykking av 4-1BBL og et 4-1BB-spesifikt shRNA (data ikke framstilt). 4-1BB-fallet reduserte GRB-tettheten signifikant nær synapsen (2,02 ganger reduksjon, $p < 0,0001$), til tross for nærværet av 4-1BBL i koblingen til T-cellen i alle de avbildede celleklumpene. Disse resultatene tyder klart på at den kostimulerende liganden kobler reseptoren sin funksjonelt på samme T-celleoverflate etter den antigenutløste sammenflytingen i den immunologiske synapsen.

For å påvise egenkostimuleringen ytterligere ble det utviklet en enkeltcelleanalyse der den endogene 4-1BB/4-1BBL-interaksjonen kunne analyseres etter den tidligste uttrykkingen av 4-1BBL i nyomformede T-celler. For å oppnå dette ble først ildflueluciferase uttrykt under transkripsjonskontrollen av NF- κ B, en viktig nedstrømseffektor av 4-1BB-signaliseringen, i en klon av CD3⁺CD28⁺4-1BB⁻-Jurkat-T-celler (JNL). For å hindre at NF- κ B ble utløst av sporadisk tilskuerkostimulering, ble JNL-cellene eksponert for retrovirusvektorer som kodet for 4-1BB, 4-1BBL og CD80, og underklont ved å begrense fortyningen 4 timer etterpå, lenge før det første detekterbare overflategenet (data ikke framstilt) og straks stimulert med platebundet OKT3. Som vist på figur 4e oppregulerte CD80⁺CD28⁺4-1BBL⁺4-1BB⁺-T-celler NF- κ B markert i motsetning til JNL-celler omformet med kontrollvektor. Luminescenssignalet ble registrert i 36 brønner som inneholdt en enkelt fleromformet celle som beskrevet i framgangsmåtene. Samuttrykking av de to ligandparene økte det NF- κ B-avhengige signalet til det 3,8-dobbelte (av kontroll-JNL, $p < 0,0001$, figur 4f). Siden den eneste kilden for kostimulerende ligander under hele denne analysen var den isolerte T-cellens egen overflate, kunne denne oppreguleringen av NF- κ B bare skyldes virkningen av egenkostimuleringen.

Eksempel 5

Trans-kostimulering av antigenspesifikke tilskuer-T-celler in vitro

Konstitutiv uttrykking av kostimulerende ligander kan også gjøre genmodifiserte T-celler i stand til å *trans*-kostimulere T-celler. Merk at det av og til ble registrert
 5 celleklumper på tre celler som omfatter CD80⁺4-1BBL⁺-T-celler og CD80⁻4-1BBL⁻-T-celler i konfokalstudiene som er framstilt på fig. 4 (figur 5a). For å skaffe funksjonelt bevismateriale for *trans*-kostimulering ble det utviklet et samkultursystem der PSMA-spesifikke T-celler som uttrykker CD80 og 4-1BBL blandet med T-celler merket med karboksyfluoresceinsuksinimidylester (CFSE)
 10 som ikke var omformet med CD80 eller 4-1BBL. Man fant at disse CFSE-merkede, CMV pp65-spesifikke T-cellene ble kostimulert effektivt av autologe Pz1⁺CD80⁺4-1BBL⁺-tilskuer-T-lymfocytter (figur 5b,c). Fysisk kontakt mellom de to T-cellepopulasjonene var en forutsetning for at de CMV-reaktive cytotoksiske T-lymfocytene skulle ekspandere, siden de var skilt fra hverandre av en
 15 Transwell-membran som i høy grad reduserte den sterke GRB-utløsningen og den robuste T-celleekspansjonen i pp65-responderceller, noe som er forenlig med en cellekontaktavhengig mekanisme (figur 5d).

Eksempel 6

20

Trans-kostimulering av svulstinfiltrerende T-celler in vivo

På grunn av disse observasjonene ville vi undersøke om T-celleformidlet *trans*-kostimulering er operativ *in vivo*. Til dette formålet ble to av de ovennevnte dyremodellene kombinert: RM1-PSMA-svulstmodellen der svulstene er begrenset
 25 til lungene (Gade m.fl., Cancer Res. 65:9080–9088, 2005), og Raji-svulstmodellen, der svulstceller selektivt koloniserer beinmargen (Brentjens m.fl., Nat Med. 2003 mar;9(3):279–86). Alle musene ble behandlet med Pz1-omformede T-celler, som også uttrykte CBR-luc (figur 3). Så ble dyrene infusert med luciferasenegative Pz1⁺-T-celler, som enten uttrykte eller manglet CD80 og
 30 4-1BBL. Uttrykkingen av Gaussia-luciferase (Gau-Luc) i svulstcellene og av CBR-luc i Pz1⁺-T-cellene gjorde det mulig å bruke dobbelt bioluminescensfotografering for å følge både svulstprogresjonen og opphopingen av T-celler i tid og rom. Sammenliknbare vevsfordelinger og bioluminescenssignaler fra CBR-luc⁺-lymfocytter ble sett seks dager (dag 0) etter adoptiv overføring i alle
 35 behandlingsgruppene (figur 6a). På dag 2 var virkningen av Pz1⁺CD80⁺4-1BBL⁺-T-cellene på CBR-luc⁺Pz1⁺-T-cellene fortsatt moderat (median 1,2-foldig, i forhold til Pz1⁺-T-celler som tilskuer, p = 0,0947). Deretter sank CBR-luc-signalet hos mus

som hadde fått kontroll-Pz1⁺-T-celler (figur 6a). Derimot økte denne fotontellingen som ble registrert over brystområdet gjennomsnittlig til det 6,5-dobbelte hos mus som hadde fått Pz1⁺CD80⁺4-1BBL⁺-T-lymfocytter ($p = 0,0122$, figur 6a,b). Det er viktig at denne virkningen var selektiv for de PSMA-spesifikke T-cellene, siden

5 samtidig injiserte CBR-luc⁺19z1-omformede T-celler som infiltrerte de etablerte Raji-svulstene i begge lårbeina ikke økte bioluminescenssignalet fra brystet signifikant på noe tidspunkt (median 1,5-foldig økning på dag 4, $p = 0,0947$, figur 6a,b). Kollektivt tydet disse *in vitro*- og *in vivo*-dataene på at CD80⁺4-1BBL⁺-T-cellene økte T-celleresponsen lokalt ved at de skaffet *trans*-kostimulering.

10

Den konstitutive visningen av CD80 på T-lymfocytter fungerer som kostimulerende ligand for CD28, men kan også kobles til negative regulatorer for T-celleekspansjon, for eksempel CTLA-4 med høy affinitet (Hodi m.fl. Clin Cancer Res. 2007 sep 15;13:5238–42). For å gå utenom den terapeutisk lite ønskelige

15 egenhemmingen av T-cellene som formidles av CD80 uttrykt av T-cellene, ble T-lymfocytter omformet også med den kimære antigenreseptoren P28z (Maher m.fl. *Nature Biotechnology*, bd 20, jan 2002, s 70–75) og uttrykte 4-1BBL på T-celleoverflaten (figur 7). Den doble fusjonsreseptoren P28z inneholder både TCR- og CD28-signalgrupper. Signaliseringen gjennom P28z utløste ikke noen varig T-celleekspansjon, men samtidig uttrykking av 4-1BBL økte

20 prolifereringsresponsen markert til det mer en 10-dobbelte på dag 14. Men det synergistiske kostimulerende CD80-4-1BBL-signalet var fortsatt sterkest når begge fullengdeligandene ble uttrykt på overflaten av Pz1-omformede T-lymfocytter (omtrent dobbelt så høyt som for P28Z + 4-1BBL, figur 7). CD28-

25 signaler som ble videreført av et CD28-signalelement fusjonert til den kimære antigenreseptorkonstruksjonen kan derfor gi Pz1⁺4-1BBL⁺-T-lymfocytter forbedrede prolifereringsegenskaper, selv om denne T-celleprolifisering ikke er så robust som proliferering til Pz1⁺4-1BBL⁺CD80⁺-T-celler.

30

Et hovedmål med immunterapi mot kreft er å skaffe sikker og effektiv kostimulering til svulstreaktive T-lymfocytter. Med en genetisk tilnærming ble det demonstrert at T-cellene selv ga opphav til sterk kostimulering. Konstitutiv uttrykking av kostimulerende ligander i humane primære CMV-spesifikke celler og PSMA-spesifikke T-celler ikke bare kompenserte for fraværet av disse ligandene på

35 APC, men utløste også en proliferativ respons som var sterkere enn responsen fra konvensjonelle APC (figur 1). Gjennomgangen av et panel av kostimulerende ligander tydet på at CD80 og 4-1BBL ga den sterkeste T-celleaktivering under

forsøksforholdene våre og muliggjorde robust T-celleekspansjon etter ukentlig gjentatt antigenstimulering. CD80⁺4-1BBL⁺-T-celler viste overlegen proliferering, cytokinutskilling, overlevelse in vitro og ekspansjon og persistens in vivo, som førte til en 40 til 50 ganger så høy T-cellebiomasse en uker etter infusjon i

5 svulstbelastede mus som for PSMA-spesifikke T-celler uten omforming med CD80 og 4-1BBL (figur 3). Dyr som ble behandlet med PSMA-spesifikke T-celler uten CD80/4-1BBL-omforming bukket alle under for sykdommen, mens etablerte systemiske PC-3-svulster ble avvist effektivt hos flertallet av de behandlede musene når de samme T-cellene ble omformet til CD80⁺4-1BBL⁺ (figur 2). Disse

10 resultatene, som stammer fra en svært utfordrende svulstmodell, understreker den biologiske aktiviteten og bemerkelsesverdige virksamheten ved konstitutiv høy uttrykking av kostimulerende ligander i T-celler.

For å undersøke mekanismen bak denne styrkede responsen ble først den romlige

15 fordelingen av CD80 og 4-1BBL og reseptorene deres på T-celler undersøkt før og etter kobling til svulsten. Det er påvist at CD28 og 4-1BB hoper seg opp nær T-cellereseptoren i den sentrale supramolekylære aktiveringsklumpen i immunologiske synapser. Kostimulerende ligander uttrykt av APC, blant annet CD80, CD40L og CD70, polariseres til synapsen, noe som støtter antakelsen om at

20 den immunologiske synapsen utgjør et ordnet kontaktområde som legger til rette for kostimulerte ligand-reseptorinteraksjoner og forplanter dem. I samsvar med denne modellen polariserte T-cellekodet CD80 og 4-1BBL mot kontaktsonen mellom T-celler og LNCaP-svulstceller sammen med CD28 og 4-1BB (figur 4). De funksjonelle følgene av denne samlokaliseringen illustreres ved opphopingen av

25 GRB, som fraktes mot grensesjiktet mellom T-celle og APC langs mikrotubuler etter antigenkontakt i synapser som inneholder 4-1BB⁺4-1BBL⁺-fokus men ikke i T-celler som manglet 4-1BB (figur 4). Altså er den immunologiske synapsen tydeligvis velegnet for å orkestrere egenkostimulering.

30 Egenkostimuleringen ble påvist i en enkeltcelleanalyse der nyuttrykking av 4-1BB og 4-1BBL i nyomformede T-celler aktiverte NF-κB uten at det var mulig for en nabo-T-celle å bidra. NF-κB-uttrykkingen ble visualisert i sanntid etter at enkeltkloner var fysisk atskilt kort etter omformingen og flere timer før det kunne detekteres noen kostimulerende liganduttrykking (figur 4). Egenkostimulering kan

35 altså gjøre det mulig for T-lymfocytter å overstyre de dårlige kostimuleringsevnene til underoptimale APC, for eksempel svulstceller. Dessuten sikrer konstitutiv uttrykking av 4-1BBL på overflaten av T-celler kostimulering 'ved

behov' fordi det sikrer at liganden er klar for å koble seg til midlertidig oppregulerte reseptorer, som 4-1BB. Man kan spekulere på om den fysiske interaksjonen mellom 4-1BBL og reseptoren dens kan skje under den tidlige omorganiseringen av lipidflåtene eller mellom motsatte plasmamembranfolder midt i synapsen. Denne virkningen later til å være selvregulert siden CD80⁺4-1BBL⁺-T-celleekspansjonen ble gradvis svekket som respons på gjentatt antigeneksponering in vitro (figur 1). T-celleekspansjonen in vivo var også selvbegrensende (figur 3), noe som kan skyldes at svulsten elimineres slik at T-cellene mister antigenstimuleringen og kostimuleringssignaliseringen dempes.

10

Vi ønsker ikke å bindes av teori, men studiene våre støtter også transkostimulering som en mekanisme for å øke immuniteten gjennom høy uttrykking av CD80 og 4-1BBL i T-lymfocytter. Prolifererings- og effektorfunksjonene til T-celler i kontakt med APC-presentert antigen i fravær av CD80 eller 4-1BBL ble altså forsterket av samtidig dyrking av T-celler som viste begge ligandene in vitro eller samtidig administrering av dem in vivo. In vitro-blanding av cellene og Transwell-undersøkelser tydet på at celle til celle-kontakt var nødvendig for transkostimuleringen (figur 5), noe som stemmer overens med *trans*-virkningene som er rapportert for andre celletyper, som fibroblaster eller tilskuersvulstceller. Transkostimuleringen ble også framkalt in vivo, på organspesifikk måte, som illustrert hos mus som hadde to forskjellige svulster som fordelte seg til forskjellige seter (figur 6).

15

20

Transkostimulering formidlet av T-celler baner vei for spennende nye tilnærminger for behandling, siden kostimuleringen kan leveres til nabo-T-celler inne i mikromiljøet i svulsten. Denne egenskapen er spesielt verdifull siden dendrittske celler ofte ikke klarer å oppregulere kostimulerende ligander inne i mikromiljøet i svulsten. Løselige faktorer som interleukin-2 kan bidra til å hjelpe T-cellene, men avhengigheten av celle til celle-kontakt innskrenker trans-kostimuleringen effektivt til andre svulstinfiltrerende T-celler. Vi ønsker ikke å være bundet av teori, men virkningen av T-cellekonkurransen på hyppigheten av in vivo-trans-kostimulering i trans kan etter hvert gjøre immunresponsen mot svulster bredere ved at det rekrutterer en variert populasjon av endogene svulstinfiltrerende lymfocytter og dermed bidra til å hindre at svulstantigenet unnslipper.

