РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(19) BG (11) 107621 A

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ
ЗА
ИЗОБРЕТЕНИЕ

7(51) C 12 N 15/12
C 12 N 15/62
C 12 N 15/10
C 07 K 14/715
C 07 K 16/28
C 07 H 21/04
C 12 Q 1/68
A 61 K 38/17
A 61 K 48/00
G 01 N 33/53
G 01 N 33/68

(21) Регистров № 107621
(22) Заявено на 07.03.2003
(24) Начало на действие на патента от:

Приоритетни данни

(31) 233152	(32) 18.09.2000	(33) US
234140	21.09.2000	US
268499	13.02.2001	US
312185	14.08.2001	US

(41) Публикувана заявка в бюлетин № 1 на 30.01.2004
(45) Отпечатано на
(46) Публикувано в бюлетин № на
(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(71) Заявител(и):
BIOGEN INC.
CAMBRIDGE, MA (US)

(72) Изобретател(и):
Christine Ambrose, Reading, MA
Jeffrey Thompson, Stoneham, MA (US)

(74) Представител по индустриална собственост:
Румяна Стефанова Слабова, 1124 София, ул. "Леонардо да Винчи" 3

(86) № и дата на PCT заявка:
PCT/US01/28006, 06.09.2001

(87) № и дата на PCT публикация:
WO02/24909, 28.03.2002

(54) НУКЛЕИНОВИ КИСЕЛИНИ ЗА НОВИ РЕЦЕПТОРИ И ПОЛИПЕПТИДИ

(57) Изобретението се отнася до нуклеинови киселини, кодиращи BAFF-R полипептиди, до антитела за BAFF-R полипептиди и до фармацевтични състави, които ги съдържат. Изобретението се отнася и до нуклеинови киселини, полипептиди, до антитела и до фармацевтични състави, които се използват за лечение на туморогенни и автоимунни болестни състояния.

55 претенции, 21 фигури

Аминокиселинна секвенция на човешки BAFF-R

M R R G P R A L R G R D A P A P T P
C V P A E C F D L L V R H C V A C G
L L R T P R P K P A G A A S S P A P
R T A L Q P Q E S V G A G A G E A A
L P L P G L L F G A P A L L G L A L
V L A L V L V G L V S W R R R Q R R
L R G A S S A E A P D G D K D A P E
P L D K V I I L S P G I S D A T A P
A W P P P G E D P G T T P P G H S V
P V P A T E L G S T E L V T T K T A
G P E Q Q *

BG 107621 A

2469/03-PC

НУКЛЕИНОВИ КИСЕЛИНИ ЗА НОВИ РЕЦЕПТОРИ И ПОЛИПЕПТИДИ

ОБЛАСТ НА ТЕХНИКАТА

Настоящото изобретение осигурява нов рецепторен белтък. Изобретението се отнася най-общо до нуклеинови киселини и полипептиди. По-специално изобретението се отнася до нуклеинови киселини, кодиращи полипептиди, свързани с рецептор за BAFF, В-клетъчно активиращ фактор, спадащ към семейството на Тумор Некрозис Фактор ("TNF"), който е свързан с експресията на В-клетки и имуноглобулини. Този рецептор може да се използва за лечение на рак, лимфоми, автоимунни заболявания или наследствени генетични нарушения, включващи В-клетки.

ПРЕДШЕСТВАЩО СЪСТОЯНИЕ НА ТЕХНИКАТА

Настоящото изобретение се отнася до нов рецептор във семейството на TNF. Новият рецептор е идентифициран като BAFF рецептор ("BAFF-R").

Семейството на TNF се състои от двойки от лиганди и техните специфични рецептори, отнасящи се до TNF семейство лиганди и TNF семейство рецептори (Bazzoni and Beutler, (1996) N. Engl. J. Med., 334 (26) : 1717-1725. Семейството е включено в регулацията на имунната система и вероятно в други не-имунологични системи. Регулацията често е на ниво "управление на превключване", така че сигнализацията на TNF

семейството може да доведе до голям брой последователни събития, определени най-добре, чрез TNF. TNF може да инициира общ защитен възпалителен отговор на организма към чужда инвазия, който включва променен профил на адхезивни молекули, включени в клетъчния трафик, продукция на хемокини за насочване на специфични клетки към специфични компартменти и съзряването на различни ефекторни клетки. Като такъв, той има клиничен потенциал за регулиране на тези пътища.

Счита се, че индукцията на различни клетъчни отговори медиирани от такова TNF семейство цитокини, се инициира от свързването им със специфични клетъчни рецептори. Идентифицирани са поне два различни TNF рецептора с молекулна маса приблизително 55 kDa (TNFR1) и 75 kDa (TNFR2) (Hohman et al., J. Biol. Chem., 264 : 14927-14934 (1989); and Brockhaus et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:3127-3131. И двата TNF рецепторни гена са свързани с обширен полиморфизъм. И двата TNFRs имат типичната структура на клетъчно повърхностни рецептори, включваща извънклетъчен, трансмембранен и вътреклетъчен домен. Извънклетъчната част на тип 1 и тип 2 TNFRs съдържа повторена аминокиселинна последователност от четири богати на цистеин домена (CDRs). Сходен повторен мотив от CDRs съществува в няколко други клетъчно повърхностни белтъци, включващи между другите, p75 рецептора за растежния фактор на нервните клетки и B-клетъчния антиген CD40.

Рецепторите са мощно средство за оценка на биологичните пътища, поради тяхното лесно превръщане в имуноглобулинови рекомбинантни белтъци. Тези димерни разтворими форми на рецептора са добри инхибитори в случаи,

медиирани или от секретирани или от повърхностно свързани лиганди. Свързвайки се с тези лиганди те предпазват лиганда от взаимодействие с клетъчно асоциирани рецептори, което служи като сигнал. Тези рецепторни-Fc рекомбинантни белтъци са полезни не само в експериментален аспект, но те се използват много успешно в клиниката, в случай на TNF-R-Fc, за лечение на чревно възпалително заболяване, ревматоидни артрити и остър клиничен синдром, съпровождащ прилагане на OKT3 (Eason et al., (1996), Transplantacion, 61 (2) : 224-228; Feldmann et al., (1996), Int. Arch. Allergy Immunol., 114 (4) : 362-365; and van Dullemen et al., (1995), Gastroenterol., 109 (1) : 129-135). Може да се предположи, че манипулирането на много случаи, медиирани от сигнализация чрез рецептори от семейството на TNF, ще има широко приложение при лечение на болести свързани с имунната система, а също така и при широк обхват от болести при човека, които имат патологични последствия, поради участието на имунната система. Разтворимата форма на неотдавна описания рецептор, остеопротегерин, може да блокира загубата на костна маса и следователно събитията, контролирани от семейството на TNF рецепторната сигнализация не е необходимо се ограничава само до регулиране на имунната система (Simonet et al., (1997), Cell, 89 (2) : 309-319). Антителата към рецептора могат да блокират лигандното свързване и следователно могат да имат също така и клинично приложение. Такъв тип антитела често пъти са много дълго-живущи и могат да имат предимства пред разтворимите рецепторни-Fc рекомбинантни белтъци, които имат по-къс полу-живот в кръвта.

Докато подтискането на рецепторно медииранията път представлява най-широко използваното терапевтично

приложение на тези рецептори, първоначално това беше активирането на TNF рецепторите, които показват добри клинични перспективи (Aggarwal and Natarajan (1996), Eur. Cytokine Netw., 7 (2) : 93-124). Активирането на TNF рецепторите може да инициира клетъчна смърт в прицелната клетка, а от тук и приложение, което е и все още е атрактивно при туморите (Eggermont et al., (1996), Ann. Surg., 224 (6) : 756-765). Рецепторът може да бъде активиран или чрез прилагане на лиганд, т. е. естественият път или на някои антитела, които могат да крос-реагират с рецептора и които също така са силни агонисти. Антителата ще имат предимство в онкологията, тъй като те могат да останат в кръвта за дълги периоди от време, докато лигандите обикновено имат кратък живот в кръвния поток. Тъй като много от тези рецептори могат да се експресират по-селективно в туморите или те могат да участват в сигнализацията само за клетъчна смърт или диференцировка в туморите, агонистичните антитела могат да бъдат удачно оръжие за лечение на рака. По подобен начин, много положителни имунологични случаи се медиират чрез семейството на TNF рецепторите, например възпалителните реакции на гостоприемника, производство на антитяло и т. н. и следователно агонистичните антитела могат да имат благоприятни ефекти при други не-онкологични приложения.

Парадоксалното е, че подтискането на пътя може да има благоприятен клиничен ефект при лечение на тумори. Например, Fas лигандът се експресира от някои тумори и тази експресия може да доведе до смъртта на Fas позитивните лимфоцити, като по този начин се улеснява способността на тумора да се изплъзне от имунната система. В този случай, подтискането на Fas системата може да позволи след това на

имунната система да взаимодейства с тумора по други пътища, при които вече достъпът е възможен (Green and Ware (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94 (12) : 5986-90).

TNF лигандното семейство BAFF, известно също така като TALL-1, THANK, BlyS и zTNF4 (Schneider et al., (1999), J. Exp. Med., 189 (11) : 1747-1756; Shu et al., (1999), J. Leukoc. Biol., 65 (5) : 680-683; Mukhopadhyay et al., (1999), J. Biol. Chem., 274 (23) : 15978-15981; Moore et al., (1999), Science, 285 (5425) : 260-263; Gross et al., (2000), Nature, 404 (6781) : 995-999) увеличава преживяването на B-клетките in vitro (Batten et al., (2000), J. Exp. Med., 192 (10) : 1453-1466) и се явява като ключов регулатор на периферните B-клетъчни популации in vivo. Мишки, които свръх експресират BAFF, показват зряла B клетъчна хиперплазия и симптоми на системик лупус еритематозус (SLE) (Mackay et al., (1999), J. Exp. Med., 190 (11) : 1697-1710). Също така някои SLE пациенти имат значително увеличени нива на BAFF в техния серум (Zhang et al., (2001), J. Immunol., 166 (1) : 6-10). Следователно допускаше се, че анормално високите нива на този лиганд могат да допринесат за патогенезата на автоимунните заболявания, чрез увеличаване на преживяването на автореактивните B клетки (Batten et al., (2000), J. Exp. Med., 192 (10) : 1453-1466).

BAFF, тип II мембранен белтък, се продуцира от клетки с миелоиден произход (Schneider et al., (1999), J. Exp. Med., 189 (11) : 1747-1756); Moore et al., (1999), Science, 285 (5425) : 260-263) и той се експресира или върху клетъчната повърхност или като разтворима форма (Schneider et al., (1999), J. Exp. Med., 189 (11) : 1747-1756). По-рано беше показано, че два представителя от семейството на TNF рецепторите, BCMA и TACI взаимодействат с BAFF (Gross et al., (2000), Nature, 404 : 995-

999; Thompson et al., (2000), J. Exp. Med., 192 (1) ; 129-135; Xia et al., (2000), J. Exp. Med., 192 : 137-143; Marsters et al., (2000), Curr. Biol., 10 (13) : 785-788; Shu et al., (2000), J. Leukoc. Biol., 65 (5) : 680-683; Wu et al., (2000), J. Biol. Chem., 275 : 35478-35485).

ТЕХНИЧЕСКА СЪЩНОСТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Настоящото изобретение се базира отчасти на откритието за "BAFF-R", BAFF рецепторен белтък, полинуклеотидни секвенции и BAFF-R полипептиди, кодирани от тези секвенции на нуклеиновите киселини.

В един вариант, изобретението осигурява изолирана нуклеинова киселина, която кодира BAFF-R полипептид, или фрагмент или негово производно. Нуклеиновата киселина може да включва, например секвенция от нуклеинова киселина, кодираща полипептид, поне 50 % идентичен, или поне 90 % идентичен, с полипептида, включващ аминокиселинна секвенция от Фигура 2D (SEQ ID NO:5).

Изобретението осигурява също така фактически чиста молекула нуклеинова киселина, включваща секвенция, която хибридизира при определени условия с хибридизационна сонда, секвенция от нуклеиновата киселина на сондата, съдържаща кодиращата секвенция от Фигура 2A (SEQ ID NO:3), Фигура 2C (SEQ ID NO:4) или комплиментарна на споменатата кодираща секвенция.