25

30

35

Oppsummeringsvis ble det påvist at uttrykking av CD80 og 4-1BBL i humane T-lymfocytter er en biologisk effektiv måte å gå utenom mangelen på

konvensjonell APC-formidlet kostimulering på i mikromiljøet i svulsten. Denne tilnærmingen kan brukes på T-celler som aktiveres både gjennom en omformet antigenreseptor og gjennom de endogene T-cellereseptorene deres. T-celleformidlet kostimulering, enten den er egenstimulert, transstimulert eller
 5 begge, kan altså være nyttig ved et bredt utvalg av kreftformer og smittsomme sykdommer som behandles ved adoptiv T-celleterapi.

Utførelsesformer av oppfinnelsen

Det vil gå fram av den ovenstående beskrivelsen at oppfinnelsen som beskrives
 10 her kan varieres og modifiseres for å tilpasse den til forskjellige bruksområder og forhold. Slike utførelsesformer er også innenfor omfanget til patentkravene nedenfor.

Når det nevnes en liste over elementer i en definisjon av en variabel her,
 15 inkluderer det definisjoner av denne variabelen som et hvilket som helst enkeltelement eller enhver kombinasjon (eller underkombinasjon) av de nevnte elementene. Når det nevnes en utførelsesform her, inkluderer det den utførelsesformen i form av en hvilken som helst enkelt utførelsesform eller i kombinasjon med enhver annen utførelsesform eller deler av dem.

20

Oppfinnelsen kan også karakteriseres ved ethvert av de følgende punktene:

1. En immunresponderende celle som omfatter en reseptor som binder et antigen og en eksogen kostimulerende ligand.
 25
2. Framgangsmåten ifølge punkt 1, der den kostimulerende liganden uttrykkes konstitutivt eller induktivt.
3. Framgangsmåten ifølge punkt 1, der minst to kostimulerende ligander
 30 uttrykkes konstitutivt.
4. Den immunresponderende cellen ifølge punkt 1 som er valgt fra gruppen som består av en T-celle, en naturlig drepercelle (NK-celle), en cytotoksisk T-lymfocytt (CTL) og en regulatorisk T-celle.
 35
5. Den immunresponderende cellen ifølge punkt 1, der antigenet er et svulst- eller patogenantigen.

6. Den immunresponderende cellen ifølge punkt 3, der antigenet er valgt fra gruppen som består av prostataspesifikt membranantigen (PSMA), karsinoembryonalt antigen (CEA), IL13Ralpha, her-2, CD19, NY-ESO-I, HIV-I, Gag, Lewis Y, Mart-1, gp100, tyrosinase, WT-I, hTERT og mesotelin.
7. Den immunresponderende cellen ifølge punkt 1, idet cellen uttrykker en rekombinant eller endogen antigenreseptor som er PzI eller P28z.
8. Den immunresponderende cellen ifølge punkt 1, der den kostimulerende liganden er en svulstnekrosefaktorligand (TNF-ligand) eller immunoglobulinsuperfamilieligand (Ig).
9. Den immunresponderende cellen ifølge punkt 8, der TNF-liganden er valgt fra gruppen som består av 4-1BBL, OX40L, CD70, LIGHT og CD30L.
10. Den immunresponderende cellen ifølge punkt 8, der Ig-superfamilieliganden er valgt fra gruppen som består av CD80 og CD 86.
11. Den immunresponderende cellen ifølge ett av punktene 1–10, der den immunresponderende cellen uttrykker en TNF-ligand og en Ig-superfamilieligand.
12. Den immunresponderende cellen ifølge punkt 11, der TNF-liganden er 4-1BBL og Ig-superfamilieliganden er CD80.
13. Den immunresponderende cellen ifølge ett av punktene 1–12, der en endogen eller rekombinant antigenreseptor eller et endogent eller rekombinant antigenpresenterende kompleks uttrykkes konstitutivt på overflaten av T-cellen.
14. Cellen ifølge ett av punktene 1–12, der de kostimulerende ligandene uttrykkes konstitutivt på overflaten av T-cellen.
15. Den immunresponderende cellen ifølge ett av punktene 1–12, der den kostimulerende liganden uttrykkes i en retrovirusvektor.
16. En virusspesifikk T-celle som uttrykker en vektor som koder for et polypeptid valgt fra gruppen som består av CD80, 4-1BBL, OX40L, CD70 og CD30L.

17. Den virusspesifikke T-cellen ifølge punkt 16 som gjenkjenner antigener fra et virus valgt fra gruppen som består av cytomegalovirus (CMV), Epstein Barr-virus (EBV), humant immunsviktvirus (HIV) og influensavirus.
- 5
18. En svulstantigenspesifikk T-celle som uttrykker en vektor som koder for et polypeptid valgt fra gruppen som består av CD80, 4-1BBL, OX40L, CD70 og CD30L.
19. Den svulstantigenspesifikke T-cellen ifølge punkt 15, der cellen uttrykker CD80 og 4-1BBL.
- 10
20. Den svulstantigenspesifikke T-cellen ifølge punkt 15, der vektoren er en retrovirusvektor.
21. En framgangsmåte for å modulere immunresponsen hos et individ, som omfatter å gi en effektiv mengde av en immunresponderende celle ifølge noen av punktene 1–17.
- 15
22. Framgangsmåten ifølge punkt 21, som øker eller reduserer en immunrespons.
- 20
23. Framgangsmåten ifølge punkt 21, som øker selvtoleransen eller øker toleransen for et transplantert organ.
24. En framgangsmåte for å behandle eller forebygge neoplasia hos en pasient, som omfatter å gi en effektiv mengde av en immunresponderende celle som omfatter en reseptor som binder et antigen og en vektor som koder for en kostimulerende ligand.
- 25
25. Framgangsmåten ifølge punkt 18, der neoplasien er valgt fra gruppen som består av prostatakreft, tykktarmskreft, brystkreft og glioblastom.
- 30
26. Framgangsmåten ifølge punkt 18, der svulstantigenet er prostataspesifikt membranantigen, CD19, NY-ESO-1, WT-1, hTERT eller mesotelin.
- 35
27. En framgangsmåte for å tvinge fram toleranse hos en pasient som omfatter å gi en effektiv mengde av en immunresponderende celle som

omfatter en reseptor som binder et antigen og en vektor som koder for en kostimulerende ligand.

28. Framgangsmåten ifølge punkt 27 som hindrer eller svekker en
5 autoimmunsykdom eller en sykdom som er forbundet med allogen transplantering.

29. En framgangsmåte for å behandle eller forebygge neoplasia hos en
pasient, som omfatter å gi en effektiv mengde av en immunresponderende
celle som omfatter en reseptor som binder et virusantigen og en vektor som
10 koder for en kostimulerende ligand.

30. Framgangsmåten ifølge punkt 29, der patogenet er et virus, en bakterie,
en sopp, en protozo eller en parasitt.

15 31. Framgangsmåten ifølge punkt 29, der viruset er valgt fra gruppen som
består av cytomegalovirus (CMV), Epstein Barr-virus (EBV), humant
immunsviktivirus (HIV) og influensavirus.

32. Framgangsmåten ifølge ett av punktene 21–30, der cellen er en T-celle,
20 en naturlig drepercelle (NK-celle) eller en cytotoksisk T-lymfocyt (CTL), enten
den er tatt fra en autolog eller allogen donor eller dannet in vitro av en
modifisert forløper eller stamcelle.

33. Framgangsmåten ifølge ett av punktene 21–30, der cellen uttrykker en
25 rekombinant eller endogen reseptor for antigenet.

34. Framgangsmåten ifølge ett av punktene 21–30, der den kostimulerende
liganden er en svulstnekrosefaktorligand (TNF-ligand) eller
immunoglobulinsuperfamilieligand (Ig).
30

35. Framgangsmåten ifølge ett av punktene 21–31, der TNF-liganden er
valgt fra gruppen som består av 4-1BBL, OX40L, CD70, LIGHT og CD30L.

36. Framgangsmåten ifølge ett av punktene 21–31, der Ig-
35 superfamilieliganden er valgt fra gruppen som består av CD80 og CD86.

37. Framgangsmåten ifølge ett av punktene 21–31, der den immunresponderende cellen uttrykker en TNF-ligand og en Ig-superfamilieligand.
38. Framgangsmåten ifølge ett av punktene 21–31, der TNF-liganden er 4-
5 1BBL og Ig-superfamilieliganden er CD80.
39. Framgangsmåten ifølge ett av punktene 21–31, der en rekombinant eller endogen antigenreseptor eller et antigenpresenterende kompleks uttrykkes konstitutivt på overflaten av T-cellen.
10
40. Framgangsmåten ifølge ett av punktene 21–31, der de kostimulerende ligandene uttrykkes konstitutivt på overflaten av T-cellen.
41. Framgangsmåten ifølge ett av punktene 21–31, der vektoren er en
15 retrovirusvektor.
42. En framgangsmåte for å produsere en antigenspesifikk immunresponderende celle som omfatter å innføre en nukleinsyresekvens som koder for en kimær antigenreseptor i den immunresponderende cellen, idet den
20 kimære antigenreseptoren omfatter et antigenbindende domene bundet til et intracellulært signaliseringsdomene som aktiverer en immunresponderende celle.
43. Framgangsmåten ifølge punkt 42, der den immunresponderende cellen er en T-celle, en CTL eller en NK-celle.
25
44. Framgangsmåten ifølge punkt 42, der det antigenbindende domenet er et svulstantigenbindende domene.
45. Framgangsmåten ifølge punkt 42, der svulstantigenet er
30 prostataspesifikt membranantigen (PSMA).
46. Framgangsmåten ifølge punkt 42, der det intracellulære signaldomenet aktiverer en T-celle, en CTL-celle eller en NK-celle.
- 35 47. Framgangsmåten ifølge punkt 42, der det intracellulære signaldomenet er [zeta]-kjedesignaldomenet.

48. Framgangsmåten ifølge punkt 42, der det ene kostimulerende signalet fås gjennom en modifisert antigenreseptor og det andre ved å overuttrykke en kostimulerende ligand.

5 49. En framgangsmåte for å behandle en neoplasi hos en pasient med behov for det, som omfatter å gi pasienten en terapeutisk effektiv mengde av en T-celle som omfatter et tumorantigen og et antigenpresenterende kompleks som omfatter minst to kostimulerende ligander idet minst en av de to kostimulerende ligandene velges fra gruppen som består av: en tumornekrosefaktorligand (TNF-ligand) og
10 en immunoglobulinsuperfamilieligand (Ig) og kombinasjoner av disse, og dermed behandle kreften til pasienten.

50. En framgangsmåte for å behandle en neoplasi hos en pasient, som omfatter å gi pasienten en terapeutisk effektiv mengde av en naturlig drepercelle (NK-celle)
15 som omfatter et tumorantigen og et antigenpresenterende kompleks som omfatter minst to kostimulerende ligander idet minst en av de to kostimulerende ligandene velges fra gruppen som består av: en tumornekrosefaktorligand (TNF-ligand) og en immunoglobulinsuperfamilieligand (Ig) og kombinasjoner av disse, og dermed behandle kreften til pasienten.

20 51. Framgangsmåten ifølge punkt 48–50, der TNF-liganden er valgt fra gruppen som består av: 4-1BBL, OX40L, CD70 og CD30L, og LIGHT.

52. Framgangsmåten ifølge punkt 48–50, der Ig-superfamilieliganden er
25 valgt fra gruppen som består av: CD80 og CD86.

53. Framgangsmåten ifølge punkt 48–50, der de minst to kostimulerende ligandene er en TNF-ligand og en Ig-superfamilieligand.

30 54. Framgangsmåten ifølge punkt 52, der TNF-liganden er 4-1BBL og Ig-superfamilieliganden er CD80.

55. Framgangsmåten ifølge punkt 48–50, der det antigengjenkjennende komplekset uttrykkes konstitutivt på celleoverflaten.

35 56. Framgangsmåten ifølge punkt 48–50, der svulstantigenet er prostataspesifikt membranantigen (PSMA).

57. Framgangsmåten ifølge punkt 48–50, der de kostimulerende ligandene uttrykkes konstitutivt på celleoverflaten.

5 58. En framgangsmåte for å behandle en infeksjonssykdom hos en pasient med behov for det, som omfatter å gi pasienten en terapeutisk effektiv mengde av en T-celle som omfatter en reseptor spesifikk for et virusantigen og et antigenpresenterende kompleks som omfatter minst to kostimulerende ligander idet
10 minst en av de to kostimulerende ligandene velges fra gruppen som består av: en tumornekrosefaktorligand (TNF-ligand) og en immunoglobulinsuperfamilieligand (Ig) og kombinasjoner av disse, og dermed behandle kreften til pasienten.

59. En framgangsmåte for å behandle en infeksjonssykdom hos en pasient som omfatter å gi pasienten en terapeutisk effektiv mengde av en naturlig drepercelle
15 (NK-celle) som omfatter en reseptor spesifikk for et virusantigen og et antigenpresenterende kompleks som omfatter minst to kostimulerende ligander der minst en av de to kostimulerende ligandene velges fra gruppen som består av: en tumornekrosefaktorligand (TNF-ligand) og en immunoglobulinsuperfamilieligand (Ig) og kombinasjoner av disse, og dermed behandle kreften til pasienten.

20 60. Framgangsmåten ifølge punkt 58 eller 59, der pasienten er en immunkompromittert pasient.

61. Framgangsmåten ifølge punkt 57 eller 58, der TNF-liganden er valgt fra
25 gruppen som består av: 4-1BBL, OX40L, CD70, LIGHT og CD30L.

62. Framgangsmåten ifølge punkt 57 eller 58, der Ig-superfamilieliganden er valgt fra gruppen som består av: CD80 og CD86.

30 63. Framgangsmåten ifølge punkt 57 eller 58, der de minst to kostimulerende ligandene er en TNF-ligand og en Ig-superfamilieligand.

64. Framgangsmåten ifølge punkt 57 eller 58, der TNF-liganden er 4-1BBL og Ig-superfamilieliganden er CD80.

35 65. Framgangsmåten ifølge punkt 57 eller 58, der det antigengjenkjennende komplekset uttrykkes konstitutivt på celleoverflaten.

66. Framgangsmåten ifølge punkt 57 eller 58, der virusantigenet er spesifikt for cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr-virus (EBV), human immunsvikt-virus (HIV) eller influensavirus.

5

67. Framgangsmåten ifølge punkt 57 eller 58, der de minst to kostimulerende ligandene uttrykkes konstitutivt på celleoverflaten.

68. En farmasøytisk sammensetning som omfatter en effektiv mengde av en immunresponderende celle ifølge ett av punkt 1–20 i et farmasøytisk aksepterbart hjelpestoff.

69. En farmasøytisk sammensetning for behandling av en neoplasi, som omfatter en effektiv mengde av en svulstantigenspesifikk T-celle ifølge ett av punktene 15–17 i et farmasøytisk aksepterbart hjelpestoff.

70. En farmasøytisk sammensetning for behandling av en patogeninfeksjon, som omfatter en effektiv mengde av en svulstantigenspesifikk T-celle ifølge punkt 14 i et farmasøytisk aksepterbart hjelpestoff.

20

71. Den farmasøytiske sammensetningen ifølge ett av punktene 67–69, som også omfatter et cytokin valgt fra gruppen som består av IL-2, IL-3, IL-6, IL-11, IL12, IL7, IL15, IL21, granulocytmakrofagkolonistimulerende faktor, alfa-, beta- eller gammainterferon og erythropoetin.

25

72. Et sett for behandling av en neoplasi, patogeninfeksjon, autoimmunsykdom eller et allogent transplantat, som omfatter en immunresponderende celle som omfatter en reseptor som binder et antigen og en eksogen kostimulerende ligand.

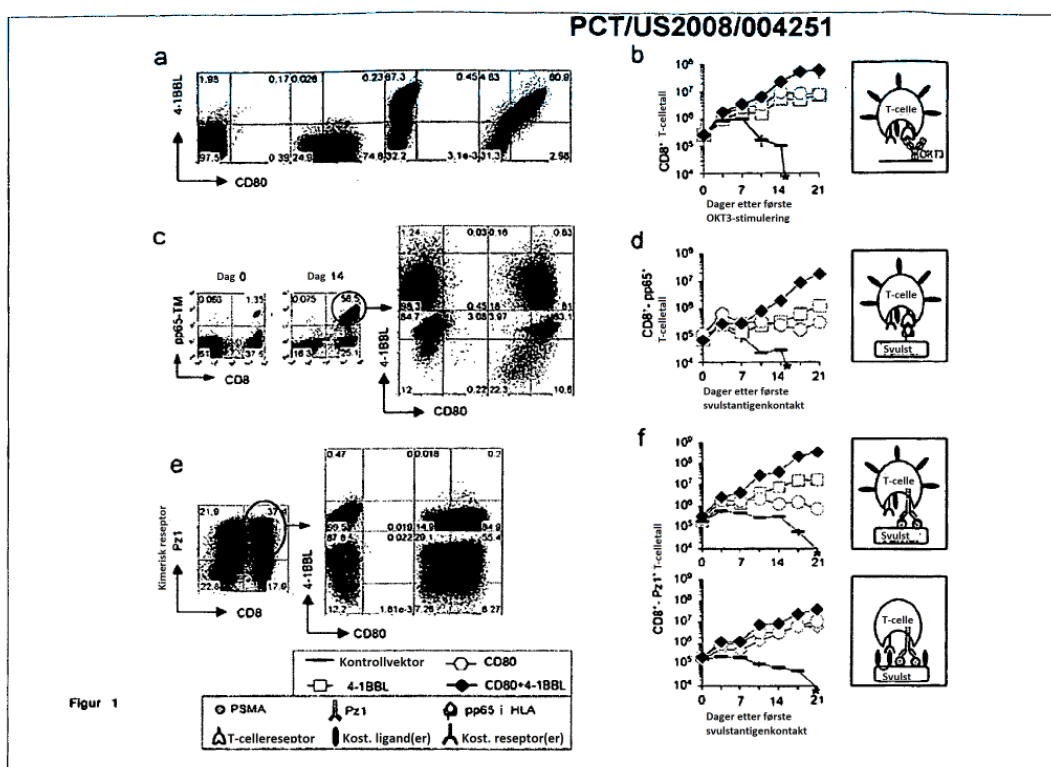
73. Settet ifølge punkt 71, som også omfatter skriftlige instruksjoner om bruk av denne cellen til å behandle en pasient med neoplasi, en patogeninfeksjon, en autoimmunsykdom eller et allogent transplantat.

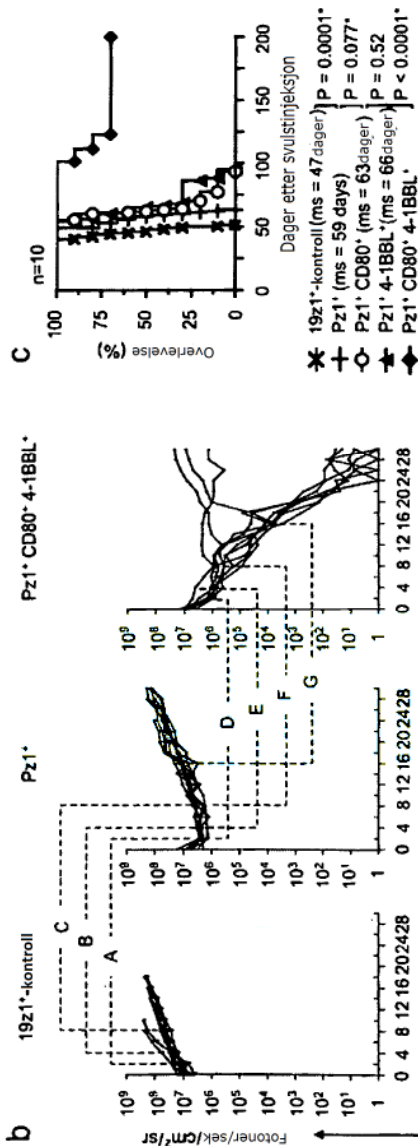
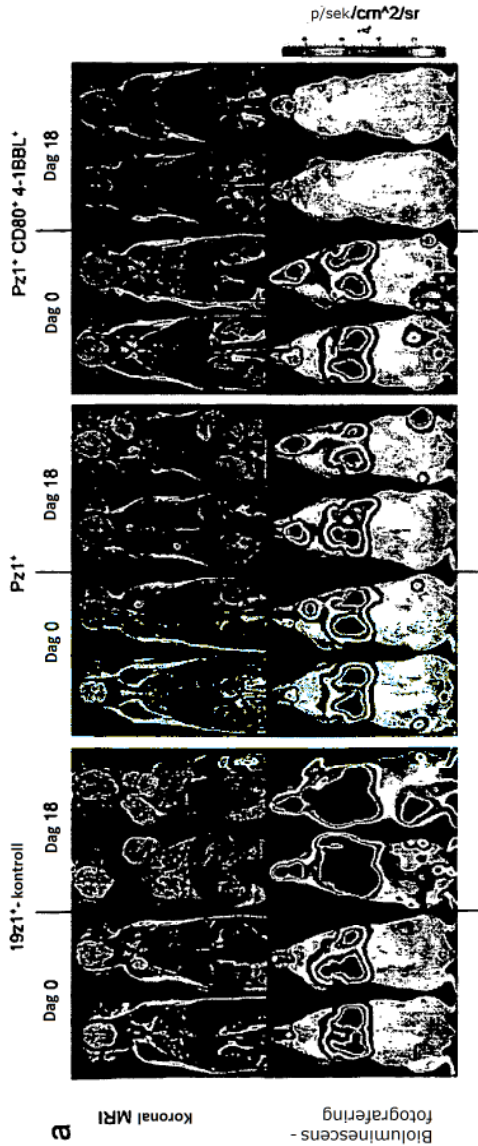
74. Framgangsmåten ifølge ett av punktene 21–67, som også omfatter trinnet å frambringe den immunresponderende cellen eller den kostimulerende liganden ved immunrespons.

35

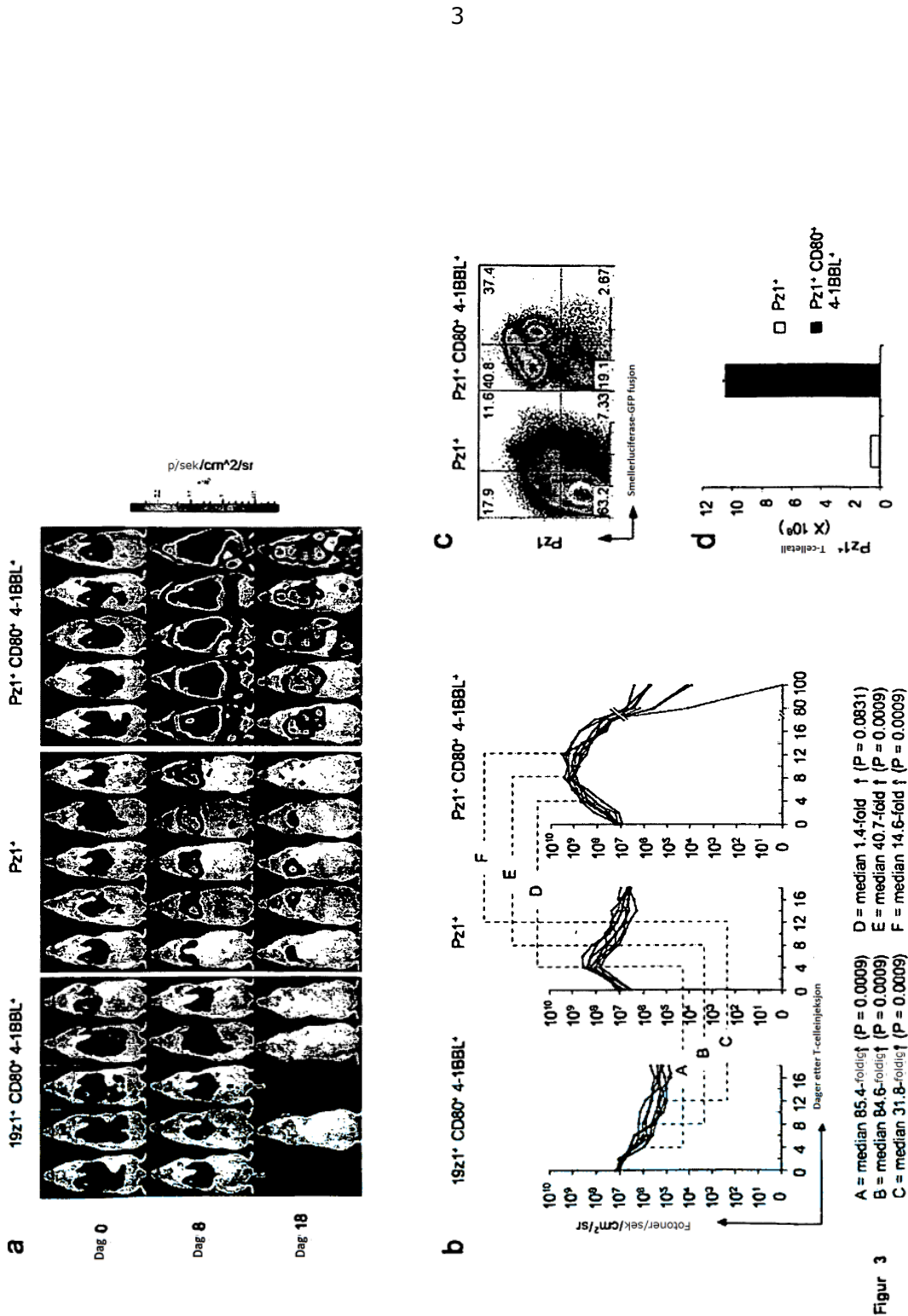
PATENTKRAV

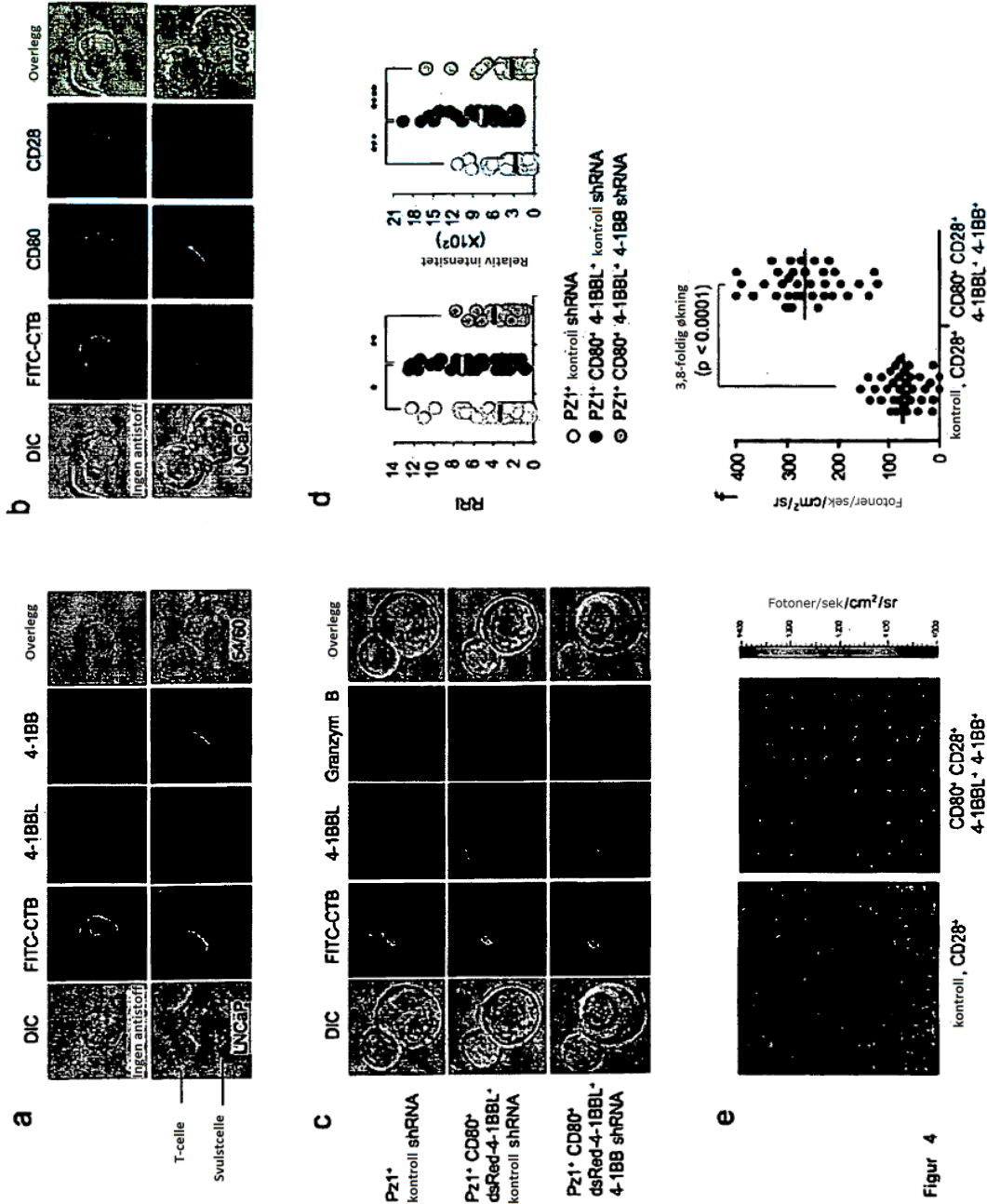
1. T-celle som omfatter en reseptor som binder et tumorantigen, og
eksogene kostimulerende ligander 4-1BBL og CD80 til bruk ved behandling
5 eller forebygging av en neoplasi hos en pasient.
2. T-cellen ifølge krav 1, der neoplasien er valgt fra gruppen som består av
prostatakraft, tykktarmskreft, brystkreft og glioblastom.
- 10 3. T-cellen ifølge krav 1, der svulstantigenet er prostataspesifikt
membranantigen, CD19, NY-ESO-1, WT-1, hTERT eller mesotelin.
4. Farmasøytisk sammensetning til bruk ved behandling av en neoplasi,
som omfatter en effektiv mengde av en svulstantigenspesifikk T-celle som
15 omfatter en reseptor som binder et svulstantigen, og kostimulerende ligander
4-1BBL og CD80 i et farmasøytisk aksepterbart hjelpestoff.
5. Den farmasøytiske sammensetningen til bruk ifølge krav 4, som også
omfatter et cytokin valgt fra gruppen som består av IL-2, IL-3, IL-6, IL-11,
20 IL12, IL7, IL15, IL21, granulocyttnakrofagkolonistimulerende faktor, alfa-,
beta- eller gammainterferon og erythropoetin.