В някои варианти, секвенцията от нуклеиновата киселина кодира полипептид, притежаващ секвенцията от Фигура 2D (SEQ ID NO:5), със заместване поне на една консервативна аминокиселина.

В някои варианти, секвенцията от нуклеиновата киселина кодира полипептид, който се свързва с BAFF.

Нуклеиновата киселина може да включва, например нуклеинова киселина, която включва нуклеотидната секвенция, показана на Фигура 1 А (SEQ ID NO:1); Фигура 1В (SEQ ID NO:2), Фигура 2А (SEQ ID NO:3), Фигура 2С (SEQ ID NO:4) и Фигура 3 (SEQ ID NO:6).

Нуклеиновата киселина може да бъде например геномен ДНК фрагмент, или тя може да е кДНК молекула.

В изобретението е включен също така вектор, съдържащ една или повече от описаните тук нуклеинови киселини и клетка, съдържаща векторите или описаните тук нуклеинови киселини.

В друг вариант изобретението осигурява по същество чиста молекула нуклеинова киселина, кодираща рекомбинантен белтък, включващ поне два сегмента, където единият от сегментите включва полипептид или негов фрагмент, както е описано в аминокиселинните секвенции, съобщени в по-горните варианти от изобретението. Изобретението осигурява също така рекомбинантен белтък, включващ поне два или три сегмента, където първият сегмент включва хетероложен сигнален полипептид, вторият включва полипептид или негов фрагмент, както е описано в BAFF-R аминокиселинните секвенции, съобщени в по-горните варианти от изобретението, а третият сегмент включва имуноглобулинов полипептид. Съответно, първият сегмент включва имуноглобулинов полипептиден фрагмент, съдържащ сигнална секвнеция, а вторият сегмент включва BAFF-R полипептиден фрагмент.

В други варианти, изобретението осигурява по същество чисто, свързващо средство, което се свързва специфично с полипептида от по-горе изложените варианти от изобретението.

Настоящото изобретение е насочено също така до клетки на гостоприемник, трансформирани с рекомбинантен експресионен вектор, включващ всяка една от молекулите нуклеинови киселини, описани по-горе.

В друг вариант, изобретението включва фармацевтичен състав, който включва BAFF-R нуклеинова киселина и фармацевтично приемлив носител или разредител.

В друг вариант, изобретението включва по същество пречистен BAFF-R полипептид, например който и да е от полипептидите, кодирани от BAFF-R нуклеинова киселина.

Изобретението включва също така фармацевтичен състав, който включва BAFF-R полипептид и фармацевтично приемлив носител или разредител.

В още един друг вариант, изобретението осигурява антитяло, което се свързва специфично с BAFF-R полипептид. Антитялото може да бъде например, моноклонално или поликлонално антитяло. Изобретението включва също така фармацевтичен състав, включващ BAFF-R антитяло и фармацевтично приемлив носител или разредител. Настоящото изобретение е насочено също така към изолиране на антитела, които се свързват с епитоп върху полипептида, кодиран от която и да е от молекулите от нуклеинови киселини описани по-горе.

Настоящото изобретение се отнася по нататък до китове, включващи антитела, които се свързват с полипептида, кодиран от която и да е от молекулите от нуклеинови киселини, описани по-горе и негативно антитяло като контрола.

Изобретението се отнася по-нататък до метод за получаване на BAFF-R полипептид. Методът включва осигуряване на клетка, съдържаща BAFF-R нуклеинова киселина, например, вектор, който включва BAFF-R нуклеинова киселина и култивиране на клетката в условия необходими за да се експресира BAFF-R полипептида, кодиран от нуклеиновата киселина. След това експресираният BAFF-R полипептид се получава от клетката. За предпочитане, клетката продуцира предимно малко или не продуцира BAFF-R полипептид. Клетката може да бъде прокариотна или еукариотна клетка.

Настоящото изобретение осигурява метод за индуциране на имунен отговор в бозайници срещу полипептид, кодиран от която и да е от молекулите от нуклеинови киселини описани по-горе, чрез прилагане към бозайника на количество от полипептид, достатъчно за да се индуцира имунен отговор.

Настоящото изобретение е насочено също така до методи за идентифициране на съединение, което се свързва с BAFF-R полипептида, чрез контактуване на BAFF-R полипептида със съединение и като се определя дали съединението се свързва с BAFF-R полипептида.

Настоящото изобретение е насочено също така до методи за идентифициране на съединение, което се свързва с молекула нуклеинова киселина, кодираща BAFF-R полипептид, чрез контактуване на BAFF-R нуклеинова киселина със съединение и като се определя дали съединението се свързва с молекулата от нуклеиновата киселина.

Изобретението осигурява по-нататък методи за идентифициране на съединение, което модулира активността на BAFF-R полипептид, чрез контактуване на BAFF-R полипептид

със съединение и чрез определяне дали BAFF-R полипептидната активност е модифицирана.

Настоящото изобретение е насочено също така до съединения, които модулират BAFF-R полипептидната активност, които са идентифицирани чрез свързване на BAFF-R полипептида със съединението и чрез определяне дали съединението модифицира активността на BAFF-R полипептид, свързва ли се с BAFF-R полипептида или се свързва с молекула нуклеинова киселина, кодираща BAFF-R полипептида.

В друг вариант изобретението осигурява метод за диагностициране на В-клетъчно медиирано болестно състояние, например автоимунно нарушение или рак в пациента. Методът включва осигуряване на белтъчна проба от пациента и измерване на количеството на BAFF-R полипептида в пробата от пациента. След това количеството на BAFF-R в пробата от пациента се сравнява с количеството на BAFF-R полипептида от контролната белтъчна проба. Промяната в количеството на BAFF-R полипептида в пробата от пациента, по отношение на количеството на BAFF-R полипептида в контролната белтъчна проба показва, че пациентът има В-клетъчно медиирано болестно състояние. За предпочитане е контролната проба да се вземе от подходящ индивид, т.е. от индивид със сходна възраст, пол или друга обща кондиция, но за който сме сигурни, че не е болен. Съответно, контролната проба може да се вземе от лице по време, когато сме сигурни, че лицето няма никакво нарушение. В някои варианти BAFF-R полипептидът се открива, като се използва BAFF-R антитяло.

В друг вариант, изобретението включва метод за диагностициране на В-клетъчно медиирано болестно състояние, например, автоимунно нарушение на пациента. Методът

включва осигуряване на проба от нуклеинова киселина, например РНК или ДНК, или и двете от пациента и измерване на количеството на BAFF-R нуклеиновата киселина в пробата от нуклеиновата киселина на пациента. Количеството на пробата от BAFF-R нуклеинова киселина в нуклеинова киселина на пациента се сравнява след това с количеството на BAFF-R нуклеинова киселина в контролната проба. Промяната в количеството на BAFF-R нуклеиновата киселина в пробата по отношение на количеството на BAFF-R в контролната проба показва, че пациентът има автоимунно болестно състояние.

В друг вариант, изобретението включва метод за диагностициране на или туморогенно или автоимунно болестно състояние в пациент. Методът включва осигуряване на проба от нуклеинова киселина от пациента и идентифициране поне на част от нуклеотидната секвенция на BAFF-R нуклеиновата киселина в пробата от нуклеинова киселина на пациента. След това BAFF-R нуклеотидната секвенция от пробата на пациента се сравнява с BAFF-R нуклеотидната секвенция от контролната проба. Промяната в BAFF-R нуклеотидната секвенция в пробата по отношение на BAFF-R нуклеотидната секвенция в споменатата контролна проба показва, че лицето има такова заболяване.

В още по-друг вариант, изобретението осигурява метод за лечение или предпазване, или забавяне на В-клетъчно медиирано болестно състояние. Методът включва прилагане на лицето, което се нуждае от такова лечение, предпазване или забавяне на BAFF-R нуклеинова киселина, на BAFF-R полипептид или на анти-BAFF-R антитяло, в количество достатъчно, за да се лекува, предпазва или забави

туморогенното или имуннорегулаторното болестно състояние на лицето.

Диагностицираните болестни състояния, лечения, предпазване или забавяне, използващи молекули от BAFF-R нуклеинови киселини, полипептиди или антитела, могат да бъдат рак или имунорегулаторно нарушение. Заболяванията включват такива, които са автоимунни по природа, като системик лупус еритематозус, ревматоидни артрити, миастения гравис, автоимунна хемолитична анемия, идиопатична тромбоцитопения пурпора, анти-фосфолипиден синдром, болест на Chagas, болест на Grave, грануломатозис на Wagner, поли-артритис нодоза и бързо прогресиращи гломерулонефрити. Терапевтичното средство има също така приложение при нарушения на плазматичните клетки, такива като мултитипна миелома, Waldenstrom's макроглобулинемия, заболяване свързано с тежката верига, първични или имуноцит-свързани амилоидози и моноклонална гамопатия с неопределено значение (MGUS). Онкологичните мишени включват В клетъчни карциноми, левкемии и лимфоми.

Състави и методи за лечение, използващи нуклеинови киселини, полипептиди и антитела от настоящото изобретение, могат да се използват при всички заболявания свързани с нежелана клетъчна пролиферация. По-специално, настоящото изобретение може да се използва за лечение на туморни клетки, които експресират BAFF и/или BAFF-R.

Могат да се използват също така състави от изобретението, включващи BAFF-R агонисти (такива като антитела, които се свързват с BAFF-R и имитиращи BAFF), за лечение на имунна недостатъчност, която се характеризира например с малки количества от В клетки. Такива нарушения

могат да бъдат причинени, например от радиация и/или хемотерапия.

В друг вариант от изобретението се осигурява метод за намаляване на агрегацията на рекомбинантно експресиран белтък. Методът включва сравняване на хомолози на белтък или негов рекомбинантен белтък, за определяне на консервативни домени и неидентични аминокиселини в консервативните области. Най-общо поне една не полярна аминокиселина е заменена с незаредена полярна аминокиселина или с пролин, аланин или серин.

Ако не е определено нещо друго, всички използвани тук технически и научни термини имат същото значение, което обикновено е ясно за специалистите в областта, за които е предназначено това изобретение. Въпреки че методите и материалите сходни или равностойни на тези, описани тук в изобретението могат да се използват в практиката или да се анализират от настоящото изобретение, по-долу са описани подходящи методи и материали. Всички публикации, патентни заявки, патенти и други източници споменати тук са включени изцяло тук в справката. В случай на противоречие, настоящата спецификация, включваща определения, ще бъде под контрол. В допълнение, материалите, методите и примерите са само илюстративни и нямат за цел да бъдат ограничаващи.

Други характеристики и предимства на изобретението ще станат очевидни от следното подробно описание и от претенциите.

КРАТКО ОПИСАНИЕ НА ФИГУРИТЕ

Фигура 1А показва секвенцията на ДНК на BJAB кДНК (SEQ ID NO:1), клонирана в pJST576.

Фигура 1В показва пълната ДНК секвенция на кДНК от IMAGE клонът 2000271 (EST AI250289) (SEQ ID NO:2).

Фигура 2А показва нуклеотидната секвенция на JST576 с отстранен интрон, както е предсказано чрез програмата GENESCAN (SEQ ID NO:3).

Фигура 2В показва 1 % агарозен гел на PCR продукти, получени за BAFF-R, като се използва или първата кДНК верига, получена от BJAB или IM-9 РНК, или от JST576 кДНК. Старт 1. Ламбда ДНК, накъсана с Hind III. Старт 2. BJAB олиго dT праймиран BAF-225/BAF-191. Старт 3. BJAB олиго dT праймиран BAF-226/BAF-191. Старт 4. BJAB произволно праймиран BAF-225/BAF-191. Старт 5. BJAB произволно праймиран BAF-226/BAF-191. Старт 6. IM-9 олиго dT праймиран BAF-225/BAF-191. Старт 7. IM-9 олиго dT праймиран BAF-226/BAF-191. Старт 8. IM-9 произволно праймиран BAF-225/BAF-191. Старт 9. IM-9 произволно праймиран BAF-226/BAF-191. Старт 10. JST576 кДНК BAF-225/BAF-191. Старт 11. JST576 кДНК BAF-226/BAF-191. Старт 12. Няма матрична BAF-225/BAF-191. Старт 13. Няма матрична BAF-226/BAF-191.