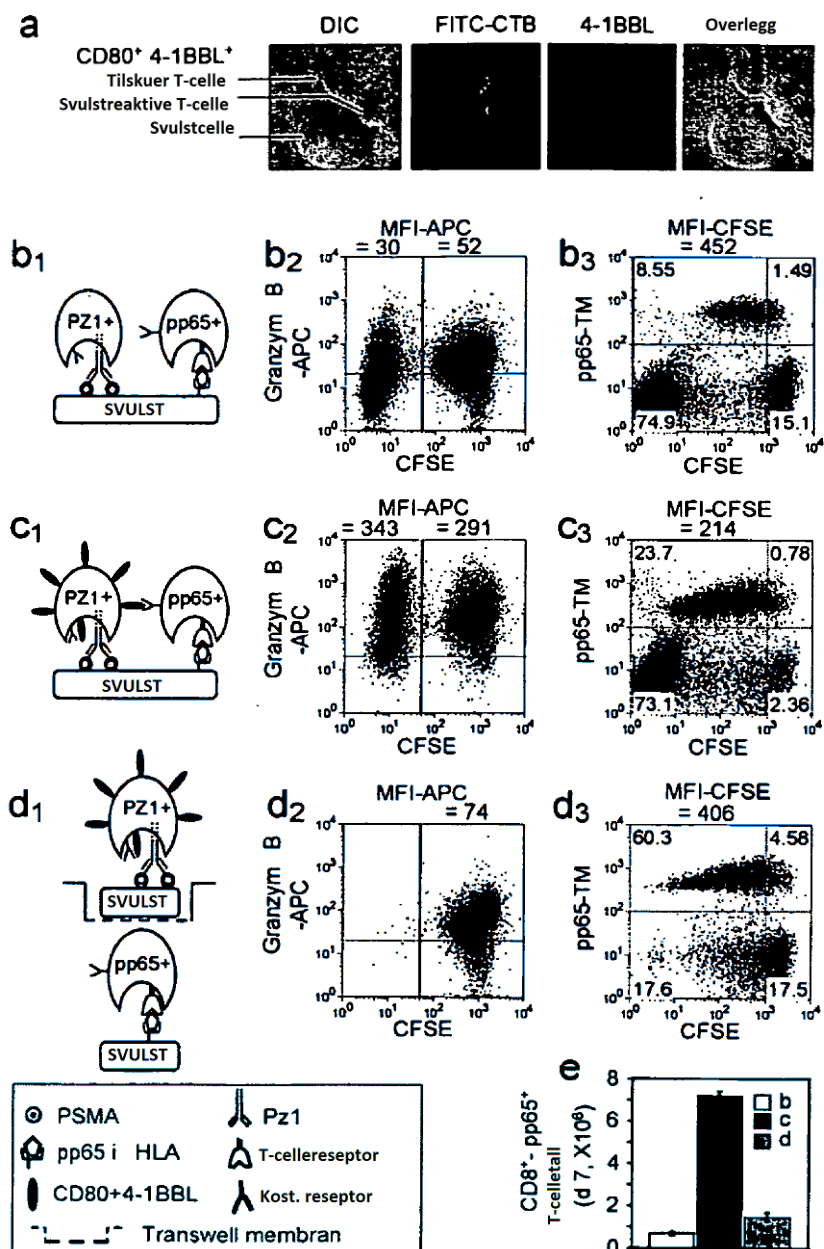




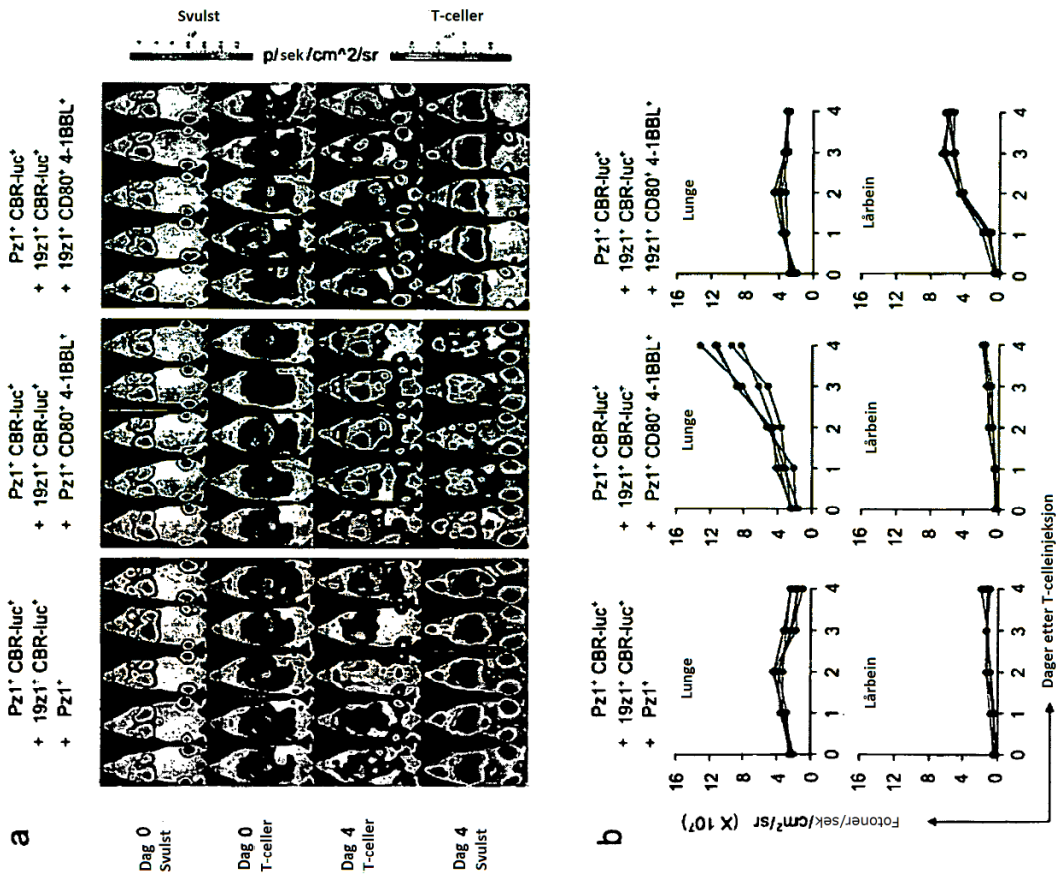
Figur 2



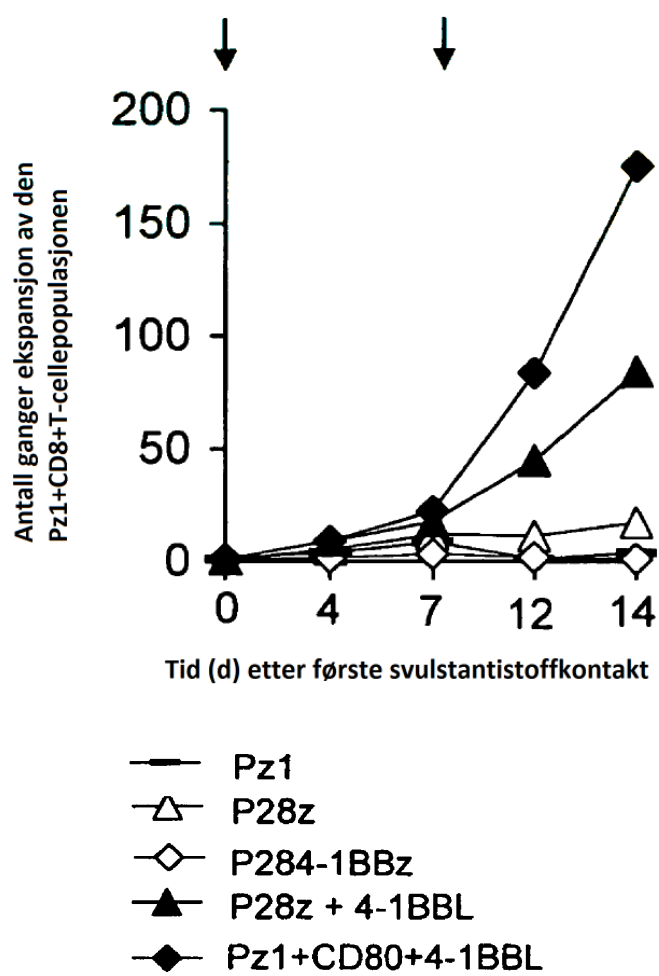




Figur 5



Figur 6



Figur 7




[PubMed](#)
[Nucleotide](#)
[Protein](#)
[Genome](#)
[Structure](#)
[PMC](#)
[Taxonomy](#)
[OMIM](#)
[Books](#)

Search for

[Limits](#)
[Preview/Index](#)
[History](#)
[Clipboard](#)
[Details](#)

Display [GenPept](#)

Range: from to Features: ☒ CDD

☐ 1: [NP_005182](#). Reports CD80 antigen prec...[gi:4885123]

[BLink](#), [Conserved Domains](#), [Links](#)

[Comment](#)
[Features](#)
[Sequence](#)

LOCUS NP_005182 288 aa linear PRI 24-FEB-2008
 DEFINITION CD80 antigen precursor [Homo sapiens].
 ACCESSION NP_005182
 VERSION NP_005182.1 GI:4885123
 DBSOURCE REFSEQ: accession [NM_005191.3](#)
 KEYWORDS .
 SOURCE Homo sapiens (human)
 ORGANISM [Homo sapiens](#)
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
 Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (residues 1 to 288)
 AUTHORS Nolan,A., Weiden,M., Kelly,A., Hoshino,Y., Hoshino,S., Mehta,N. and Gold,J.A.
 TITLE CD40 and CD80/86 act synergistically to regulate inflammation and mortality in polymicrobial sepsis
 JOURNAL Am. J. Respir. Crit. Care Med. 177 (3), 301-308 (2008)
 PUBMED [17989345](#)
 REMARK GeneRIF: CD80 expression was up-regulated on the circulating monocytes in septic subjects on Day 1

REFERENCE 2 (residues 1 to 288)
 AUTHORS Stephan,M.T., Ponomarev,V., Brentjens,R.J., Chang,A.H., Dobrenkov,K.V., Heller,G. and Sadelain,M.
 TITLE T cell-encoded CD80 and 4-1BBL induce auto- and transcostimulation, resulting in potent tumor rejection
 JOURNAL Nat. Med. 13 (12), 1440-1449 (2007)
 PUBMED [18026115](#)
 REMARK GeneRIF: CD80 and 4-1BBL induce auto- and transcostimulation in tumor cells

REFERENCE 3 (residues 1 to 288)
 AUTHORS Habib-Agahi,M., Phan,T.T. and Searle,P.F.
 TITLE Co-stimulation with 4-1BB ligand allows extended T-cell proliferation, synergizes with CD80/CD86 and can reactivate anergic T cells
 JOURNAL Int. Immunol. 19 (12), 1383-1394 (2007)
 PUBMED [17977894](#)
 REMARK GeneRIF: T cells that had become non-responsive to anti-CD3 could be reactivated to proliferate when costimulated with 4-1BBL, either alone or combined with CD80/CD86.

REFERENCE 4 (residues 1 to 288)
 AUTHORS Kakoulidou,M., Giscombe,R., Zhao,X., Lefvert,A.K. and Wang,X.
 TITLE Human Soluble CD80 is generated by alternative splicing, and

Figur 8 (forts.)

recombinant soluble CD80 binds to CD28 and CD152 influencing T-cell activation
 JOURNAL Scand. J. Immunol. 66 (5), 529-537 (2007)
 PUBMED [17953528](#)
 REMARK GenerIF: sCD80 in human serum adds a new member to the family of soluble receptors, implying a network of soluble costimulatory factors with functional relevance

REFERENCE 5 (residues 1 to 288)
 AUTHORS Dopheide,J.F., Sester,U., Schlitt,A., Horstick,G., Rupprecht,H.J., Munzel,T. and Blankenberg,S.
 TITLE Monocyte-derived dendritic cells of patients with coronary artery disease show an increased expression of costimulatory molecules CD40, CD80 and CD86 in vitro
 JOURNAL Coron. Artery Dis. 18 (7), 523-531 (2007)
 PUBMED [17925605](#)
 REMARK GenerIF: CD40, CD80 and CD86 are upregulated in cultured monocyte-derived dendritic cells of patients with coronary artery disease

REFERENCE 6 (residues 1 to 288)
 AUTHORS Weiskirchen,R., Pino,J.D., Macalma,T., Bister,K. and Beckerle,M.C.
 TITLE The cysteine-rich protein family of highly related LIM domain proteins
 JOURNAL J. Biol. Chem. 270 (48), 28946-28954 (1995)
 PUBMED [7499425](#)

REFERENCE 7 (residues 1 to 288)
 AUTHORS Freeman,G.J., Distech,C.M., Gribben,J.G., Adler,D.A., Freedman,A.S., Dougery,J. and Nadler,L.M.
 TITLE The gene for B7, a costimulatory signal for T-cell activation, maps to chromosomal region 3q13.3-3q21
 JOURNAL Blood 79 (2), 489-494 (1992)
 PUBMED [1370389](#)

REFERENCE 8 (residues 1 to 288)
 AUTHORS Selvakumar,A., Mohanraj,B.K., Eddy,R.L., Shows,T.B., White,P.C. and Dupont,B.
 TITLE Genomic organization and chromosomal location of the human gene encoding the B-lymphocyte activation antigen B7
 JOURNAL Immunogenetics 36 (3), 175-181 (1992)
 PUBMED [1377173](#)

REFERENCE 9 (residues 1 to 288)
 AUTHORS Freeman,G.J., Gray,G.S., Gimmi,C.D., Lombard,D.B., Zhou,L.J., White,M., Fingerroth,J.D., Gribben,J.G. and Nadler,L.M.
 TITLE Structure, expression, and T cell costimulatory activity of the murine homologue of the human B lymphocyte activation antigen B7
 JOURNAL J. Exp. Med. 174 (3), 625-631 (1991)
 PUBMED [1714935](#)

REFERENCE 10 (residues 1 to 288)
 AUTHORS Freeman,G.J., Freedman,A.S., Segil,J.M., Lee,G., Whitman,J.F. and Nadler,L.M.
 TITLE B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells
 JOURNAL J. Immunol. 143 (8), 2714-2722 (1989)
 PUBMED [2794510](#)

COMMENT VALIDATED [REFSEQ](#): This record has undergone validation or preliminary review. The reference sequence was derived from [BP225173.1](#), [BC042665.1](#) and [AC073352.22](#).

Summary: The B-lymphocyte activation antigen B7-1 (formerly referred to as B7) provides regulatory signals for T lymphocytes as a consequence of binding to the CD28 (MIM 186760) and CTLA4 (MIM 123890) ligands of T cells.[supplied by OMIM].

Figur 8 (forts.)

Publication Note: This RefSeq record includes a subset of the publications that are available for this gene. Please see the Entrez Gene record to access additional publications.

FEATURES

	Location/Qualifiers
source	1..288 /organism="Homo sapiens" /db_xref="taxon:9606" /chromosome="3" /map="3q13.3-q21"
<u>Protein</u>	1..288 /product="CD80 antigen precursor" /note="costimulatory molecule variant IgV-CD80; CD80 antigen (CD28 antigen ligand 1, B7-1 antigen); costimulatory factor CD80; B-lymphocyte activation antigen B7"
<u>sig_peptide</u>	1..34 /calculated_mol_wt=3754
<u>mat_peptide</u>	35..288 /product="CD80 antigen" /calculated_mol_wt=29312
<u>Region</u>	37..139 /region_name="IG" /note="Immunoglobulin; smart00409" /db_xref="CDD:47718"
<u>Region</u>	37..135 /region_name="V-set" /note="Immunoglobulin V-set domain. This domain is found in antibodies as well as neural protein P0 and CTL4 amongst others; pfam07686" /db_xref="CDD:87333"
<u>Region</u>	143..227 /region_name="C2-set_2" /note="CD80-like C2-set immunoglobulin domain. These domains belong to the immunoglobulin superfamily; pfam08205" /db_xref="CDD:71639"
<u>CDS</u>	1..288 /gene="CD80" /coded_by="NM_005191.3:396..1262" /db_xref="CCDS:CCDS2989.1" /db_xref="GeneID:941" /db_xref="HGNC:1700" /db_xref="HPRD:00202" /db_xref="MIM:112203"

ORIGIN

```

1  mghtrrqgts pskcpylnff qllvlaglsh fcsgvihvtk evkevatlsc ghnvsveela
61  qtirywqkek kmvltmmsgd mniwpeyknr tifditnnls ivilalrpsd egtyecvvlk
121 yekdafkreh laevtlsvka dfptpsisdf eiptsnirri icstsggfpe phlswlengi
181 elnainttvs qdpetelyav ssklfdnmtt nhsfmcliky ghrlrvnqtfn wnttkqehfp
241 dnllpswait lisvngifvi ccltycfapr crerrrnerl rresvrpv

```

//

Figur 8 (forts.)





[PubMed](#)
[Nucleotide](#)
[Protein](#)
[Genome](#)
[Structure](#)
[PMC](#)
[Taxonomy](#)
[OMIM](#)
[Books](#)

Search for

[Limits](#)
[Preview/Index](#)
[History](#)
[Clipboard](#)
[Details](#)

Display [GenPept](#)

Range: from to Features: ☒ CDD

☒ 1: [P41273](#). Reports Tumor necrosis fa...[gi:728739] BLink, Conserved Domains, Links

<u>Comment</u>	<u>Features</u>	<u>Sequence</u>
LOCUS	P41273	254 aa linear PRI 04-DEC-2007
DEFINITION	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 9 (4-1BB ligand) (4-1BBL).	
ACCESSION	P41273	
VERSION	P41273.1 GI:728739	
DBSOURCE	swissprot: locus TNFL9_HUMAN, accession P41273 ; class: standard. extra accessions: Q2M3S2 created: Feb 1, 1995. sequence updated: Feb 1, 1995. annotation updated: Dec 4, 2007. xrefs: U03398.1 , AAA53134.1 , BC104805.1 , AAI04806.1 , BC104807.1 , AAI04808.1 , I38427 xrefs (non-sequence databases): RefSeq: NP_003802.1 , UniGene: Hs.1524 , DIP: DIP:3020N , Ensembl: ENSG00000125657 , GeneID: 8744 , KEGG: hsa:8744 , H-InvDB: HIX0040144 , HGNC: 11939 , MIM: 606182 , PharmGKB: PA36629 , ArrayExpress: P41273 , CleanEx: HS_TNFSF9 , GermOnline: ENSG00000125657 , GO: 0005102 , GO: 0006915 , GO: 0008283 , GO: 0007267 , GO: 0007165 , InterPr Pfam: PF00229 , SMART: SM00207 , PROSITE: PS00251 , PROSITE: PS50049	
KEYWORDS	Cytokine; Membrane; Polymorphism; Signal-anchor; Transmembrane.	
SOURCE	Homo sapiens (human)	
ORGANISM	Homo sapiens	
REFERENCE	1 (residues 1 to 254)	
AUTHORS	Alderson, M.R., Smith, C.A., Tough, T.W., Davis-Smith, T., Armitage, R.J., Falk, B., Roux, E., Baker, E., Sutherland, G.R., Din, W.S. and Goodwin, R.G.	
TITLE	Molecular and biological characterization of human 4-1BB and its ligand	
JOURNAL	Eur. J. Immunol. 24 (9), 2219-2227 (1994)	
PUBMED	8088337	
REMARK	NUCLEOTIDE SEQUENCE [MRNA].	
REFERENCE	2 (residues 1 to 254)	
AUTHORS	Gerhard, D.S., Wagner, L., Feingold, E.A., Shenmen, C.M., Grouse, L.H., Schuler, G., Klein, S.L., Old, S., Rasooly, R., Good, P., Guyer, M., Peck, A.M., Derge, J.G., Lipman, D., Collins, F.S., Jang, W., Sherry, S., Feolo, M., Misquitta, L., Lee, E., Rotmistrovsky, K., Greenhut, S.F., Schaefer, C.F., Buetow, K., Bonner, T.I., Haussler, D., Kent, J., Kiekhaus, M., Furey, T., Brent, M., Prange, C., Schreiber, K.,	

Figur 8 (forts.)

Shapiro,N., Bhat,N.K., Hopkins,R.F., Hsie,F., Driscoll,T.,
 Soares,M.B., Casavant,T.L., Scheetz,T.E., Brown-stein,M.J.,
 Usdin,T.B., Toshiyuki,S., Carninci,P., Piao,Y., Dudekula,D.B.,
 Ko,M.S., Kawakami,K., Suzuki,Y., Sugano,S., Gruber,C.E.,
 Smith,M.R., Simmons,B., Moore,T., Waterman,R., Johnson,S.L.,
 Ruan,Y., Wei,C.L., Mathavan,S., Gunaratne,P.H., Wu,J., Garcia,A.M.,
 Hulyk,S.W., Fuh,E., Yuan,Y., Sneed,A., Kowis,C., Hodgson,A.,
 Muzny,D.M., McPherson,J., Gibbs,R.A., Fahey,J., Helton,E.,
 Kettelman,M., Madan,A., Rodrigues,S., Sanchez,A., Whiting,M.,
 Madari,A., Young,A.C., Wetherby,K.D., Granite,S.J., Kwong,P.N.,
 Brinkley,C.P., Pearson,R.L., Bouffard,G.G., Blakesly,R.W.,
 Green,E.D., Dickson,M.C., Rodriguez,A.C., Grimwood,J., Schmutz,J.,
 Myers,R.M., Butterfield,Y.S., Griffith,M., Griffith,O.L.,
 Krzywinski,M.I., Liao,N., Morin,R., Palmquist,D., Petrescu,A.S.,
 Skalska,U., Smailus,D.E., Stott,J.M., Schnerch,A., Schein,J.E.,
 Jones,S.J., Holt,R.A., Baross,A., Marra,M.A., Clifton,S.,
 Makowski,K.A., Bosak,S. and Malek,J.

CONSRTM MGC Project Team

TITLE The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA
 project: the Mammalian Gene Collection (MGC)

JOURNAL Genome Res. 14 (10B), 2121-2127 (2004)

PUBMED 15489334

REMARK NUCLEOTIDE SEQUENCE [LARGE SCALE MRNA].
 TISSUE=Lung
 Erratum:[Genome Res. 2006 Jun;16(6):804. Morrin, Ryan [corrected to
 Morin, Ryan]]

COMMENT On or before Feb 16, 2007 this sequence version replaced
 gi:121941506, gi:7512264.
 [FUNCTION] Cytokine that binds to TNFRSF9. Induces the
 proliferation of activated peripheral blood T-cells. May have a
 role in activation-induced cell death (AICD). May play a role in
 cognate interactions between T-cells and B-cells/macrophages.
 [SUBUNIT] Homotrimer (Potential).
 [SUBCELLULAR LOCATION] Membrane; Single-pass type II membrane
 protein.
 [TISSUE SPECIFICITY] Expressed in brain, placenta, lung, skeletal
 muscle and kidney.
 [SIMILARITY] Belongs to the tumor necrosis factor family.

FEATURES

source Location/Qualifiers

1..254

/organism="Homo sapiens"

/db_xref="taxon:9606"

gene 1..254

/gene="TNFSF9"

Protein 1..254

/gene="TNFSF9"

/product="Tumor necrosis factor ligand superfamily member
 9"

Region 1..254

/gene="TNFSF9"

/region_name="Mature chain"

/experiment="experimental evidence, no additional details
 recorded"

/note="Tumor necrosis factor ligand superfamily member 9.
 /FTId=PRO_0000185501."

Region 1..28

/gene="TNFSF9"

/region_name="Topological domain"

/inference="non-experimental evidence, no additional
 details recorded"

Figur 8 (forts.)

```

Region      /note="Cytoplasmic (Potential)."  
17  
/gene="TNFSF9"  
/region_name="Variant"  
/experiment="experimental evidence, no additional details  
recorded"  
Region      /note="P -> A (in dbSNP:rs442511). /FTId=VAR_011928."  
29..49  
/gene="TNFSF9"  
/region_name="Transmembrane region"  
/inference="non-experimental evidence, no additional  
details recorded"  
/note="Signal-anchor for type II membrane protein  
(Potential)."  
Region      35..41  
/gene="TNFSF9"  
/region_name="Compositionally biased region"  
/experiment="experimental evidence, no additional details  
recorded"  
/note="Poly-Leu."  
Region      50..254  
/gene="TNFSF9"  
/region_name="Topological domain"  
/inference="non-experimental evidence, no additional  
details recorded"  
/note="Extracellular (Potential)."  
Region      91..238  
/gene="TNFSF9"  
/region_name="TNF"  
/note="Tumor Necrosis Factor; TNF superfamily members  
include the cytokines: TNF (TNF-alpha), LT  
(lymphotoxin-alpha, TNF-beta), CD40 ligand, Apo2L (TRAIL),  
Fas ligand, and osteoprotegerin (OPG) ligand; cd00184"  
/db_xref="CDD:29146"  
Site        order(94,142,144,199,204,234,238)  
/gene="TNFSF9"  
/site_type="other"  
/note="trimer interface"  
/db_xref="CDD:29146"  
Site        order(110..111,116,162,169,176)  
/gene="TNFSF9"  
/site_type="other"  
/note="receptor binding sites"  
/db_xref="CDD:29146"  
ORIGIN  
1 meyasdasld peapwppapr aracrulpwa lvagl11111 laaacavfla cpwavsgara  
61 spgsaasprl regpelspdd paglldlrqg mfaqlvaqnv lli dgplswy sdp glagvsl  
121 tgglsykedt kelvvakagv yyvffqler rvvagegsgs vslalhlqpl rsaagaaala  
181 ltvd1ppass earnsafgfg grllhlsagq rlgvhlhtea rarhawqltq gatvlg1frv  
241 tpeipag1ps prse  
//

```

Figur 8 (forts.)