Фигура 2С показва зрялата JST576 (BAFF-R) секвенция (SEQ ID NO:4) (също така GenBank № за достъп AF373846), определена чрез секвениране на целия PCR продукт, фланкиращ предсказания интрон от BJAB първата кДНК верига.

Фигура 2D показва аминокиселинната секвенция на BAFF-R (JST576) (SEQ ID NO:5). По-тъмният А (Ala) остатък

показва секвенцията, получена от използването на алтернативното сплайс акцепторно място. Предсказаният трансмембранен домен е очертан в рамка и е подчертан предполагаемият стоп сигнал за пренасяне.

Фигура 3 показва сплайсирана версия на JST576 (SEQ ID NO:6), съдържаща 5' UTR секвенция, получена чрез RT-PCR от първата верига на кДНК от далак на човек и получената по пътя на дедукция аминокиселинна секвенция (SEQ ID NO:7). Тази секвенция съдържа upstream стоп кодон в рамка с ATG.

Фигура 4A показва секвенцията на миша BAFF-R кДНК (SEQ ID NO:8) (също така GenBank № на достъпа AF373847).

Фигура 4B показва аминокиселинната секвенция на миши BAFF-R (SEQ ID NO:9). Cys остатъците са с по-тъмен контур и са подчертани, а предсказаната трансмембранна област е очертана в рамка.

Фигура 4C показва хомологията между човешката (SEQ ID NO:10) и мишата (SEQ ID NO:9) BAFF-R белтъчни секвенции.

Фигура 5 показва човешки BAFF свързан с JST576 трансфектирани клетки. 293EBNA клетки са ко-трансфектирани с pJST576 или със CA336 (hu TACI) и GFP репортерен конструкт. Клетките се анализират за BAFF свързване с 1ug/ml биотинилиран myc-hu BAFF, последван от SAV-PE.

Фигура 6 показва човешки и миши BAFF свързан с JST576 трансфектирани клетки. 293EBNA клетки са ко-трансфектирани с pJST576 и GEP репортерен конструкт. Клетките се анализират 24 часа по-късно за BAFF свързване с 5ug/ml flag-hu BAFF, или flag-mu BAFF, последван от анти-flag моноклонално антитяло M2 и магарешко анти-мишо IgG-PE.

Фигура 7 показва, че APRIL не се свързва със JST576 трансфектирани клетки. 293EBNA клетки са ко-трансфектирани с pJST576 или със CA336 (hu TACI) и GFP репортерен конструкт. Клетките се анализират за APRIL свързване с 1ug/ml myc-mu APRIL, последван от анти-mu APRIL, плъши IgG2b, биотинилирано анти-плъшо FcG2b и SAV-PE.

Фигура 8 показва че BAFF преципитира белтък от JST576 трансфектирани клетки. 293EBNA клетки са ко-трансфектирани или с BAFF-R (pJST576) или само с вектор (CH269), или с hu TACI (CA336) и са белязани със ^{35}S цистеин и метионин. Екстрактите се имунопреципитират с flag-huBAFF и се анализират върху SDS-PAGE гел при редуциращи условия. От лявата страна са показани молекулните маси на маркерите.

Фигура 9 показва секвенция от нуклеинова киселина (SEQ ID NO:11) и получената от нея аминокиселинна секвенция (SEQ ID NO:12) на ген, кодиращ човешки BAFF-R:Fc: остатъците от нуклеинова киселина 1-63 кодират миша IgG-kappa сигнална секвенция; остатъците от нуклеинова киселина 64-66 са използвани за въвеждане на рестриктазно ензимно място, остатъците от нуклеинова киселина 67-276 кодират част от BAFF-R извънклетъчния домен, остатъците от нуклеинова киселина 277-279 се използват за въвеждане на рестриктазно ензимно място, а остатъците от нуклеинова киселина 280-960 кодират Fc област от човешки IgG1.

Фигура 10 показва резултатите от анализа с Northern блот, като се използва EcoNI фрагмент от JST56 като сонда. Всички експонации са за 4 дни. 10A: Clontech човешки имунен II блот; 10B: Clontech човешки 12 стартов мулти-тъканен блот; 10C: Clontech човешки мулти-тъканен блот.

Фигура 11 показва резултата от анализа с Northern блот от 20 μg тотална РНК, изолирана от различни клетъчни линии. Блотът е проведен със сонда EcoNI рестриктазен фрагмент от JST576 и е експониран за 4 дни. Способността на клетъчните линии да се свързват с BAFF, което се определя чрез FACS анализ, е показана под старта.

Фигура 12 показва резултатите от имунопреципитацията, чрез използване на BAFF-R:Fc. Човешки BAFF е имунопреципитиран с BAFF-R:Fc или с BCMA:Fc, но не с Fn14-Fc. BAFF белтъкът като контрола е показан на старт 1.

Фигура 13 показва, че човешкият BAFF-R:Fc блокира свързването на човешки BAFF с BJAB клетки. Резултатите от FACS анализа са показани на Фигура 13A. Кривата E показва свързването на биотинилиран BAFF с BJAB клетки, в отсъствие на BAFF-R:Fc. Кривите B-D показват способността на BAFF да се свързва с BJAB клетки, в присъствие съответно на 5 ug/ml, 1 ug/ml или 0.2 ug/ml. Кривата A е крива само от втория етап. Фигура 13B показва способността на различни концентрации от BAFF-R:Fc (квадратчета) в сравнение с TACI:Fc (триъгълничета) или неспецифичен рекомбинантен белтък, LT_ R:Fc (кръгчета), да блокират свързването на BAFF с рецептора експресиран от BJAB клетки.

Фигура 14 показва способността на BAFF-R:Fc да блокира успоредно индуцираните от BAFF B клетки от далака. Показана е диаграма на включването на [^{3}H] (срм) спрямо увеличаващите се количества от hBAFF (ng/ml).

Фигура 15 показва, че третирането на BAFF-R:Fc1 води до загуба на периферни B клетки в нормални мишки.

Фигура 16 показва, че третирането на мишки с човешки или миши BAFF-R:Fc, редуцира броят на B220+ B клетки от далак.

Фигура 17 показва, че прилагането на BAFF-R:Fc върху мишки, редуцира процента на B220+ B клетки от лимфен възел.

Фигура 18 показва, че прилагането на BAFF-R:Fc върху мишки, редуцира периферните кръвни B220+ B клетки.

Фигура 19A показва данни от FACS от супернатанти от 4 клона, които продуцират антитела, които се свързват с BAFF-R. Показана е също така супернатанта от контрола, която не съдържа антитела, които се с свързват BAFF-R.

Фигура 19B показва хистограма, сочеща два клона, които блокират свързването на BAFF с BAFF-R. (a) е без BAFF контрола; (b) показва блокиращата способност на антитялото от клон 2; (c) показва блокиращата способност на антитялото от клон 9; и (d) показва кривата от контролно антитяло, което не се свързва с BAFF-R.

Фигура 20 показва съпоставяне на аминокиселинните секвенции на човешки BAFF-R:Fc (hBAFF-R) и миши BAFF-R:Fc (mBAFF-R) извънклетъчни домени и процента на агрегация, наблюдаван при експресия на Fc рекомбинантните белтъци, съдържащи посочените секвенции. Номерираните JST клонове представляват аминокиселинните секвенции, показващи мутации (посочени чрез подчертаване) в родителските секвенции и полученото агрегиране от експресирания белтък. Показани са частично секвенциите от човешки (SEQ ID NO:13) и миши (SEQ ID NO:14) BAFF-R; и съответните части от следните клонове: JST659 (SEQ ID NO:15), JST660 (SEQ ID NO:16), JST661 (SEQ ID NO:17), JST662 (SEQ ID NO:18), JST663 (SEQ ID NO:19), JST673 (SEQ

ID NO:20), JST674 (SEQ ID NO:21), JST675 (SEQ ID NO:22), JST672 (SEQ ID NO:23), JST676 (SEQ ID NO:24), JST671 (SEQ ID NO:25), JST677 (SEQ ID NO:26), JST678 (SEQ ID NO:27), JST664 (SEQ ID NO:28), JST668 (SEQ ID NO:29), JST665 (SEQ ID NO:30), JST666 (SEQ ID NO:31) и JST667 (SEQ ID NO:32).

Фигура 21 показва авторадиография на имунопреципитирани белтъци, чрез използване на лизати, получени от BAFF-R-i.c.d.(BAFF-R вътреклетъчен домен) (старт 1), или трансфектирани с контролен вектор клетки - (старт 2). Приблизително 6 x 10^6 293E клетки са трансфектирани с конструкт, кодиращ BAFF-R-i.c.d. или с mock плазмид. След 48 часа, клетките се бележат метаболитно със ^{35}S за 24 часа, лизират се с лизис буфер, пречистват се предварително и се имунопреципитират с анти-myc mAb, 9E10. Имунопреципитатите се разделят чрез 10-20 % SDS PAGE при редуциращи условия.

ПОДРОБНО ОПИСАНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Цитираните работи, патенти, патентни заявки и научна литература, включваща номера на достъпа до GenBank данни за секвенциите, които са цитирани тук, показват знанията на специалистите от областта на техниката и следователно са включени тук от източника в пълен текст, така както специфично и поотделно е посочено за всяка една от тези справки да бъде включена от източника. Всеки конфликт между който и да е от източниците цитирани тук и специфичните техники от тази спецификация, ще бъдат разрешени в полза на последната. По подобен, начин всеки конфликт между даденото от нивото на техниката определение за дума или фраза и

определение на дума или фраза посочено специфично тук в спецификацията, ще бъде разрешен в полза на последната.

Цитираните стандартни работи излагащи общите принципи на рекомбинантна ДНК технология, известни на специалистите в областта включват Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York (1998); Sambrook et al., MOLECULAR CLONING : A LABORATORY MANUAL, 2D ED., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York (1989); Kaufman et al., Eds., HANDBOOK OF MOLECULAR AND CELLULAR METHODS IN BIOLOGY AND MEDICINE, CRC Press, BocaRaton (1995); McPherson, Ed., DIRECTED MUTAGENESIS: A PRACTICAL APPROACH, IRL Press, Oxford (1991).

Настоящото изобретение описва BAFF-R нуклеинови киселини, изолирани нуклеинови киселини, които кодират BAFF-R полипептид или негова част, BAFF-R полипептиди, вектори, съдържащи тези нуклеинови киселини, клетки на гостоприемника трансформирани с BAFF-R нуклеиновите киселини, анти- BAFF-R антитела и фармацевтични състави. Описани са също така методи за получаване на BAFF-R полипептиди, така както и методи за скриниране, диагностициране, условия за лечение използващи тези съединения и методи за скриниране на съединения, които модулират BAFF-R полипептидната активност.

BAFF-R нуклеиновите киселини и полипептидите, така както и BAFF-R антителата, така както и дискутираните тук фармацевтични състави, са полезни, между другото за лечение на рак и/или заболявания свързани с имунната регулация. Тези нарушения включват, например В-клетъчно медиирани болести, които са автоимунни по природа, такива като системик лупус

еритематозус, ревматоидна артритна миастения гравис, автоимунна хемолитична анемия, идиопатична тромбоцитопения пурпура, анти-фосфолипиден синдром, болест на Chaga, болест на Grave, грануломатозис на Wagener, полиартеритна нодоза и бързи прогресиращи гломерулонефрити. Това терапевтично средство може да се прилага също така при нарушения на плазматичните клетки, такива като мултитиплена миелома, макроглобулинемия на Waldenstrom, болест на тежката верига, първични или имуноцит-свързани амилоидози и моноклонална гамопатия с неопределена значимост (MGUS). Онкологичните мишени включват В клетъчни карциноми, левкемии и лимфоми.

BAFF-R нуклеинови киселини

Един вариант от изобретението се отнася до изолиране на молекули нуклеинова киселина, които кодират BAFF-R белтъци или техни биологично активни части. Включени са също така фрагменти от нуклеинова киселина, необходими за използването им като хибридизационни сонди, за идентифициране на кодиращите BAFF-R нуклеинови киселини (например, BAFF-R иРНК) и фрагменти за използването им като праймери за полимеразно верижна реакция (PCR) за амплифициране или мутации на BAFF-R молекулите нуклеинова киселина. Използваният тук термин "молекула нуклеинова киселина" има за цел да включва ДНК молекули (например кДНК или геномна ДНК), РНК молекули (например иРНК), аналози на ДНК или РНК, получени чрез използването на нуклеотидни аналози и производни, фрагменти или техни хомолози. Молекулата нуклеинова киселина може да е

едноверижна или двойноверижна, но за предпочитане е да е двойноверижна ДНК.