[My NCBI](#) [Sign In](#) [Register](#)

[PubMed](#) [Nucleotide](#) [Protein](#) [Genome](#) [Structure](#) [PMC](#) [Taxonomy](#) [OMIM](#) [Books](#)

Search for

[Limits](#) [Preview/Index](#) [History](#) [Clipboard](#) [Details](#)

Display [GenPept](#)

Range: from to Features:

☒ 1: [BAB18304](#). Reports OX40 ligand [Homo...[gi:11275538] [BLink](#), [Links](#)

[Features](#) [Sequence](#)

LOCUS BAB18304 67 aa linear PRI 19-OCT-2004
 DEFINITION OX40 ligand [Homo sapiens].
 ACCESSION BAB18304
 VERSION BAB18304.1 GI:11275538
 DBSOURCE accession [AB042988.2](#)
 KEYWORDS
 SOURCE Homo sapiens (human)
 ORGANISM [Homo sapiens](#)
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
 Catarrhini; Hominidae; Homo.
 REFERENCE 1
 AUTHORS Hikami,K., Tsuchiya,N. and Tokunaga,K.
 TITLE New variations in human OX40 ligand (CD134L) gene
 JOURNAL Genes Immun. 1 (8), 521-522 (2000)
 PUBMED [11197696](#)
 REFERENCE 2 (residues 1 to 67)
 AUTHORS Hikami,K., Tsuchiya,N. and Tokunaga,K.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (19-MAY-2000) Koki Hikami, University of Tokyo,
 Department of Human Genetics, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo
 113-0033, Japan (E-mail:kokihikami@mail.goo.ne.jp,
 Tel:81-3-5841-3693, Fax:81-3-5802-8619)
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..67
 /organism="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:9606"
 /chromosome="1"
 /map="1q25"
 Protein 1..67
 /product="OX40 ligand"
 CDS 1..67
 /gene="OX40L"
 /coded_by="join(AB042988.2:55..207,AB042988.2:462..>510)"
 ORIGIN
 1 mervqpleen vgnaarprfe rnklllvasv iqglglllcf tyiclhfsl qvshrypriq
 61 sikvqft
 //

Figur 8 (forts.)



 My Nt (Sign In) (Regis)

PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PMC Taxonomy OMIM Books

Search Protein for

Limits Preview/Index History Clipboard Details

Display GenPept

Range: from begin to end Features: ☒ CDD

1: [NP_001243](#). Reports tumor necrosis fa...[gi:4507605]

BLink, Conserved
Domains, Links

[Comment](#) [Features](#) [Sequence](#)

LOCUS NP_001243 193 aa linear PRI 11-FEB-2008
 DEFINITION tumor necrosis factor ligand superfamily, member 7 [Homo sapiens].
 ACCESSION NP_001243
 VERSION NP_001243.1 GI:4507605
 DBSOURCE REFSEQ: accession [NM_001252.3](#)
 KEYWORDS .
 SOURCE Homo sapiens (human)
 ORGANISM [Homo sapiens](#)
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
 Catarrhini; Hominidae; Homo.
 REFERENCE 1 (residues 1 to 193)
 AUTHORS Yang,Z.Z., Novak,A.J., Ziesmer,S.C., Witzig,T.E. and Ansell,S.M.
 TITLE CD70+ non-Hodgkin lymphoma B cells induce Foxp3 expression and
 regulatory function in intratumoral CD4+CD25 T cells
 JOURNAL Blood 110 (7), 2537-2544 (2007)
 PUBMED [17615291](#)
 REMARK GeneRIF: reveal a novel role for non-Hodgkin lymphoma B cells in
 the development of intratumoral regulatory T cells
 REFERENCE 2 (residues 1 to 193)
 AUTHORS van Oosterwijk,M.F., Juwana,H., Arens,R., Tesselaar,K., van
 Oers,M.H., Eldering,E. and van Lier,R.A.
 TITLE CD27-CD70 interactions sensitise naive CD4+ T cells for
 IL-12-induced Th1 cell development
 JOURNAL Int. Immunol. 19 (6), 713-718 (2007)
 PUBMED [17548342](#)
 REMARK GeneRIF: CD27-CD70 interactions may promote Th1 cell formation by
 permitting naive T cells to respond to differentiation signals and
 by promoting survival of activated effector T cells.
 REFERENCE 3 (residues 1 to 193)
 AUTHORS Diegmann,J., Junker,K., Loncarevic,I.F., Michel,S., Schimmel,B. and
 von Eggeling,F.
 TITLE Immune escape for renal cell carcinoma: CD70 mediates apoptosis in
 lymphocytes
 JOURNAL Neoplasia 8 (11), 933-938 (2006)
 PUBMED [17132225](#)
 REMARK GeneRIF: Apoptosis mediated by exposure to the CD70 secreted by
 tumor cells may contribute to the failure of renal cell carcinoma
 patients to develop an effective lymphocyte-mediated antitumor
 response
 REFERENCE 4 (residues 1 to 193)
 AUTHORS Adam,P.J., Terrett,J.A., Steers,G., Stockwin,L., Loader,J.A.,

Figur 8 (forts.)

Fletcher,G.C., Lu,L.S., Leach,B.I., Mason,S., Stamps,A.C.,
 Boyd,R.S., Pezzella,F., Gatter,K.C. and Harris,A.L.
 CD70 (TNFSF7) is expressed at high prevalence in renal cell
 carcinomas and is rapidly internalised on antibody binding
 Br. J. Cancer 95 (3), 298-306 (2006)
 JOURNAL
 PUBMED 16892042
 REMARK GeneRIF: Immunocytochemical analysis demonstrated that binding of
 an anti-CD70 antibody to CD70(TNFSF7), endogenously expressed on
 the surface of A498 and 786-O cell lines resulted in the rapid
 internalisation of the antibody-receptor complex.
 REFERENCE 5 (residues 1 to 193)
 AUTHORS Huang,J., Kerstann,K.W., Ahmadzadeh,M., Li,Y.F., El-Gamil,M.,
 Rosenberg,S.A. and Robbins,P.F.
 TITLE Modulation by IL-2 of CD70 and CD27 expression on CD8+ T cells:
 importance for the therapeutic effectiveness of cell transfer
 immunotherapy
 JOURNAL J. Immunol. 176 (12), 7726-7735 (2006)
 PUBMED 16751420
 REMARK GeneRIF: Interaction of CD70 with CD27 plays a direct role in T
 cell activation mediated by IL-2.
 REFERENCE 6 (residues 1 to 193)
 AUTHORS Kobata,T., Jacquot,S., Kozlowski,S., Agematsu,K., Schlossman,S.F.
 and Morimoto,C.
 TITLE CD27-CD70 interactions regulate B-cell activation by T cells
 JOURNAL Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92 (24), 11249-11253 (1995)
 PUBMED 7479974
 REFERENCE 7 (residues 1 to 193)
 AUTHORS Brown,G.R., Meek,K., Nishioka,Y. and Thiele,D.L.
 TITLE CD27-CD27 ligand/CD70 interactions enhance alloantigen-induced
 proliferation and cytolytic activity in CD8+ T lymphocytes
 JOURNAL J. Immunol. 154 (8), 3686-3695 (1995)
 PUBMED 7706711
 REFERENCE 8 (residues 1 to 193)
 AUTHORS Hintzen,R.Q., Lens,S.M., Koopman,G., Pals,S.T., Spits,H. and van
 Lier,R.A.
 TITLE CD70 represents the human ligand for CD27
 JOURNAL Int. Immunol. 6 (3), 477-480 (1994)
 PUBMED 8186199
 REFERENCE 9 (residues 1 to 193)
 AUTHORS Hintzen,R.Q., Lens,S.M., Beckmann,M.P., Goodwin,R.G., Lynch,D. and
 van Lier,R.A.
 TITLE Characterization of the human CD27 ligand, a novel member of the
 TNF gene family
 JOURNAL J. Immunol. 152 (4), 1762-1773 (1994)
 PUBMED 8120385
 REFERENCE 10 (residues 1 to 193)
 AUTHORS Bowman,M.R., Crimmins,M.A., Yetz-Aldape,J., Kriz,R., Kelleher,K.
 and Herrmann,S.
 TITLE The cloning of CD70 and its identification as the ligand for CD27
 JOURNAL J. Immunol. 152 (4), 1756-1761 (1994)
 PUBMED 8120384
 COMMENT REVIEWED REFSEQ: This record has been curated by NCBI staff. The
 reference sequence was derived from AC008760.7.

Summary: The protein encoded by this gene is a cytokine that
 belongs to the tumor necrosis factor (TNF) ligand family. This
 cytokine is a ligand for TNFRSF27/CD27. It is a surface antigen on
 activated, but not on resting, T and B lymphocytes. It induces
 proliferation of costimulated T cells, enhances the generation of
 cytolytic T cells, and contributes to T cell activation. This

Figur 8 (forts.)

cytokine is also reported to play a role in regulating B-cell activation, cytotoxic function of natural killer cells, and immunoglobulin synthesis.

Publication Note: This RefSeq record includes a subset of the publications that are available for this gene. Please see the Entrez Gene record to access additional publications.

```

FEATURES              Location/Qualifiers
    source              1..193
                        /organism="Homo sapiens"
                        /db_xref="taxon:9606"
                        /chromosome="19"
                        /map="19p13"
    Protein            1..193
                        /product="tumor necrosis factor ligand superfamily, member
                        7"
                        /note="CD70 antigen; CD27 ligand; surface antigen CD70;
                        Ki-24 antigen; tumor necrosis factor (ligand) superfamily,
                        member 7"
                        /calculated_mol_wt=20987
    Region             58..189
                        /region_name="TNF"
                        /note="Tumor Necrosis Factor; TNF superfamily members
                        include the cytokines: TNF (TNF-alpha), LT
                        (lymphotoxin-alpha, TNF-beta), CD40 ligand, Apo2L (TRAIL),
                        Fas ligand, and osteoprotegerin (OPG) ligand; cd00184"
                        /db_xref="CDD:29146"
    Site               order(61,105,107,154,159,185,189)
                        /site_type="other"
                        /note="trimer interface"
                        /db_xref="CDD:29146"
    Site               order(76..77,84,119,126,129)
                        /site_type="other"
                        /note="receptor binding sites"
                        /db_xref="CDD:29146"
    CDS                1..193
                        /gene="CD70"
                        /coded_by="NM_001252.3:151..732"
                        /db_xref="CCDS:CCDS12170.1"
                        /db_xref="GeneID:970"
                        /db_xref="HGNC:11937"
                        /db_xref="HPRD:18515"
                        /db_xref="MIM:602840"

ORIGIN
    1 mpeegsgcsv rrrpygcvlr aalvplvagl viclvvcigr faqaqqqlpl eslgwdvael
    61 qlnhtgppqd prlywqggpa lgrsflhgpe ldkgqlrihr dgiymvhiqv tlaicsstta
    121 srhhpttlav gicspasrsi slrlsfhgq ctiasqrllp largdtlctn ltgtllpsrn
    181 tdetffgvqw vrp
//

```

Figur 8 (forts.)





[PubMed](#)
[Nucleotide](#)
[Protein](#)
[Genome](#)
[Structure](#)
[PMC](#)
[Taxonomy](#)
[OMIM](#)
[Books](#)

Search for

[Limits](#)
[Preview/Index](#)
[History](#)
[Clipboard](#)
[Details](#)

Display [GenPept](#) 5

Range: from to Features: ☐ SNP ☒ CDD

☐ 1: [NP_742011](#). Reports tumor necrosis fa...[gi:25952147]

[BLink](#), [Conserved Domains](#), [Links](#)

[Comment](#)
[Features](#)
[Sequence](#)

LOCUS NP_742011 204 aa linear PRI 16-MAR-2008
 DEFINITION tumor necrosis factor ligand superfamily, member 14 isoform 2 [Homo sapiens].
 ACCESSION NP_742011
 VERSION NP_742011.1 GI:25952147
 DBSOURCE REFSEQ: accession [NM_172014.1](#)
 KEYWORDS .
 SOURCE Homo sapiens (human)
 ORGANISM [Homo sapiens](#)
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.
 REFERENCE 1 (residues 1 to 204)
 AUTHORS Pawlak,K., Pawlak,D. and Mysliwiec,M.
 TITLE LIGHT--a new member of the TNF superfamily in the plasma, dialysate and urine of uremic patients; the impact of residual diuresis and presence of viral hepatitis
 JOURNAL Clin. Biochem. 40 (16-17), 1240-1244 (2007)
 PUBMED [17826757](#)
 REMARK GeneRIF: The plasma levels of LIGHT seem to be similar in hemodialysis (HD) patients and healthy subjects and were not affected by gender, age, the mean period of HD history, disease etiology, type of medication and type of using dialysis membrane.
 REFERENCE 2 (residues 1 to 204)
 AUTHORS Celik,S., Langer,H., Stellos,K., May,A.E., Shankar,V., Kurz,K., Katus,H.A., Gawaz,M.P. and Dengler,T.J.
 TITLE Platelet-associated LIGHT (TNFSF14) mediates adhesion of platelets to human vascular endothelium
 JOURNAL Thromb. Haemost. 98 (4), 798-805 (2007)
 PUBMED [17938804](#)
 REMARK GeneRIF: platelet-associated LIGHT is involved in adhesion of platelets to endothelium while soluble LIGHT induces a pro-inflammatory state in vascular endothelial cells
 REFERENCE 3 (residues 1 to 204)
 AUTHORS Loeffler,M., Le'Negrata,G., Krajewska,M. and Reed,J.C.
 TITLE Attenuated Salmonella engineered to produce human cytokine LIGHT inhibit tumor growth
 JOURNAL Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104 (31), 12879-12883 (2007)
 PUBMED [17652173](#)
 REMARK GeneRIF: attenuated Salmonella typhimurium expressing LIGHT inhibited growth of primary tumors, as well as the dissemination of pulmonary metastases, in various mouse tumor models employing

Figur 8 (forts.)