Терминът "сонди" се отнася до секвенции от нуклеинови киселини с различна дължина, за предпочитане между поне от около 10 нуклеотида (nt), или например около 6, 000 nt, в зависимост от използването. Сондите се използват за откриване на идентични, сходни или комплиментарни секвенции от нуклеинови киселини. Сондите с по-голяма дължина получени обикновено от естествен или рекомбинантен източник, са силно специфични и хибридизират много по-бавно от олигомерите. Сондите могат да бъдат едно- или двуверижни и се проектират така, че да са специфични за PCR, за мембранно-базирани хибридизационни технологии, или подобни на ELISA технологии.

Молекула "изолирана" нуклеинова киселина е тази, която е отделена от другите молекули нуклеинови киселини, които присъстват в естествения източник от нуклеинова киселина. Примери за изолиране на молекули нуклеинова киселина включват, но не се ограничават само до, рекомбинантни ДНК молекули съдържащи се във вектор, рекомбинантни ДНК молекули, поддържани в хетероложна клетка на гостоприемник, частично или напълно пречистени молекули от нуклеинови киселини и синтетични ДНК или РНК молекули. За предпочитане е "изолираната" нуклеинова киселина да е свободна от секвенции, които нормално фланкират нуклеиновата киселина (т.е. секвенции локализирани в 5' и 3' краищата на нуклеиновата киселина) в геномната ДНК на организма, от който е получена нуклеиновата киселина. Например, в различни варианти, изолираната BAFF-R молекула нуклеинова киселина може да съдържа по-малко от около 50 kb,

25 kb, 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0.5 kb или 0.1 kb от нуклеотидните секвенции, които нормално фланкират молекулата от нуклеинова киселина в геномната ДНК на клетката, от която е получена нуклеиновата киселина. Освен това "изолираната" молекула нуклеинова киселина, такава като кДНК молекула, може да е свободна фактически от друг клетъчен материал или културална среда, когато се получава чрез рекомбинантните техники или от химични прекурсори или други химикали, когато се синтезира по химичен път.

Молекула от нуклеинова киселина от настоящото изобретение, например молекула нуклеинова киселина, притежаваща нуклеотидна секвенция от Фигура 1A (SEQ ID NO:1), Фигура 1B (SEQ ID NO:2), Фигура 2A (SEQ ID NO:3), Фигура 2C (SEQ ID NO:4) и Фигура 3 (SEQ ID NO:6) или комплиментарна на всяка една от тези нуклеотидни секвенции, може да се изолира, като се използват стандартните молекулно биологични техники и осигурената тук информация от секвенциите. Като се използват всички или част от секвенциите на нуклеиновата киселини от Фигура 1A, B, 2A, C и 3 като хибридизационна сонда, могат да се изолират секвенциите от BAFF-R нуклеинова киселина, чрез използване на техниките за стандартна хибридизация и клониране (например както е описано в Sambrook et al., Eds., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL 2ND ED., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989; and Ausubel, et al., Eds., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, NY, 1993).

Нуклеиновата киселина от изобретението може да бъде амплифицирана чрез използване на кДНК, иРНК или съответно, геномна ДНК като матрица и подходящи олигонуклеотидни

праймери, съгласно стандартните PCR техники за амплификация. Така амплифицираната нуклеинова киселина може да бъде клонирана в подходящ вектор и характеризирана чрез секвенционен анализ на ДНК. Освен това олигонуклеотиди съответстващи на BAFF-R нуклеотидни секвенции, могат да се получат чрез стандартните техники за синтез, например чрез използване на автоматизиран ДНК синтезатор.

Използваният тук термин "олигонуклеотид", се отнася до серии от свързани нуклеотидни остатъци, който олигонуклеотид има достатъчен брой нуклеотидни бази, за да се използва при PCR реакцията. Къса олигонуклеотидна секвенция може да е на базата на, или проектирана от, геномна или кДНК секвенция и се използва, за амплифициране, потвърждаване или разкриване присъствието на идентична, сходна или комплиментарна ДНК или РНК в отделна клетка или тъкан.

Олигонуклеотидите включват части от секвенция от нуклеинова киселина, притежаваща поне около 10 nt или 50 nt, за предпочитане около 15 nt до 30 nt. Те могат да бъдат синтезирани по химичен път и могат да се използват като сонди.

В друг вариант, изолираната молекула нуклеинова киселина от изобретението включва молекула нуклеинова киселина, която е комплиментарна на нуклеотидната секвенция, посочена на Фигура 1A (SEQ ID NO:1), Фигура 1B (SEQ ID NO:2), Фигура 2A (SEQ ID NO:3), Фигура 2C (SEQ ID NO:4) и Фигура 3 (SEQ ID NO:6). В друг вариант изолираната молекула нуклеинова киселина от изобретението включва молекула нуклеинова киселина, която е комплиментарна на нуклеотидната секвенция, посочена на Фигура 1A (SEQ ID NO:1), Фигура 1B (SEQ ID NO:2), Фигура 2A (SEQ ID NO:3),

Фигура 2C (SEQ ID NO:4) и Фигура 3 (SEQ ID NO:6) или на част от тази нуклеотидна секвенция. Молекула нуклеинова киселина, която е комплиментарна на нуклеотидната секвенция показана на Фигура 1A (SEQ ID NO:1), Фигура 1B (SEQ ID NO:2), Фигура 2A (SEQ ID NO:3), Фигура 2C (SEQ ID NO:4) и Фигура 3 (SEQ ID NO:6) е тази, която е достатъчно комплиментарна на нуклеотидната секвенция показана на Фигура 1A (SEQ ID NO:1), Фигура 1B (SEQ ID NO:2), Фигура 2A (SEQ ID NO:3), Фигура 2C (SEQ ID NO:4) и Фигура 3 (SEQ ID NO:6), че тя може да се свързва с водородна връзка със малко съответстваща или не съответстваща на нуклеотидната секвенция, показана на Фигура 1A (SEQ ID NO:1), Фигура 1B (SEQ ID NO:2), Фигура 2A (SEQ ID NO:3), Фигура 2C (SEQ ID NO:4) и Фигура 3 (SEQ ID NO:6), като по този начин формира стабилен дуплекс.

Използваният тук термин "комплиментарна" се отнася до Watson-Crick или Hoogsten свързване на нуклеотидни бази между нуклеотидни единици от молекула нуклеинова киселина, а терминът "свързване" означава физично или химично взаимодействие между два полипептида или съединения или свързани полипептиди или съединения или техни комбинации. Свързването включва йонни, не-йонни, Вандервалсови, хидрофобни взаимодействия, и т.н. Физичното взаимодействие може да бъде или директно, или индиректно. Индиректните взаимодействия могат да бъдат чрез или дължащи се на ефектите на друг полипептид или съединение. Директното свързване се отнася до взаимодействия, които не стават чрез, или не се дължат на ефекта на друг полипептид или съединение, но в замяна на това са фактически без други химически междинни продукти.

Освен това, молекулата нуклеинова киселина от изобретението може да включва само част от секвенцията на нуклеинова киселина от Фигура 1A (SEQ ID NO:1), Фигура 1B (SEQ ID NO:2), Фигура 2A (SEQ ID NO:3), Фигура 2C (SEQ ID NO:4) и Фигура 3 (SEQ ID NO:6), например фрагмент, който може да бъде използван като сонда или праймер или фрагмент, кодиращ биологично активна част от BAFF-R.

Осигурените тук фрагменти са определени като секвенции поне от 6 (близки) нуклеинови киселини или поне от 4 (близки) аминокиселини, с дължина достатъчна, за да се осигури респективно специфична хибридизация в случай на нуклеинови киселини или за специфично разпознаване на епитоп в случай на аминокиселини, и в най-добрият случай са известна част по-малка от пълната дължина на секвенцията. Фрагментите могат да се получат по избор от която и да е съседна част от секвенция на нуклеинова киселина или аминокиселинна секвенция. Производните са секвенции от нуклеинова киселина или аминокиселинни секвенции, формирани от естествени съединения или директно или чрез модифициране или частично заместване. Аналозите са секвенции от нуклеинови киселини или аминокиселинни секвенции, които имат структура сходна с, но не идентична с, естественото съединение, но различаваща от него по отношение на някои компоненти или странични вериги. Аналозите могат да бъдат синтетични или от различен еволюционен произход и могат да имат сходна или противоположна метаболитна активност, в сравнение с дивия тип.

Производните или аналозите могат да бъдат с пълната си дължина или с друга различна от нея, ако производното или аналога съдържат модифицирана нуклеинова киселина или

аминокиселина, както е описано по-долу. Производните или аналозите от нуклеинови киселини или белтъци от изобретението включват, но не се ограничават само до, молекули, включващи области, които фактически са хомоложни на нуклеиновите киселини или белтъците от изобретението, в различни варианти, поне с около 45 %, 50 %, 70 %, 80 %, 95 %, 98 %, или дори 99 % идентичност (с предпочитана идентичност от 80-99 %) от нуклеиновата киселина или аминокиселинната секвенция с идентичен размер, или когато се сравнява със съответна секвенция, в която съпоставимостта е направена чрез компютърна програма за хомоложност, известна от областта на техниката, или чиято кодираща нуклеинова киселина е способна да хибридизира с комплиментарната секвенция, кодираща гореспоменатите белтъци при строго определени условия, или при средни или ниски по сила условия. Виж например Ausubel, et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, NY, 1993, и по-долу. Една примерна програма е програмата Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for UNIX, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison, WI), като се използват стандартни условия, които използват алгоритъма на Smith и Waterman (1981) Adv. Appl. Math., 2:482-489, като цялата е включена тук в справката).

"Хомоложна секвенция от нуклеинова киселина" или "хомоложна аминокиселинна секвенция" или техни вариации, се отнасят до секвенции, характеризирани чрез хомология на ниво нуклеотиди или на аминокиселинно ниво, както се дискутира по-горе. Хомоложните нуклеотидни секвенции кодират тези секвенции, кодиращи изоформи на BAFF-R полипептида. Изоформите могат да се експресират в различни

тъкани на един и същ организъм като резултат от, например алтернативен сплайсинг на РНК. Съответно, изоформите могат да са кодирани от различни гени. В настоящото изобретение хомоложни нуклеотидни секвенции включват нуклеотидни секвенции, кодиращи BAFF-R полипептида от видове, различни от човека, включващи, но не ограничаващи се само до, бозайници и следователно могат да включват например, мишка, плъх, заек, куче, котка, крава, кон и други организми. Хомоложни нуклеотидни секвенции включват също така, но не се ограничават само до, естествено срещащи се алелни варианти и мутации на нуклеотидните секвенции изброени тук. Хомоложната нуклеотидна секвенция обаче не включва нуклеотидната секвенция, кодираща човешки BAFF-R белтък. Хомоложните секвенции от нуклеинови киселини включват тези секвенции от нуклеинови киселини, които кодират консервативни аминокиселинни заместявания (виж по-долу) на Фигура 2D (SEQ ID NO:5), така както и полипептид притежаващ BAFF-R активност. Хомоложната аминокиселинна секвенция не кодира аминокиселинната секвенция на човешки BAFF-R полипептид.

Нуклеотидната секвенция определена от клонирането на човешки BAFF-R ген, позволява получаването на сонди и праймери, които са проектирани за използване на идентифицирането и/или клонирането на BAFF-R хомолози в други типове клетки, например, от други тъкани, така както и BAFF-R хомолози от други бозайници. Нормално сондата/праймера включва по същество пречистен олигонуклеотид. Нормално олигонуклеотидът включва област от нуклеотидна секвенция, която хибридизира при строго специфични условия, с поне около 12, 25, 50, 100, 150, 200, 250,

300, 350 или 400 последователна сенс верига от нуклеотидна секвениця от която и да е от Фигура 1A (SEQ ID NO:1), Фигура 1B (SEQ ID NO:2), Фигура 2A (SEQ ID NO:3), Фигура 2C (SEQ ID NO:4) и Фигура 3 (SEQ ID NO:6), или анти-сенс верига от нуклеотидна секвенция от която и да е от Фигура 1A (SEQ ID NO:1), Фигура 1B (SEQ ID NO:2), Фигура 2A (SEQ ID NO:3), Фигура 2C (SEQ ID NO:4) и Фигура 3 (SEQ ID NO:6), или от естествено срещащ се мутант от която и да е от Фигура 1A (SEQ ID NO:1), Фигура 1B (SEQ ID NO:2), Фигура 2A (SEQ ID NO:3), Фигура 2C (SEQ ID NO:4) и Фигура 3 (SEQ ID NO:6).