- murine carcinoma cell lines in immunocompetent mice
- REFERENCE 4 (residues 1 to 204)
- AUTHORS Nadiminty,N., Chun,J.Y., Hu,Y., Dutt,S., Lin,X. and Gao,A.C.
- TITLE LIGHT, a member of the TNF superfamily, activates Stat3 mediated by NIK pathway
- JOURNAL Biochem. Biophys. Res. Commun. 359 (2), 379-384 (2007)
- PUBMED [17543278](#)
- REMARK GeneRIF: in addition to activating NF-kappaB/p52, LIGHT also activates Stat3 through the NIK pathway
- REFERENCE 5 (residues 1 to 204)
- AUTHORS Gill,R.M., Coleman,N.M. and Hunt,J.S.
- TITLE Differential cellular expression of LIGHT and its receptors in early gestation human placentas
- JOURNAL J. Reprod. Immunol. 74 (1-2), 1-6 (2007)
- PUBMED [17010447](#)
- REMARK GeneRIF: LIGHT system may regulate early to middle stages of placental development via cell-specific, temporally programmed expression of the ligand and its receptors, and may also assist in preserving placental immune privilege.
- REFERENCE 6 (residues 1 to 204)
- AUTHORS Yu,K.Y., Kwon,B., Ni,J., Zhai,Y., Ebner,R. and Kwon,B.S.
- TITLE A newly identified member of tumor necrosis factor receptor superfamily (TR6) suppresses LIGHT-mediated apoptosis
- JOURNAL J. Biol. Chem. 274 (20), 13733-13736 (1999)
- PUBMED [10318773](#)
- REFERENCE 7 (residues 1 to 204)
- AUTHORS Harrop,J.A., McDonnell,P.C., Brigham-Burke,M., Lyn,S.D., Minton,J., Tan,K.B., Dede,K., Spampinato,J., Silverman,C., Hensley,P., DiPrinzio,R., Emery,J.G., Deen,K., Eichman,C., Chabot-Fletcher,M., Truneh,A. and Young,P.R.
- TITLE Herpesvirus entry mediator ligand (HVEM-L), a novel ligand for HVEM/TR2, stimulates proliferation of T cells and inhibits HT29 cell growth
- JOURNAL J. Biol. Chem. 273 (42), 27548-27556 (1998)
- PUBMED [9765287](#)
- REFERENCE 8 (residues 1 to 204)
- AUTHORS Zhai,Y., Guo,R., Hsu,T.L., Yu,G.L., Ni,J., Kwon,B.S., Jiang,G.W., Lu,J., Tan,J., Ugustus,M., Carter,K., Rojas,L., Zhu,F., Lincoln,C., Endress,G., Xing,L., Wang,S., Oh,K.O., Gentz,R., Ruben,S., Lippman,M.E., Hsieh,S.L. and Yang,D.
- TITLE LIGHT, a novel ligand for lymphotoxin beta receptor and TR2/HVEM induces apoptosis and suppresses in vivo tumor formation via gene transfer
- JOURNAL J. Clin. Invest. 102 (6), 1142-1151 (1998)
- PUBMED [9739048](#)
- REFERENCE 9 (residues 1 to 204)
- AUTHORS Marsters,S.A., Sheridan,J.P., Pitti,R.M., Brush,J., Goddard,A. and Ashkenazi,A.
- TITLE Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor Apo3
- JOURNAL Curr. Biol. 8 (9), 525-528 (1998)
- PUBMED [9560343](#)
- REFERENCE 10 (residues 1 to 204)
- AUTHORS Mauri,D.N., Ebner,R., Montgomery,R.I., Kochel,K.D., Cheung,T.C., Yu,G.L., Ruben,S., Murphy,M., Eisenberg,R.J., Cohen,G.H., Spear,P.G. and Ware,C.F.
- TITLE LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator
- JOURNAL Immunity 8 (1), 21-30 (1998)
- PUBMED [9462508](#)

Figur 8 (forts.)

COMMENT REVIEWED REFSEQ: This record has been curated by NCBI staff. The reference sequence was derived from [AY028261.1](#) and [AF064090.1](#).

Summary: The protein encoded by this gene is a member of the tumor necrosis factor (TNF) ligand family. This protein is a ligand for TNFRSF14, which is a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, and which is also known as a herpesvirus entry mediator (HVEM). This protein may function as a costimulatory factor for the activation of lymphoid cells and as a deterrent to infection by herpesvirus. This protein has been shown to stimulate the proliferation of T cells, and trigger apoptosis of various tumor cells. This protein is also reported to prevent tumor necrosis factor alpha mediated apoptosis in primary hepatocyte. Two alternatively spliced transcript variant encoding distinct isoforms have been reported.

Transcript Variant: This variant (2) lacks an in-frame coding segment compared to variant 1, resulting an isoform (2) that lacks an internal region, as compared to isoform 1.

Publication Note: This RefSeq record includes a subset of the publications that are available for this gene. Please see the Entrez Gene record to access additional publications.

FEATURES

source	Location/Qualifiers
	1..204
	/organism="Homo sapiens"
	/db_xref="taxon:9606"
	/chromosome="19"
	/map="19p13.3"
<u>Protein</u>	1..204
	/product="tumor necrosis factor ligand superfamily, member 14 isoform 2"
	/note="delta transmembrane LIGHT; tumor necrosis factor superfamily member LIGHT; herpesvirus entry mediator A; tumor necrosis factor receptor-like 2; ligand for herpesvirus entry mediator"
	/calculated_mol_wt=22265
<u>Region</u>	58..202
	/region_name="TNF"
	/note="Tumor Necrosis Factor; TNF superfamily members include the cytokines: TNF (TNF-alpha), LT (lymphotoxin-alpha, TNF-beta), CD40 ligand, Apo2L (TRAIL), Fas ligand, and osteoprotegerin (OPG) ligand; cd00184"
	/db_xref="CDD:29146"
<u>Site</u>	order(61,106,108,166,171,198,202)
	/site_type="other"
	/note="trimer interface"
	/db_xref="CDD:29146"
<u>Site</u>	order(79..80,85,127,134,139)
	/site_type="other"
	/note="receptor binding sites"
	/db_xref="CDD:29146"
<u>CDS</u>	1..204
	/gene="TNFSF14"
	/coded_by="NM_172014.1:383..997"
	/note="isoform 2 is encoded by transcript variant 2"
	/db_xref="GeneID:8740"
	/db_xref="HGNC:11930"
	/db_xref="MIM:604520"

ORIGIN

Figur 8 (forts.)

```
1 meesvvrpsv fvvdgqtdip ftrlgrshrr qscsvardgp agsweqliqe rrshevnppa  
61 hltgansslt gsggp1lwet qlglaflrgl syhdgalvvt kagyyiysk vqlggvgcpl  
121 glastithgl ykrtprypee lellvsqqsp cgratsssrw wwdssflggv vhleageevv  
181 vrvlderlvr lrdgtrsylg afmv
```

//

Disclaimer | Write to the Help Desk
NCBI | NLM | NIH

Figur 8 (forts.)



[My NCBI](#)
[Sign In](#)
[Register](#)

[PubMed](#)
[Nucleotide](#)
[Protein](#)
[Genome](#)
[Structure](#)
[PMC](#)
[Taxonomy](#)
[OMIM](#)
[Books](#)

Search for

[Limits](#)
[Preview/Index](#)
[History](#)
[Clipboard](#)
[Details](#)

Display [GenPept](#) 5

Range: from to Features: ☒ CDD

☐ 1: [AAB97877](#). Reports CD30L protein [Homo sapiens] BLink, Conserved Domains, Links

[Features](#) [Sequence](#)

LOCUS AAB97877 234 aa linear PRI 28-JAN-1998
 DEFINITION CD30L protein [Homo sapiens].
 ACCESSION AAB97877
 VERSION AAB97877.1 GI:2815515
 DBSOURCE locus HSCD30L1 accession [AF006381.1](#)
 locus HSCD30L2 accession [AF006382.1](#)
 locus HSCD30L3 accession [AF006383.1](#)
 locus HSCD30L4 accession [AF006384.1](#)
 KEYWORDS .
 SOURCE Homo sapiens (human)
 ORGANISM [Homo sapiens](#)
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
 Catarrhini; Hominidae; Homo.
 REFERENCE 1 (residues 1 to 234)
 AUTHORS Croager, E.J. and Abraham, L.J.
 TITLE Characterisation of the human CD30 ligand gene structure
 JOURNAL Biochim. Biophys. Acta 1353 (3), 231-235 (1997)
 PUBMED 9349718
 REFERENCE 2 (residues 1 to 234)
 AUTHORS Croager, E.J. and Abraham, L.J.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (02-JUN-1997) Biochemistry, University of Western
 Australia, Entrance 2, Hackett Drive, Nedlands, Western Australia
 6907, Australia
 COMMENT Method: conceptual translation.
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..234
 /organism="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:9606"
 /chromosome="9"
 /map="9q33"
 Protein 1..234
 /product="CD30L protein"
 Region 104..220
 /region_name="TNF"
 /note="Tumor Necrosis Factor; TNF superfamily members
 include the cytokines: TNF (TNF-alpha), LT
 (lymphotoxin-alpha, TNF-beta), CD40 ligand, Apo2L (TRAIL),
 Fas ligand, and osteoprotegerin (OPG) ligand; cd00184"
 /db_xref="CDD:29146"
 Site order(107,140,142,190,195)

Figur 8 (forts.)

```

/site_type="other"
/note="trimer interface"
/db_xref="CDD:29146"
Site order(116..117,157,164,169)
/site_type="other"
/note="receptor binding sites"
/db_xref="CDD:29146"
CDS 1..234
/gene="CD30L"
/coded_by="join(AF006381.1:1599..1793,AF006382.1:188..230,
AF006383.1:534..605,AF006384.1:347..741)"
ORIGIN
      1 mdpqlqqaln gmappgdtam hvpagsvash lgttsrsyfy lttatlalcl vftvatimvl
      61 vvqrtdsipn spdnvplkkg ncsedllcil krapfkksa ylvakhlnk tklswnkdgi
     121 lhgvryqdgn lviqfpglyf iicqlqflvq cpnnsvdlkx ellinkhikk qxlvtvcesg
     181 mqtikhvyqnl sqflldylqv nttisvnvdt xqyidtstfp lenvlsiflx snsds
//

```

[Disclaimer](#) | [Write to the Help Desk](#)
[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)

Figur 8 (forts.)



 My Nt (Sign In) (Regis)

PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PMC Taxonomy OMIM Books

Search Protein for

Limits Preview/Index History Clipboard Details

Display GenPept

Range: from begin to end Features: ☒ CDD

☐ 1: [P42081](#). Reports T-lymphocyte acti...[gi:1168851] BLink, Conserved Domains, Links

<u>Comment</u>	<u>Features</u>	<u>Sequence</u>
LOCUS	P42081	329 aa linear PRI 15-JAN-2008
DEFINITION	T-lymphocyte activation antigen CD86 precursor (Activation B7-2 antigen) (CTLA-4 counter-receptor B7.2) (B70) (FUN-1) (BU63).	
ACCESSION	P42081	
VERSION	P42081.1 GI:1168851	
DBSOURCE	swissprot: locus CD86_HUMAN, accession P42081 ; class: standard. extra accessions: A0NOP0, Q13655, Q6FHB1, Q6GTS4, Q7M4L5 created: Nov 1, 1995. sequence updated: Nov 1, 1995. annotation updated: Jan 15, 2008. xrefs: U04343.1 , AAB03814.1 , L25259.1 , AAA58389.1 , CR541844.1 , CAG46642.1 , EF064748.1 , ABK41931.1 , BC040261.1 , AAH40261.1 , U17722.1 , AAA86473.1 , U17717.1 , U17718.1 , U17719.1 , U17721.1 , A48754 , JC7605 , 1I85, 1NCN xrefs (non-sequence databases): UniGene: Hs.171182 , PDBsum: 1I85, PDBsum: 1NCN, IntAct: P42081 , Ensembl: ENSG00000114013 , KEGG: hsa:942 , H-InvDB: HIX0024331 , HGNC: 1705 , HPA: CAB004319 , MIM: 601020 , PharmGKB: PA26243 , LinkHub: P42081 , ArrayExpress: P42081 , CleanEx: HS_CD86 , GermOnline: ENSG00000114013 , GO: 0016021 , GO: 0005886 , GO: 0015026 , GO: 0005515 , GO: 0016563 , GO: 0007267 , GO: 0008284 , GO: 0045086 , GO: 0045404 , GO: 0043017 , GO: 0045630 , GO: 0045941 , InterPro: IPR015651 , InterPro: IPR007110 , InterPro: IPR013783 , InterPro: IPR003006 , InterPro: IPR013106 , InterPro: IPR003596 , Gene3D: G3DSA:2.60.40.10 , PANTHER: PTHR13712:SF45 , Pfam: PF07686 , SMART: SM00406 , PROSITE: PS50835 , PROSITE: PS00290	
KEYWORDS	3D-structure; Alternative splicing; Glycoprotein; Host-virus interaction; Immunoglobulin domain; Membrane; Polymorphism; Receptor; Signal; Transmembrane; Ubl conjugation.	
SOURCE	Homo sapiens (human)	
ORGANISM	Homo sapiens Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.	
REFERENCE	1 (residues 1 to 329)	
AUTHORS	Azuma, M., Ito, D., Yagita, H., Okumura, K., Phillips, J. H., Lanier, L. L. and Somoza, C.	
TITLE	B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28	
JOURNAL	Nature 366 (6450), 76-79 (1993)	
PUBMED	7694153	
REMARK	NUCLEOTIDE SEQUENCE [MRNA] (ISOFORM 2).	

Figur 8 (forts.)