Сонди на базата на човешката BAFF-R нуклеотидна секвенция могат да се използват, за да се детектират транскрипти или геномни секвенции, кодиращи същите или хомоложни белтъци. В различни варианти, сондата освен това включва белязана група, прикрепена към нея, например белязаната група може да бъде радиоизотопно, флуоресцентно съединение, ензим или ензимен ко-фактор. Такива сонди могат да се използват като част от диагностичен кит за анализ, за идентифициране на клетки или тъкани, които не експресират BAFF-R белтък, такива като чрез измерване нивото на BAFF-R кодиращата нуклеинова киселина в проба от клетки от обект, например определяйки нивата на BAFF-R иРНК или определяйки дали геномния BAFF-R ген е мутирал или е премахнат.

“Полипептид притежаващ биологично активна част от BAFF-R”, се отнася до полипептиди, показващи сходна активност, но не непременно идентична с активността на полипептид от настоящото изобретение, включващ зрели форми, измерени чрез специфичен биологичен анализ, с или без дозова зависимост. Фрагментът от нуклеинова киселина,

кодиращ "биологично активна част от BAFF-R", може да се получи чрез изолиране на част от която и да е от Фигура 1A (SEQ ID NO:1), Фигура 1B (SEQ ID NO:2), Фигура 2A (SEQ ID NO:3), Фигура 2C (SEQ ID NO:4) и Фигура 3 (SEQ ID NO:6), която кодира полипептид, притежаващ BAFF-R биологична активност (биологичните активности на BAFF-R белтъците са описани по-долу), експресираща кодираната част от BAFF-R белтък (например, чрез рекомбинантна експресия in vitro) и като се оценява активността на кодираната част от BAFF-R. Например, фрагмент от нуклеинова киселина кодиращ биологично активна част от BAFF-R, може да включва по избор BAFF свързващ домен. В друг вариант, фрагмент от нуклеинова киселина кодиращ биологично активна част от BAFF-R, включва една или повече области.

BAFF-R варианти

Изобретението освен това обхваща молекули от нуклеинови киселини, които се различават от нуклеотидните секвенции показани на Фигура 1A (SEQ ID NO:1), Фигура 1B (SEQ ID NO:2), Фигура 2A (SEQ ID NO:3), Фигура 2C (SEQ ID NO:4) и Фигура 3 (SEQ ID NO:6), вследствие на изродеността на генетичния код. Следователно тези нуклеинови киселини кодират същият BAFF-R белтък, като този кодиран от нуклеотидните секвенции показани на Фигура 1A (SEQ ID NO:1), Фигура 1B (SEQ ID NO:2), Фигура 2A (SEQ ID NO:3), Фигура 2C (SEQ ID NO:4) и Фигура 3 (SEQ ID NO:6). В друг вариант изолирана молекула от нуклеинова киселина от изобретението има нуклеотидна последователност, кодираща

белтък, притежаващ аминокиселинна секвенция показана на Фигура 2D (SEQ ID NO:5).

В допълнение към човешката BAFF-R нуклеотидна секвенция показана на Фигура 1A (SEQ ID NO:1), Фигура 1B (SEQ ID NO:2), Фигура 2A (SEQ ID NO:3), Фигура 2C (SEQ ID NO:4) и Фигура 3 (SEQ ID NO:6), за специалистите в областта е ясно, че в популацията (например човешката популация) може да съществуват секвенционни ДНК полиморфизми, които водят до промени в аминокиселинните последователности на BAFF-R.

Такъв генетичен полиморфизъм в BAFF-R гена може да съществува между индивидите в популацията, дължащ се на естествени алелни вариации. Използваните тук термини "ген" и "рекомбинантен ген", се отнасят до молекули от нуклеинова киселина, включващи отворена рамка за четене, кодираща BAFF-R белтък, за предпочитане BAFF-R белтък от бозайник. Такива естествени алелни вариации могат да доведат нормално до 1-5 % промяна в нуклеотидната секвенция на BAFF-R гена. Всяка една и всички такива нуклеотидни изменения и получените аминокиселинни полиморфизми в BAFF-R, които са резултат от естествена алелна промяна и които не променят функционалната активност на BAFF-R, са предвидени да са в обхвата на изобретението.

Освен това, молекулите от нуклеинова киселина, кодиращи BAFF-R белтъци от други видове и следователно които имат нуклеотидна секвенция, която се различава от човешките секвенции на Фигура 1A (SEQ ID NO:1), Фигура 1B (SEQ ID NO:2), Фигура 2A (SEQ ID NO:3), Фигура 2C (SEQ ID NO:4) и Фигура 3 (SEQ ID NO:6) са предвидени да са в обхвата на изобретението. Молекулите от нуклеинова киселина, съответстващи на естествените алелни варианти и хомоложни

на BAFF-R кДНК от изобретението, могат да бъдат изолирани на базата на тяхната хомология с описаните тук човешки BAFF-R нуклеинови киселини, като се използват човешки кДНК-и, или техни части като хибридизационна сонда, съгласно стандартните хибридизационни техники, при строго определени условия за хибридизация. Например, разтворима човешка BAFF-R кДНК може да се изолира въз основа на нейната хомология с човешки мембранно-свързан BAFF-R. По подобен начин може да се изолира, мембранно-свързана човешка BAFF-R кДНК, въз основа на нейната хомология с разтворим човешки BAFF-R.

Съответно, в друг вариант, изолирана молекула от нуклеинова киселина от изобретението е с дължина поне от 6 нуклеотида и хибридизира при строго определени условия с молекула нуклеинова киселина, включваща нуклеотидна секвенция от всяка една от Фигура 1A (SEQ ID NO:1), Фигура 1B (SEQ ID NO:2), Фигура 2A (SEQ ID NO:3), Фигура 2C (SEQ ID NO:4) и Фигура 3 (SEQ ID NO:6). В друг вариант, нуклеиновата киселина е с дължина поне от 10, 25, 50, 100 250 или 500 нуклеотида. В друг вариант изолираната молекула от нуклеинова киселина от изобретението хибридизира с кодиращата област. Използваният тук термин “хибридизира при строго определени условия” има за цел да опише условията за хибридизация и измиването, при които нуклеотидните секвенции, които са поне 60 % хомоложни една с друга, остават нормално хибридизирани една с друга.

Хомоложни (т. е. нуклеинови киселини кодиращи BAFF-R белтъци, получени от видове, различни от човек) или други сходни секвенции (например, paralogs), могат да се получат при меки, средни или строго определени условия на хибридизация с

цялата или с част от специфичната човешка секвенция като сонда, чрез използване на методите добре познати в областта за хибридизиране и клониране на нуклеинови киселини.

Използваната тук фраза "строго определени хибридизационни условия" се отнася до условия, при които сонда, праймер или олигонуклеотид ще хибридизира със своята прицелна секвенция, но не и с други секвенции. Строго определените условия са секвенционно-зависими и ще бъдат различни при различни обстоятелства. По-дългите секвенции хибридизират специфично при по-висока температура отколкото по-късите секвенции. Най-общо, строго определени условия са избрани да са около 5° С по-ниски отколкото температурната точка на топене (Tm) за специфичната секвенция, при определена йонна сила и pH. Tm е температурата (при определени йонни условия, pH и концентрация на нуклеинова киселина), при която 50 % от сондите комплиментарни на прицелната секвенция, хибридизират с прицелната секвенция при равновесие. Тъй като прицелните секвенции присъстват обикновено в излишък, при Tm 50 % от сондите са ангажирани при равновесие. Нормално, строго определени условия ще бъдат тези при които солевата концентрация е по-малка от около 1.0 M натриев йон, типично около 0.01 до 1.0 M натриев йон (или други соли), при pH 7.0 до 8.3 и температурата е поне около 30° С за късите сонди, праймери или олигонуклеотиди (например 10 nt до 50 nt) и поне около 60° С за по-дълги сонди, праймери или олигонуклеотиди. Строго определени условия могат да се постигнат също така с добавяне на дестабилизиращи вещества, такива като формамид.

Строго определените условия са известни на специалистите в областта и могат да се намерят в CURRENT

PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6

За предпочитане е условията да са такива, че секвенциите поне около 65 %, 70 %, 75 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % или 99 % хомоложни една с друга, нормално да остават хибридизирани една с друга. Неограничаващ пример за строго определени хибридизационни условия е хибридизация във високо солеви буфер, включващ 6 X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.02 % PVP, 0.02 % Фикол, 0.02 % BSA и 500 mg/ml денатурирана при 65° C ДНК от сперма на пъстърва. След хибридизацията следват едно или две измивания в 0.2 X SSC, 0.01 % BSA при 50° C. Изолираната молекула нуклеинова киселина от изобретението, която хибридизира при строго определени условия със секвенцията от SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, отговаря на естествено срещаща се молекула нуклеинова киселина. Използваният тук термин "естествено-срещаща се" молекула нуклеинова киселина, се отнася до РНК или ДНК молекула, притежаваща нуклеотидна секвенция, която се среща в природата (например кодираща естествен белтък).

Във втори вариант, се осигурява секвенция от нуклеинова киселина, която хибридизира с молекулата нуклеинова киселина, включваща нуклеотидната секвенция от всяка една от Фигура 1A (SEQ ID NO:1), Фигура 1B (SEQ ID NO:2), Фигура 2A (SEQ ID NO:3), Фигура 2C (SEQ ID NO:4) и Фигура 3 (SEQ ID NO:6), или нейни фрагменти, аналози или производни при определени средни условия. Неограничаващ пример за хибридизация при определени средни условия е хибридизация в 6 X SSC, 5 X Denhardt разтвор, 0.5 % SDS и 100 mg/ml денатурирана при 55° C ДНК от сперма на пъстърва, последвана

от еднf или повече измивания в 1 X SSC, 0.1 % SDS при 37° C. Други средни по сила условия, които могат да се използват, са добре познати от нивото на техниката. Виж например Ausubel, et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, NY, 1993; и Kriegler, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY, 1990.

В трети вариант, се осигурява нуклеинова киселина, която може да хибридизира с молекулата нуклеинова киселина, включваща нуклеотидната секвенция от всяка една от Фигура 1A (SEQ ID NO:1), Фигура 2B (SEQ ID NO:2), Фигура 2A (SEQ ID NO:3), Фигура 2C (SEQ ID NO:4) и Фигура 3 (SEQ ID NO:6), или нейни фрагменти, аналози или производни при определени ниски условия. Неограничаващ пример за хибридизация при определени ниски условия е хибридизация в 35 % формамид, 5 X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 0.02 % PVP, 0.02 % Фикол, 0.2 BSA, 100 mg/ml денатурирана ДНК от сперма на пъстърва, 10 % (wt/vol) декстран сулфат, при 40° C, последвана от едно или повече измивания в 2 X SSC, 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM EDTA и 0.1 % SDS при 50° C. Други ниски по сила условия, които могат да се използват, са добре познати от нивото на техниката (например, както тези които се използват за крос-специфични хибридизации). Виж например Ausubel, et al., Eds., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, NY, 1993; и Kriegler, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY, 1990; Shilo and Weinberg (1981), Proc. Natl. Acad. Sci., USA 78:6789-6792.