REFERENCE 2 (residues 1 to 329)
 AUTHORS Freeman,G.J., Gribben,J.G., Boussiotis,V.A., Ng,J.W., Restivo,V.A.
 Jr., Lombard,L.A., Gray,G.S. and Nadler,L.M.
 TITLE Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human
 T cell proliferation
 JOURNAL Science 262 (5135), 909-911 (1993)
 PUBMED 7694363
 REMARK NUCLEOTIDE SEQUENCE [MRNA] (ISOFORM 1).
 REFERENCE 3 (residues 1 to 329)
 AUTHORS Magistrelli,G., Caron,G., Gauchat,J.F., Jeannin,P., Bonnefoy,J.Y.
 and Delneste,Y.
 TITLE Identification of an alternatively spliced variant of human CD86
 mRNA
 JOURNAL Biochem. Biophys. Res. Commun. 280 (5), 1211-1215 (2001)
 PUBMED 11162656
 REMARK NUCLEOTIDE SEQUENCE [MRNA] (ISOFORM 3).
 REFERENCE 4 (residues 1 to 329)
 AUTHORS Halleck,A., Ebert,L., Mkoundinya,M., Schick,M., Eisenstein,S.,
 Neubert,P., Kstrang,K., Schatten,R., Shen,B., Henze,S., Mar,W.,
 Korn,B., Zuo,D., Hu,Y. and LaBaer,J.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (??-JUN-2004)
 REMARK NUCLEOTIDE SEQUENCE [LARGE SCALE MRNA] (ISOFORM 2).
 REFERENCE 5 (residues 1 to 329)
 AUTHORS Livingston,R.J., Shaffer,T., McFarland,I., Nguyen,C.P.,
 Stanaway,I.B., Rajkumar,N., Johnson,E.J., da Ponte,S.H., Willa,H.,
 Ahearn,M.O., Bertucci,C., Acklestad,J., Carroll,A., Swanson,J.,
 Gildersleeve,H.I. and Nickerson,D.A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (??-OCT-2006)
 REMARK NUCLEOTIDE SEQUENCE [GENOMIC DNA].
 REFERENCE 6 (residues 1 to 329)
 AUTHORS Gerhard,D.S., Wagner,L., Feingold,E.A., Shenmen,C.M., Grouse,L.H.,
 Schuler,G., Klein,S.L., Old,S., Rasooly,R., Good,P., Guyer,M.,
 Peck,A.M., Derge,J.G., Lipman,D., Collins,F.S., Jang,W., Sherry,S.,
 Feolo,M., Misquitta,L., Lee,E., Rotmistrovsky,K., Greenhut,S.F.,
 Schaefer,C.F., Buetow,K., Bonner,T.I., Haussler,D., Kent,J.,
 Kiekhaus,M., Furey,T., Brent,M., Prange,C., Schreiber,K.,
 Shapiro,N., Bhat,N.K., Hopkins,R.F., Hsie,F., Driscoll,T.,
 Soares,M.B., Casavant,T.L., Scheetz,T.E., Brown-stein,M.J.,
 Usdin,T.B., Toshiyuki,S., Carninci,P., Piao,Y., Dudekula,D.B.,
 Ko,M.S., Kawakami,K., Suzuki,Y., Sugano,S., Gruber,C.E.,
 Smith,M.R., Simmons,B., Moore,T., Waterman,R., Johnson,S.L.,
 Ruan,Y., Wei,C.L., Mathavan,S., Gunaratne,P.H., Wu,J., Garcia,A.M.,
 Hulyk,S.W., Fuh,E., Yuan,Y., Sneed,A., Kowis,C., Hodgson,A.,
 Muzny,D.M., McPherson,J., Gibbs,R.A., Fahey,J., Helton,E.,
 Kettelman,M., Madan,A., Rodrigues,S., Sanchez,A., Whiting,M.,
 Madari,A., Young,A.C., Wetherby,K.D., Granite,S.J., Kwong,P.N.,
 Brinkley,C.P., Pearson,R.L., Bouffard,G.G., Blakesly,R.W.,
 Green,E.D., Dickson,M.C., Rodriguez,A.C., Grimwood,J., Schmutz,J.,
 Myers,R.M., Butterfield,Y.S., Griffith,M., Griffith,O.L.,
 Krzywinski,M.I., Liao,N., Morin,R., Palmquist,D., Petrescu,A.S.,
 Skalska,U., Smailus,D.E., Stott,J.M., Schnerch,A., Schein,J.E.,
 Jones,S.J., Holt,R.A., Baross,A., Marra,M.A., Clifton,S.,
 Makowski,K.A., Bosak,S. and Malek,J.
 CONSRTM MGC Project Team
 TITLE The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA
 project: the Mammalian Gene Collection (MGC)
 JOURNAL Genome Res. 14 (10B), 2121-2127 (2004)
 PUBMED 15489334

Figur 8 (forts.)

REMARK NUCLEOTIDE SEQUENCE [LARGE SCALE MRNA] (ISOFORM 1), AND VARIANT THR-310.
TISSUE=Brain
Erratum:[Genome Res. 2006 Jun;16(6):804. Morrin, Ryan [corrected to Morin, Ryan]]

REFERENCE 7 (residues 1 to 329)
AUTHORS Jellis,C.L., Wang,S.S., Rennert,P., Borriello,F., Sharpe,A.H., Green,N.R. and Gray,G.S.
TITLE Genomic organization of the gene coding for the costimulatory human B-lymphocyte antigen B7-2 (CD86)
JOURNAL Immunogenetics 42 (2), 85-89 (1995)
PUBMED 7541777

REMARK NUCLEOTIDE SEQUENCE [GENOMIC DNA] OF 7-329.
TISSUE=Foreskin

REFERENCE 8 (residues 1 to 329)
AUTHORS Lanier,L.L., O'Fallon,S., Somoza,C., Phillips,J.H., Linsley,P.S., Okumura,K., Ito,D. and Azuma,M.
TITLE CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL
JOURNAL J. Immunol. 154 (1), 97-105 (1995)
PUBMED 7527824

REMARK CHARACTERIZATION.

REFERENCE 9 (residues 1 to 329)
AUTHORS Engel,P., Gribben,J.G., Freeman,G.J., Zhou,L.J., Nozawa,Y., Abe,M., Nadler,L.M., Wakasa,H. and Tedder,T.F.
TITLE The B7-2 (B70) costimulatory molecule expressed by monocytes and activated B lymphocytes is the CD86 differentiation antigen
JOURNAL Blood 84 (5), 1402-1407 (1994)
PUBMED 7520767

REMARK IDENTIFICATION AS CD86.

REFERENCE 10 (residues 1 to 329)
AUTHORS Goto,E., Ishido,S., Sato,Y., Ohgimoto,S., Ohgimoto,K., Nagano-Fujii,M. and Hotta,H.
TITLE c-MIR, a human E3 ubiquitin ligase, is a functional homolog of herpesvirus proteins MIR1 and MIR2 and has similar activity
JOURNAL J. Biol. Chem. 278 (17), 14657-14668 (2003)
PUBMED 12582153

REMARK UBIQUITINATION, AND INTERACTION WITH MARCH8.

COMMENT On or before Feb 27, 2007 this sequence version replaced gi:74721835, gi:74757610, gi:627415, gi:25392201.
[FUNCTION] Receptor involved in the costimulatory signal essential for T-lymphocyte proliferation and interleukin-2 production, by binding CD28 or CTLA-4. May play a critical role in the early events of T-cell activation and costimulation of naive T-cells, such as deciding between immunity and anergy that is made by T-cells within 24 hours after activation. Isoform 2 interferes with the formation of CD86 clusters, and thus acts as a negative regulator of T-cell activation.
[SUBUNIT] Interacts with MARCH8. Interacts with human herpesvirus 8 MIR2 protein (Probable).
[SUBCELLULAR LOCATION] Membrane; Single-pass type I membrane protein.
[ALTERNATIVE PRODUCTS] Event=Alternative splicing; Named isoforms=3; Name=1; IsoId=P42081-1; Sequence=Displayed; Name=2; IsoId=P42081-3; Sequence=VSP_023124; Name=3; Synonyms=CD86 deltaEC; IsoId=P42081-2; Sequence=VSP_009125.
[TISSUE SPECIFICITY] Expressed by activated B-lymphocytes and monocytes.
[PTM] Polyubiquitinated; which is promoted by MARCH8 and results in endocytosis and lysosomal degradation.

Figur 8 (forts.)

```

[SIMILARITY] Contains 1 Ig-like C2-type (immunoglobulin-like)
domain.
[SIMILARITY] Contains 1 Ig-like V-type (immunoglobulin-like)
domain.
[WEB RESOURCE] Name=Wikipedia; Note=CD86 entry;
URL='http://en.wikipedia.org/wiki/CD86'.
FEATURES             Location/Qualifiers
    source            1..329
                        /organism="Homo sapiens"
                        /db_xref="taxon:9606"
    gene              1..329
                        /gene="CD86"
                        /note="synonym: CD28LG2"
    Protein           1..329
                        /gene="CD86"
                        /product="T-lymphocyte activation antigen CD86 precursor"
    Region            1..23
                        /gene="CD86"
                        /region_name="Signal"
                        /inference="non-experimental evidence, no additional
                        details recorded"
                        /note="Potential."
    Region            1..6
                        /gene="CD86"
                        /region_name="Splicing variant"
                        /experiment="experimental evidence, no additional details
                        recorded"
                        /note="Missing (in isoform 2). /FTId=VSP_023124."
    Region            22..234
                        /gene="CD86"
                        /region_name="Splicing variant"
                        /experiment="experimental evidence, no additional details
                        recorded"
                        /note="Missing (in isoform 3). /FTId=VSP_009125."
    Region            24..329
                        /gene="CD86"
                        /region_name="Mature chain"
                        /experiment="experimental evidence, no additional details
                        recorded"
                        /note="T-lymphocyte activation antigen CD86.
                        /FTId=PRO_0000014550."
    Region            24..247
                        /gene="CD86"
                        /region_name="Topological domain"
                        /inference="non-experimental evidence, no additional
                        details recorded"
                        /note="Extracellular (Potential)."
    Region            27..31
                        /gene="CD86"
                        /region_name="Beta-strand region"
                        /experiment="experimental evidence, no additional details
                        recorded"
    Region            27
                        /gene="CD86"
                        /region_name="Conflict"
                        /experiment="experimental evidence, no additional details
                        recorded"
                        /note="K -> E (in Ref. 7; AAA86473)."
    Region            33..131
                        /gene="CD86"

```

Figur 8 (forts.)

```

/region_name="Domain"
/experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
/note="Ig-like V-type."
Site 33
/gene="CD86"
/site_type="glycosylation"
/inference="non-experimental evidence, no additional
details recorded"
/note="N-linked (GlcNAc...) (Potential)."
Region 35..110
/gene="CD86"
/region_name="IGv"
/note="Immunoglobulin V-Type; smart00406"
/db_xref="CDD:47715"
Region 36..38
/gene="CD86"
/region_name="Beta-strand region"
/experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
Bond bond(40,110)
/gene="CD86"
/bond_type="disulfide"
/inference="non-experimental evidence, no additional
details recorded"
/note="Potential."
Site 47
/gene="CD86"
/site_type="glycosylation"
/inference="non-experimental evidence, no additional
details recorded"
/note="N-linked (GlcNAc...) (Potential)."
Region 54..58
/gene="CD86"
/region_name="Beta-strand region"
/experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
Region 64..69
/gene="CD86"
/region_name="Beta-strand region"
/experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
Region 80..84
/gene="CD86"
/region_name="Hydrogen bonded turn"
/experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
Region 85..88
/gene="CD86"
/region_name="Beta-strand region"
/experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
Region 90..92
/gene="CD86"
/region_name="Hydrogen bonded turn"
/experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
Region 95..97
/gene="CD86"
/region_name="Beta-strand region"

```

Figur 8 (forts.)

```

    /experiment="experimental evidence, no additional details
    recorded"
Region      106..113
               /gene="CD86"
               /region_name="Beta-strand region"
               /experiment="experimental evidence, no additional details
               recorded"
Region      122..133
               /gene="CD86"
               /region_name="Beta-strand region"
               /experiment="experimental evidence, no additional details
               recorded"
Site        135
               /gene="CD86"
               /site_type="glycosylation"
               /inference="non-experimental evidence, no additional
               details recorded"
               /note="N-linked (GlcNAc...) (Potential)."
```

```

Site        146
               /gene="CD86"
               /site_type="glycosylation"
               /inference="non-experimental evidence, no additional
               details recorded"
               /note="N-linked (GlcNAc...) (Potential)."
```

```

Region      150..225
               /gene="CD86"
               /region_name="Domain"
               /experiment="experimental evidence, no additional details
               recorded"
               /note="Ig-like C2-type."
```

```

Site        154
               /gene="CD86"
               /site_type="glycosylation"
               /inference="non-experimental evidence, no additional
               details recorded"
               /note="N-linked (GlcNAc...) (Potential)."
```

```

Bond        bond(157,218)
               /gene="CD86"
               /bond_type="disulfide"
               /inference="non-experimental evidence, no additional
               details recorded"
               /note="Potential."
```

```

Region      170
               /gene="CD86"
               /region_name="Variant"
               /experiment="experimental evidence, no additional details
               recorded"
               /note="S -> N (in dbSNP:rs9282642). /FTId=VAR_021916."
```

```

Site        177
               /gene="CD86"
               /site_type="glycosylation"
               /inference="non-experimental evidence, no additional
               details recorded"
               /note="N-linked (GlcNAc...) (Potential)."
```

```

Site        192
               /gene="CD86"
               /site_type="glycosylation"
               /inference="non-experimental evidence, no additional
               details recorded"
               /note="N-linked (GlcNAc...) (Potential)."
```

Figur 8 (forts.)

```

Site      213
          /gene="CD86"
          /site_type="glycosylation"
          /inference="non-experimental evidence, no additional
          details recorded"
          /note="N-linked (GlcNAc...) (Potential)."
```

Region 248..268

```

          /gene="CD86"
          /region_name="Transmembrane region"
          /inference="non-experimental evidence, no additional
          details recorded"
          /note="Potential."
```

Region 269..329

```

          /gene="CD86"
          /region_name="Topological domain"
          /inference="non-experimental evidence, no additional
          details recorded"
          /note="Cytoplasmic (Potential)."
```

Region 310

```

          /gene="CD86"
          /region_name="Variant"
          /experiment="experimental evidence, no additional details
          recorded"
          /note="A -> T (in dbSNP:rs1129055). /FTId=VAR_014650."
```

Region 323

```

          /gene="CD86"
          /region_name="Variant"
          /experiment="experimental evidence, no additional details
          recorded"
          /note="D -> N (in dbSNP:rs9282648). /FTId=VAR_021917."
```

ORIGIN

```

      1 mdpqctmgls nilfvmafll sgaaplkiqa yfnetadlpc qfansqnqsl selvvfwqdq
     61 enlvlnevyl gkekfdsvhs kymgrtsfds dswtlrlhnl qikdkglyqc iihhkkptgm
    121 irihqmnsel svlanfsqpe ivpisniten vyinltcssi hgypepkkms vllrtknsti
    181 eydgimqksq dnvteydvsv islsvsfpdv tsnmtifcil etdktrllss pfsieledpq
    241 pppdhipwit avlptviicv mvfclilkw kkkkrprnsy kcgtntmere eseqtkkrek
    301 ihipersdea qrvfksskts scdksdtcf
```

//