Консервативни мутации

В допълнение към естествено срещащите се алелни варианти на BAFF-R секвенцията, които могат да съществуват в популацията, специалистите в областта ще оценят по-късно, че промените могат да бъдат въведени чрез мутация в нуклеотидната секвенция от Фигура 2A (SEQ ID NO:3), Фигура 2C (SEQ ID NO:4) и Фигура 3 (SEQ ID NO:6), което по-нататък води до промени в аминокиселинната секвенция на кодирания BAFF-R белтък, без да се променя функционалната способност на BAFF-R белтъка. Например, могат да се направят нуклеотидни заместявания, водещи до аминокиселинни заместявания в "не-съществени" аминокиселинни остатъци, в секвенциите от всяка една от Фигура 2A (SEQ ID NO:3), Фигура 2C (SEQ ID NO:4) и Фигура 3 (SEQ ID NO:6). "Не-съществен" аминокиселинен остатък е остатък, който може да е променен от див тип секвенцията на BAFF-R, без да се променя биологичната активност, докато "съществен" аминокиселинен остатък е необходим за биологичната активност. Например, предсказано е, че особено аминокиселинните остатъци, които са консервативни сред BAFF-R белтъците от настоящото изобретение, не са податливи на промени.

В допълнение, предсказано е също така, че специално аминокиселинните остатъци, които са консервативни сред представители от семейството но BAFF-R белтъците от изобретението не са податливи на промени. Например, BAFF-R белтъците от настоящото изобретение, могат да съдържат поне един домен, който е типична консервативна област за представителите на TNF семейството. Като такива, малко вероятно е тези консервативни домени да се поддават на

мутация. Други аминокиселинни остатъци обаче, (например тези, които не са консервативни или са само полу-консервативни сред членовете на BAFF-R белтъците) могат да не са съществени за активността и следователно е твърде възможно да са податливи на промени.

Друг вариант от изобретението се отнася до молекули от нуклеинови киселини, кодиращи BAFF-R белтъци, които съдържат промени в аминокиселинните остатъци, които не са съществени за активността. Такива BAFF-R белтъци се различават в аминокиселинната си секвенция от Фигура 2 D (SEQ ID NO:5), като все още запазват биологична активност. В един вариант изолираната молекула нуклеинова киселина включва нуклеотидна секвенция, кодираща белтък, където белтъкът включва аминокиселинна секвенция, поне около 45 % хомоложна на аминокиселинната секвенция от Фигура 2D (SEQ ID NO:5). За предпочитане е белтъкът кодиран от молекулата нуклеинова киселина да е поне около 60 % хомоложен на Фигура 2D (SEQ ID NO:5), още по-добре да е поне около 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, а най-добре е да е поне около 99 % хомоложен на Фигура 2D (SEQ ID NO:5).

Изолирана молекула нуклеинова киселина, кодираща BAFF-R белтък, хомоложен на белтъка от Фигура 2D, може да се създаде, чрез въвеждане на едно или повече нуклеотидни замествания, чрез добавяния или делеции в нуклеотидната секвениця на Фигура 2A (SEQ ID NO:3), Фигура 2C (SEQ ID NO:4) и Фигура 3 (SEQ ID NO:6), така че в кодирания белтък се въвеждат едно или повече аминокиселинни замествания, добавения или делеции.

Могат да бъдат въведени мутации във Фигура 2A (SEQ ID NO:3), Фигура 2C (SEQ ID NO:4) или Фигура 3 (SEQ ID NO:6),

например чрез стандартни техники, такива като място-насочен мутагенезис и PCR-медииран мутагенезис. За предпочитане е консервативните аминокиселинни заместявания да се правят в един или повече предсказани не-съществени аминокиселинни остатъка. "Консервативно аминокиселинно заместване" е това, при което аминокиселинният остатък е заместен с аминокиселинен остатък, притежаващ сходна странична верига. Семействата от аминокиселинни остатъци, притежаващи сходни странични вериги са определени от нивото на техниката. Тези семейства включват аминокиселини с основни странични вериги (например, лизин, аргинин, хистидин), с кисели странични вериги (например, аспартова киселина, глутамова киселина), с незаредени полярни странични вериги (например, глицин, аспаргин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), с не полярни странични вериги (например, аланин, валин, левцин, изолевцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), с бета-разклонени странични вериги (например, треонин, валин, изолевцин) и с ароматни странични вериги (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, хистидин). Следователно, предсказаният несъществен аминокиселинен остатък в BAFF-R се заменя с друг аминокиселинен остатък от семейството със същата странична верига. Съответно, в друг вариант, мутациите могат да бъдат въведени случайно по дължината на цялата или на част от BAFF-R кодиращата секвенция, например чрез наситен мутагенезис и получените мутанти могат да се скринират за BAFF-R биологична активност, за да се идентифицират мутанти, които запазват активността. Следвайки мутагенезиса на която и да е от Фигура 2A (SEQ ID NO:3), Фигура 2C (SEQ ID NO:4) и Фигура 3 (SEQ ID NO:6), кодираният белтък може да се експресира чрез всяка

една рекомбинантна технология, известна от нивото на техниката и може да се определи активността на белтъка.

В един вариант, може да се анализира мутантен BAFF-R белтък за (1) за способността да образува белтък:белтък взаимодействия с други BAFF-R белтъци, с други клетъчно-повърхностни белтъци или техни биологично активни части, (2) образуване на комплекс между мутантен BAFF-R белтък и BAFF-R лиганд; (3) способността на мутантен BAFF-R белтък да се свързва с вътреклетъчен прицелен белтък или негова биологично активна част; (например авидинови белтъци); (4) способността да свързва BAFF; или (5) способността да се свързва специфично с BAFF-R белтък антитяло.

Изобретението осигурява специфични мутанти, кодиращи BAFF-R:Fc означени полипептиди, за да се облекчи агрегацията на експресиран белтък, като се поддържа BAFF свързващата активност. Такива мутанти включват например, клонове кодиращи аминокиселинните секвенции от JST 661 (SEQ ID NO:17), JST662 (SEQ ID NO:18), JST663 (SEQ ID NO:19), JST673 (SEQ ID NO:20), JST674 (SEQ ID NO:21), JST675 (SEQ ID NO:22), JST672 (SEQ ID NO:23), JST676 (SEQ ID NO:24), JST671 (SEQ ID NO:25), JST677 (SEQ ID NO:26) и JST678 (SEQ ID NO:27). Други варианти включват мутанти, кодиращи BAFF-R или BAFF-R:Fc полипептид, който има сходни характеристики на агрегация с нативния човешки BAFF-R или BAFF-R:Fc полипептид, но свързва също така BAFF, включващ например секвенции, включващи аминокиселинните секвенции от JST659 (SEQ ID NO:15), JST660 (SEQ ID NO:16), JST664 (SEQ ID NO:28), JST668 (SEQ ID NO:29), JST665 (SEQ ID NO:30), JST666 (SEQ ID NO:31), и JST667 (SEQ ID NO:32). Други варианти включват мутанти, кодиращи BAFF-R или

BAFF-R:Fc полипептид, където консервативните аминокиселини между човешки и миши BAFF-R са сменени с други консервативни аминокиселини, и където свързващата активност на BAFF-R или на BAFF-R:Fc полипептида към BAFF се запазва. В други варианти, мутантите кодират BAFF-R или BAFF-R:Fc полипептид, притежаващ аминокиселини, които не са консервативни между човешки и миши BAFF-R, които са сменени с други аминокиселини. За предпочитане поне една не полярна аминокиселина е сменена с пролинов остатък или с незаредена полярна аминокиселина.

Антисенс

Друг вариант от изобретението се отнася до изолиране на антисенс молекули от нуклеинови киселини, които могат да хибридизират със или са комплиментарни на молекулата нуклеинова киселина, включваща нуклеотидната секвенция от Фигура 2A, C, 3 или са нейни фрагменти, аналози или производни. "Антисенс" нуклеинова киселина включва нуклеотидна секвенция, която е комплиментарна на "сенс"нуклеинова киселина, кодираща белтък, например комплиментарна на кодиращата верига от двойно верижната кДНК молекула или комплиментарна на иРНК секвенция. В специфични варианти молекулите от антисенс нуклеинови киселини са осигурени, които включват секвенция, комплиментарна поне на около 10, 25, 50, 100, 250 или 500 нуклеотида или на цяла BAFF-R кодираща верига или само на част от нея. В допълнение, осигурени са молекули от нуклеинови киселини, кодиращи фрагменти, хомолози производни и аналози на BAFF-R белтък от всяка една от

Фигура 2A (SEQ ID NO:3), Фигура 2C (SEQ ID NO:4), Фигура 3 (SEQ ID NO:6), или антисенс нуклеинови киселини, комплиментарни на BAFF-R секвенцията от нуклеиновата киселина от която и да е от Фигура 2A (SEQ ID NO:3), Фигура 2C (SEQ ID NO:4), Фигура 3 (SEQ ID NO:6).

В един вариант, антисенс молекулата нуклеинова киселина е антисенс спрямо "кодираща област" от кодиращата верига на нуклеотидна секвенция, кодираща BAFF-R. Терминът "кодираща област" се отнася до областта от нуклеотидна секвенция, включваща кодони, които се транслират в аминокиселинни остатъци (например, белтък кодиращата област на човешки BAFF-R съответства на нуклеотиди 13 до 568 от Фигура 2A (SEQ ID NO:3), или нуклеотиди 13 до 565 от Фигура 2C (SEQ ID NO:4), или нуклеотиди 298-849 от Фигура 3 (SEQ ID NO:6)). В друг вариант антисенс молекулата нуклеинова киселина е антисенс по отношение "не-кодираща област" от кодиращата верига от нуклеотидна секвенция, кодираща BAFF-R. Терминът "не-кодираща област" се отнася до 5' и 3' секвенции, които фланкират кодиращата област, които не се транслират в аминокиселини (т. е. отнася се също така до 5' и 3' не-транслиращи се области).

Предлагайки кодиращите верижни секвенции, кодиращи описаният тук BAFF-R, антисенс нуклеиновите киселини от изобретението могат да се проектират съгласно правилото за свързване на базите, според Watson и Crick или Hoogstein. Антисенс молекулата нуклеинова киселина може да бъде комплиментарна на цялата кодираща област от BAFF-R иРНК, но за предпочитане е да е олигонуклеотид, който е антисенс само по отношение на част от кодиращата или не-кодиращата област от BAFF-R иРНК. Например, антисенс

олигонуклеотидът може да бъде комплиментарен на областта, обграждаща транслационното старт място на BAFF-R иРНК. Антисенс олигонуклеотидът може да е например с дължина около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 нуклеотида. Антисенс нуклеиновата киселина от изобретението може да се конструира, като се използва химичен синтез или реакции с ензимно лигиране, чрез използване на методите известни от нивото на техниката. Например, антисенс нуклеинова киселина (например, антисенс олигонуклеотид) може да се синтезира по химичен път, като се използват естествено срещащи се нуклеотиди или модифицирани по различен начин нуклеотиди, проектирани да увеличат биологичната активност на молекулите или да увеличат физичната стабилност на дуплекса, образуван между антисенс и сенс нуклеиновите киселини, например могат да се използват фосфоротиоат производни и акридин заместени нуклеотиди.

Примери за модифицирани нуклеотиди, които могат да се използват, за да се получи антисенс нуклеинова киселина включват: 5-флуороурацил, 5-бромоурацил, 5-хлороурацил, 5-йодоурацил, хипоксантин, ксантин, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксихидроксилметил) урацил, 5-карбоксиметил-аминометил-2-тиоуридин, 5-карбоксиметиламинометилурацил, дихидроурацил, бета-D-галактозилхеозин, инозин, N6-изопентениладенин, 1-метилгуанин, 1-метилинозин, 2,2-диметилгуанин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, N6-аденин, 7-метилгуанин, 5-метиламинометилурацил, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил, бета-D-манозилхеозин, 5'-метоксикарбоксиметилурацил, 5-метоксиурацил, 2-метилтио-N6-изопентениладенин, урацил-5-оксиоцетна киселина (v), вибутоксозин, псевдоурацил, хеозин,

2-тиоцитозин, 5-метил-2-тиоурацил, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-метилурацил, метилов естер на урацил-5-оксиоцетна киселина, урацил-5-оксиоцетна киселина (v), 5-метил-2-тиоурацил, 3-(3-амино-3-N-2-карбоксипропил) урацил, (acp3)w и 2,6-диаминопурин. Съответно, антисенс нуклеиновата киселина може да се получи по биологичен път, чрез използване на експресионен вектор в който нуклеиновата киселина е субклонирана в антисенс ориентация (т. е. РНК транскрибирана от вмъкнатата нуклеинова киселина ще бъде в антисенс ориентация, по отношение на интересуващата ни прицелна нуклеинова киселина, описана по-нататък в следващите подзаглавия).

Молекулите от антисенс нуклеинова киселина от изобретението се прилагат нормално на лице или се получават in situ, така че те хибридизират с или се свързват с клетъчната иРНК и/или геномната ДНК, кодираща BAFF-R белтъка, като по този начин инхибират експресията на белтъка, например чрез инхибиране на транскрипцията и/или транслацията. Хибридизацията може да се извърши чрез конвенционална нуклеотидна комплиментарност, за да се образува стабилен дуплекс или например, в случай на молекула антисенс нуклеинова киселина, която се свързва с ДНК дуплексите чрез специфични взаимодействия в голямата бразда от двойната спирала. Пример за начин на прилагане на молекули антисенс нуклеинови киселини от изобретението включва, директно инжектиране в място от тъканта. Съответно молекулите антисенс нуклеинови киселини могат да бъдат модифицирани за прицелно избрани клетки и след това приложени върху целия организъм. Например за приложение върху целия организъм, антисенс молекулите могат да се модифицират така, че те

специфично да се свързват с рецептори или антигени, експресирани по повърхността на избраната клетка, например, чрез свързване на молекулите антисенс нуклеинови киселини с пептиди или антитела, които се свързват с клетъчно повърхностни рецептори или антигени. Молекулите от антисенс нуклеинови киселини могат да се доставят също така до клетката, чрез използване на описаните тук вектори. За да се постигнат достатъчни вътреклетъчни концентрации на антисенс молекули, предпочитат се векторни конструкти в които молекулите от антисенс нуклеинови киселини се поставят под контрола на силен полимеразен II или полимеразен III промотор.

В друг вариант, молекулата от антисенс нуклеинова киселина от изобретението е α-anomeric молекула от нуклеинова киселина. Тази α-anomeric молекула от нуклеинова киселина образува специфични двойно-верижни хибриди с комплиментарна РНК, в която за разлика от обикновените b-единици, веригите са паралелни една на друга (Gaultier et al., (1987) Nucl. Acids Res., 15 : 6625-6641). Молекулата от антисенс нуклеинова киселина може да включва също така 2'-О-метилрибонуклеотид (Inoue et al., (1987) Nucl Acids Res., 15 : 6131-6148) или химерен РНК-ДНК аналог (Inoue et al., (1987) FEBS Lett., 215 : 327-330).

Рибозими и PNA групи

В друг вариант, антисенс нуклеинова киселина от изобретението е рибозим. Рибозимите са каталитични РНК молекули с рибонуклеазна активност, които са способни да разграждат едноверижна нуклеинова киселина, такава като

иРНК, към която те имат комплиментарна област. Следователно, рибозимите (например рибозими от вид акула) (описана от Haselhoff and Gerlach (1985), Nature, 334 : 585-591)) могат да се използват за да катализират разграждането на BAFF-R иРНК транскриптите, като по този начин подтискат транслацията на BAFF-R иРНК. Може да се проектира рибозим притежаващ специфичност за нуклеинова киселина, кодираща BAFF-R, на базата на описаната тук нуклеотидна секвенция на BAFF-R ДНК (т. е. SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6). Например, може да се конструира производна на Tetrahymena L-19 IVS РНК, в която нуклеотидната секвенция в активното място е комплиментарна на нуклеотидната секвенция, която трябва да се разгради в иРНК, кодираща BAFF-R. Виж например, Cech et al., U. S. Патент № 4, 987, 071; и Cech et al., U. S. Патент № 5, 116, 742. Съответно, може да се използва BAFF-R иРНК, за да се избере каталитична РНК, притежаваща специфична рибонуклеазна активност от пула на РНК молекулите. Виж например, Bartel et al., (1993), Science, 261 : 1411-1418.

Съответно, експресията на BAFF-R гена може да се подтисне чрез прицелни нуклеотидни секвенции, комплиментарни на регулаторния участък от BAFF-R (например, BAFF-R промотора и/или енхансери), за да се образуват тройно спирални структури, които предпазват транскрипцията на BAFF-R гена в прицелните клетки. Виж най-общо Helene (1991) Anticancer drug Des. 6 : 569-84; Helene et al., (1992) Ann. N.Y. Acad. Sci., 660 : 27-36; и Maher (1992) Bioassays, 14 : 807-15.

В различни варианти, нуклеиновата киселина за BAFF-R може да бъде модифицирана в базовата група, захарната група

или във фосфатния скелет, за да се подобри, например стабилността, хибридизацията или разтворимостта на молекулата. Например, дезоксирибозният фосфатен скелет на нуклеиновите киселини може да се модифицира, за да се получат пептидни нуклеинови киселини (виж Hyrup et al., (1996), Bioorg. Med Chem., 4 : 5-23). Използваният тук термин "пептидни нуклеинови киселини" или "PNAs", се отнася до наподобяващи нуклеинови киселини, например ДНК наподобяващи, в които дезоксирибозният фосфатен скелет е заместен от псевдопептидна верига и са запазени само четири естествени нуклеобази. Показано е, че неутралната верига на PNAs дава възможност да стане специфична хибридизация с ДНК и РНК, при условия на ниска йонна сила. Синтезата на PNA олигомери може да се извърши, като се използват протоколите за стандартен твърдо-фазов пептиден синтез, както е описано от Hyrup et al., (1996), Bioorg. Med Chem., 4 : 5-23; Perry-O'Keefe et al., (1996), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93 : 14670-675.

PNAs на BAFF-R могат да се използват за терапевтични и диагностични приложения. Например, PNAs могат да се използват като антисенс или като антигенни средства за секвенционна-специфично модулиране на генната експресия, например чрез спиране на инициирането на транскрипцията или транслацията или инхибиране на репликацията. PNAs на BAFF-R могат да се използват също така, например за анализ на единични нуклеотидни мутации в гена, например чрез PNA насочен PCR скачване; като изкуствени рестриктазни ензими, когато се използват в комбинация с други ензими, например S1 нуклеази (Hyrup B. (1996), Bioorg. Med Chem., 4 : 5-23); или като сонди или праймери за ДНК секвениране и хибридизиране

(Hyrup et al.,. (1996), Bioorg. Med Chem., 4 : 5-23; Perry-O'Keefe, (1996), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93 : 14670-675.

В друг вариант PNAs на BAFF-R могат да се модифицират например, за да се увеличи тяхната стабилност или клетъчно усвояване, чрез прикрепване на липофилни или други помощни групи към PNA, чрез образуване на PNA-ДНК химери, или чрез използване на липозоми или други техники за доставяне на лекарствен препарат, известни от нивото на техниката. Например, могат да се получат PNA-ДНК химери на BAFF-R, които могат да комбинират удачните свойства на PNA и на ДНК.Такива химери позволяват на ензимите разпознаващи ДНК, например РНаза Н и ДНК полимеразите да взаимодействат с ДНК частта, докато частта от РНК ще осигурява високо свързващ афинитет и специфичност. PNA-ДНК химерите могат да се свързват, като се използват линкери с подходящи дължини, избрани по отношение на базово свързване, брой на връзките между нуклеобазите и ориентацията (Hyrup (1996), Bioorg. Med Chem., 4 : 5-23). Синтезата на PNA-ДНК химери може да се проведе, както е описано от Hyrup (1996), Bioorg. Med Chem., 4 : 5-23; и Finn et al., (1996), Nucl. Acids Res., 24 : 3357-63. Например, ДНК верига може да се синтезира върху твърда подложка, като се използва стандартното химично фосфороамидно свързване и модифициране на нуклеозидните аналози, например, може да се използва 5' - (4 - метокситритил) амино - 5' - дезокси - тимидин фосфороамидит между PNA и 5' края на ДНК (Mag et al., (1989), Nucl. Acids Res., 17 : 5973-88). След това PNA мономерите се свързват по стъпаловиден начин, за да се получи химерна молекула с 5' PNA сегмент и 3' ДНК сегмент (Finn et al., (1996) по-горе). Съответно, химерни молекули могат да се

синтезират с 5' ДНК сегмент и 5' PNA сегмент. Виж, Petersen et al., (1975), Bioorg. Med. Chem. Lett., 5 : 1119-11124.

В други варианти, олигонуклеотидът може да включва други закачени групи, такива като пептиди (например, за прицелните клетъчни рецептори на гостоприемника in vivo), или средства, улесняващи транспорта през клетъчната мембрана (виж например, Letsinger et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 86 : 6553-6556; Lemaitre et al., (1987), Proc. Natl. Acad. Sci., USA 84 : 648-652; PCT Публикация № WO 88/09810) или кръвно-мозъчната бариера (виж например, PCT Публикация № WO 89/10134). В допълнение, олигонуклеотидите могат да бъдат модифицирани със средства, инициращи хибридизационно късане (виж например, Krol et al., (1988), BioTechniques, 6 : 958-976) или интеркалиращи средства (виж например, Zon, (1988), Pharm. Res., 5 : 539-549). С този край, олигонуклеотид може да бъде конюгиран с друга молекула, например пептид, хибридизационно насочено напречно-свързващо средство, транспортно средство, средство инициращо късане и т.н.

BAFF-R полипептиди

Един вариант от изобретението се отнася до изолиране на BAFF-R белтъци или техни биологично активни части, или техни производни, фрагменти аналози или хомолози. Осигурени са също така полипептидни фрагменти, подходящи за използването им като имуногени, за създаване на анти-BAFF-R антитела. В друг вариант, могат да се изолират нативни BAFF-R белтъци от клетъчни или тъканни източници, чрез подходяща схема за пречистване, като се използват стандартните техники за пречистване на белтък. В друг вариант, BAFF-R белтъците се

получават чрез рекомбинантни ДНК техники. По подобие на рекомбинантната експресия, BAFF-R белтък или полипептид може да се синтезира по химичен път, като се използват стандартните техники за пептиден синтез.

"Изолиран" или "пречистен" белтък или биологично активна негова част, по същество е свободен от клетъчен материал или други контаминиращи белтъци от клетъчен или тъканен произход, от които е получен BAFF-R белтъка, или фактически свободен от химични прекурсори или други химикали, когато се синтезира по химичен път. Изразът "фактически свободен от клетъчен материал" включва препарати от BAFF-R белтък, в които белтъкът е отделен от клетъчните компоненти на клетките, от които той е изолиран или получен по рекомбинантен път. В друг вариант фразата " фактически свободен от клетъчен материал", включва препарати от BAFF-R белтък, притежаващ по-малко от около 30 % (от сухото тегло) белтък, различен от BAFF-R (споменаван тук като контаминиращ белтък), за предпочитане е белтъкът различен от BAFF-R, да е по-малко от около 20 %, още по-добре е белтъкът, различен от BAFF-R, да е по-малко от около 10 %, а най-добре е белтъкът, различен от BAFF-R, да е по-малко от около 5 %. Когато BAFF-R белтъкът или негова биологично активна част се получава по рекомбинантен път, за предпочитане е също така, той да е по същество свободен от културална среда, т. е.културалната среда да представлява по-малко от около 20 %, по-добре да е по-малко от около 10 %, а най-добре е да е по-малко от около 5 % от обема на белтъчния препарат.

Фразата "фактически чист от химични прекурсори или други химикали" включва препарати от BAFF-R белтък, в които

белтъкът е отделен от химичните прекурсори или от другите химикали, които са включени в синтезата на белтъка. В един вариант, фразата "фактически свободен от химични прекурсори или други химикали", включва препарати от BAFF-R белтък, притежаващ по-малко от около 30 % (от сухото тегло) от химични прекурсори или различни от BAFF-R химикали, за предпочитане е химичните прекурсори или химикали, различни от BAFF-R да са по-малко от около 20 %, а още по-добре е химичните прекурсори или химикали, различни от BAFF-R, да са по-малко от около 10 %, а най-добре е химичните прекурсори или химикали, различни от BAFF-R, да са по-малко от около 5 %.

Биологично активните части от BAFF-R белтъка включват пептиди, включващи аминокиселинни секвенции, които са до голяма степен хомоложни на или произхождат от аминокиселинната секвенция на BAFF-R белтъка, например аминокиселинната секвенция, показана в SEQ ID NO:5, която включва няколко аминокиселини, а не цялата дължина на BAFF-R белтъците и има поне една активност на BAFF-R белтъка. Нормално, биологично активните части включват домен или мотив, поне с една активност на BAFF-R белтъка. Биологично активна част на BAFF-R белтък може да бъде полипептид, който например е с дължина от 10, 25, 50, 100 или повече аминокиселини.

Биологично активната част на BAFF-R белтък от настоящото изобретение, може да съдържа поне един от по-горе идентифицираните домени, консервативни между BAFF-R белтъците. Една алтернативна биологично активна част на BAFF-R белтък може да съдържа поне два от по-горе идентифицираните домен. Друга биологично активна част на

BAFF-R белтък може да съдържа поне три от по-горе идентифицираните домени. Още една биологично активна част на BAFF-R белтък от настоящото изобретение, може да съдържа поне четири от по-горе идентифицираните домени.

Освен това, могат да се получат други биологично активни части, в които други области от белтъка са отстранени чрез рекомбинантни техники и те да бъдат оценени за една или повече от функционалните активности на нативния BAFF-R белтък.

В един вариант, BAFF-R белтъка има аминокиселинна секвенция, показана на Фигура 2D (SEQ ID NO:5). В други варианти, BAFF-R белтъкът е фактически хомоложен на Фигура 2D (SEQ ID NO:5) и запазва функционалната активност на белтъка от Фигура 2D (SEQ ID NO:5), въпреки че се различава по аминокиселинна секвенция, поради естествени алелни варианти или мутагенезис, както е описано подробно по-долу. Съответно, в друг вариант, BAFF-R белтъкът е белтък, който включва аминокиселинна секвенция, поне около 45 % хомоложна на аминокиселинната секвенция от Фигура 2D (SEQ ID NO:5) и запазва функционалната активност на BAFF-R белтъците от Фигура 2D (SEQ ID NO:5).

В някои варианти изобретението включва специфични мутанти на BAFF-R:Fc полипептид, конструирани за да облекчават агрегацията на експресиран белтък, като поддържат свързващата BAFF активност. Такива мутанти включват например, клонове кодиращи аминокиселинни секвенции на JST661 (SEQ ID NO:17), JST662 (SEQ ID NO:18), JST663 (SEQ ID NO:19), JST673 (SEQ ID NO:20), JST674 (SEQ ID NO:21), JST675 (SEQ ID NO:22), JST672 (SEQ ID NO:23), JST676 (SEQ ID NO:24), JST671 (SEQ ID NO:25), JST677 (SEQ ID NO:26), и

JST678 (SEQ ID NO:27). Други варианти включват мутанти, кодиращи BAFF-R или BAFF-R:Fc полипептид, който има сходни характеристики на агрегация с нативния човешки BAFF-R или BAFF-R:Fc полипептид, но също така свързва BAFF, включващи например секвенции, включващи аминокиселинните секвенции от JST659 (SEQ ID NO:15), JST660 (SEQ ID NO:16), JST664 (SEQ ID NO:28), JST668 (SEQ ID NO:29), JST665 (SEQ ID NO:30), JST666 (SEQ ID NO:31), и JST667 (SEQ ID NO:32). Други варианти включват мутанти, кодиращи BAFF-R или BAFF-R:Fc полипептид, където консервативните аминокиселини между човешки и миши BAFF-R са сменени с други консервативни аминокиселини и където е запазена свързващата активност на BAFF-R или BAFF-R:Fc полипептида към BAFF-R. В други варианти мутантите, кодиращи BAFF-R или BAFF-R:Fc полипептид, притежават аминокиселини, които не са консервативни между човешки и миши BAFF-R, които са сменени с други аминокиселини. Предимно, не-полярните аминокиселини са мутирали до пролин или до незаредени полярни аминокиселини.

Определяне на хомологията между две или повече секвенции

За да се определи процента на хомология на две аминокиселинни секвенции или на две нуклеинови киселини, секвенциите се съпоставят една с друга, с цел да се сравнят оптимално (например, могат да се въведат празни участъци в секвенцията на първата аминокиселина или в секвенцията на нуклеинова киселина за оптимално съпоставяне с втора секвенция от аминокиселина или нуклеинова киселина). След

това се сравняват аминокиселинните остатъци или нуклеотидите в съответните аминокиселинни позиции или нуклеотидни позиции. Когато позиция в първата секвенция е заета от същия аминокиселинен остатък или нуклеотид, както съответната позиция във втората секвенция, тогава молекулите са хомоложни в тази позиция (т. е. използваният тук термин "хомоложна" за аминокиселина или нуклеинова киселина е еквивалентен на "идентичен" за аминокиселина или нуклеинова киселина).

Като хомоложна може да се определи секвенция на нуклеинова киселина при степен на идентичност между двете секвенции. Хомоложността може да се определи чрез използване на компютърни програми известни от обхвата на техниката, такива като GAP софтуер, осигурен в GCG програмен пакет. Виж Needleman и Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443-453. Като се използва GCG GAP софтуер при следните условия за сравняване на секвенцията на нуклеинова киселина: създаването на GAP ограничение от 5.0 и GAP разширено ограничение от 0.3, кодиращата област от аналогичните секвенции от нуклеинови киселини, които се отнасят до по-горе, показва степен на идентичност предимно поне от 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, или 99 %, с CDS (кодираща) част от ДНК секвенцията, показана на Фигура 2A (SEQ ID NO : 3), Фигура 2C (SEQ ID NO : 4), Фигура 3 (SEQ ID NO : 6).

Терминът "идентична секвенция" се отнася до степента, до която две полинуклеотидни или полипептидни секвенции са идентични чрез сравняване на всеки отделен базов остатък в определената област. Терминът "процент идентична секвенция" се изчислява чрез сравняване на две оптимално съпоставени секвенции в тази област на сравнение, като се

определя броят на позициите при които се среща идентичната база от нуклеинова киселина (например, A, T, C, G, U, или I, в случай на нуклеинови киселини) в двете секвенции, за да се получи броят на припокриващите се позиции, разделяйки броя на припокриващите се позиции на общия брой позиции в областта, в която се сравняват (т. е. размер на прозореца), и умножаване на резултата по 100, за да се получи процента на секвенционна идентичност. Използваният тук термин "фактически идентична" означава характеристика на полинуклеотидна секвенция, където полинуклеотидът включва секвенция, която има поне 80 процента секвенционна идентичност, за предпочитане поне 85 процента секвенционна идентичност, а често 90 до 95 процента секвенционна идентичност, по често поне 99 процента секвенционна идентичност при сравняване с референтната секвенция в областта в която се сравняват.

Химерни и рекомбинантни белтъци

Изобретението осигурява също така BAFF-R химерни или рекомбинантни белтъци. Използваният тук термин BAFF-R "химерен белтък" или "рекомбинантен белтък" включва BAFF-R полипептид, свързан по оперативен път с белтък, различен от BAFF-R полипептида. "BAFF-R полипептид" се отнася до полипептид, притежаващ аминокиселинна секвенция, съответстваща на BAFF-R, където "полипептид различен от BAFF-R", се отнася до полипептид, притежаващ аминокиселинна секвенция, съответстваща на белтък, който фактически не е хомоложен на BAFF-R белтъка, например, белтък, който е различен от BAFF-R белтъка и който е получен

от същия или от различен организъм. В BAFF-R рекомбинантния белтък BAFF-R полипептидът може да съответства на целия или на част от BAFF R белтъка. В един вариант, BAFF-R рекомбинантният белтъка включва поне една биологично активна част от BAFF-R белтъка. В друг вариант, BAFF-R рекомбинантният белтък включва поне две биологично активни части от BAFF-R белтъка. В друг вариант, BAFF-R рекомбинантният белтък включва поне три биологично активни части от BAFF-R белтъка. В рекомбинантният белтък терминът "свързан по оперативен път" има за цел да покаже, че BAFF-R полипептидът и полипептид различен от BAFF-R, се сливат заедно един с друг. Полипептидът различен от BAFF-R може да бъде свързан с N-края или C-края на BAFF-R полипептида. Полипептидът различен от BAFF-R може да бъде например Fc част от антитяло. То може да бъде свързано по оперативен път или с N-края или с C-края на BAFF-R полипептида. Fc-прицелното белтъчно сливане е описано от Lo et al. (1998) Protein EngineYifzg 11: 495-500, и U. S. Patent Nos. 5,541,087 и 5,726,044. Описанията на които са включени изцяло тук в справката.

Например, в един вариант рекомбинантният BAFF-R белтък включва BAFF-R домен, свързан по оперативен път с извънклетъчния домен от втори белтък. Такива рекомбинантни белтъци могат да се използват по-нататък в анализ за скриниране на съединения, които модулират активността на BAFF-R (такива анализи са описани подробно по-долу).

В друг вариант, рекомбинантният белтък е GST-BAFF-R рекомбинантен белтък, в който BAFF-R секвенциите са свързани с C-края на GST (т. е. глутатион

S-трансфераза) секвенциите. Такива рекомбинантни белтъци могат да улеснят пречистването на рекомбинантен BAFF-R.

В друг вариант, рекомбинантният белтък е BAFF-R белтък, съдържащ хетероложна сигнална секвенция в неговия N-край. Например, тъй като BAFF-R не съдържа своя собствена сигнална секвенция, хетероложната сигнална секвенция трябва да се свърже с 5'края на BAFF-R кодиращата секвенция, за ефективна секреция на рекомбинантния BAFF-R белтък. Експресията и/или секрецията на BAFF-R могат да се повишат чрез използване на различни хетероложни сигнални секвенции.

В друг вариант, рекомбинантният белтък е BAFF-R-имуноглобулинов рекомбинантен белтък, в който BAFF-R секвенциите включващи един или повече домени се свързват със секвенции, получени от представител на семейството от имуноглобулинови белтъци. BAFF-R-имуноглобулиновите рекомбинатни белтъци от изобретението могат да се включат във фармацевтични състави и да се прилагат на лице, за да се подтисне взаимодействието между BAFF-R лиганд и BAFF-R белтък по клетъчната повърхност, като по този начин се супресира BAFF-R-медиираната сигнална трансдукция in vivo. Имуноглобулиновите BAFF-R-рекомбинантни белтъци могат да се използват за да повлияват бионаличността на BAFF-R сродния лиганд. Подтискането на BAFF-R лиганд/BAFF-R взаимодействие може да е терапевтично полезно, както за лечение на нарушения свързани с пролиферацията и диференцировката, така също и за модулиране на (например, подпомагне или инхибиране) клетъчното преживяване. Освен това, имуноглобулиновите BAFF-R рекомбинатни белтъци от изобретението могат да се използват като имуногени, за получаване на анти-BAFF-R антитела, в лице, за

пречистване на BAFF-R лиганди и при анализ за скриниране, за идентифициране на молекули, които подтискат взаимодействието на BAFF-R с BAFF-R лиганда.

Химерен или рекомбинантен BAFF-R белтък от изобретението може да се получи чрез стандартните рекомбинантни ДНК технологии. Например, ДНК фрагменти, кодиращи различни полипептидни секвенции се лигират заедно, съгласно конвенционалните техники, например чрез използване на тъпи или неравни крайща за лигиране, рестриктазно ензимно разграждане, за осигуряване на подходящи крайща, запълване на кохезивни крайща ако е подходящо, третиране с алкална фосфатаза, за да се избегне нежелано свързване и ензимно лигиране. В друг вариант, рекомбинантният ген може да се синтезира чрез конвенционални техники, включващи автоматични ДНК синтезатори. Съответно, може да се проведе PCR амплификация на генни фрагменти, като се използват закрепващи праймери, които водят до комплиментарно свързване между два последователни генни фрагмента, който могат в последствие да се свържат и реамплифицират, за да се получи химерна генна секвенция (виж например, Ausubel et al. Eds. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992). Освен това много експресионни вектори са налични в търговската мрежа, които могат да кодират рекомбинантна група (например GST полипептид). BAFF-R-кодиращата нуклеинова киселина може да се клонира в такъв експресионен вектор, така че рекомбинантната група да е свързана с BAFF-R белтъка.

В предпочитан вариант, свързването на BAFF-R се осигурява чрез секвенциите от нуклеинова киселина (SEQ

ID NO : 11) и аминокиселина (SEQ ID NO : 12) от Фигура 9.

BAFF-R агонисти и антагонисти

Настоящото изобретение се отнася също така до варианти на BAFF-R белтъците, които функционират или като BAFF-R агонисти (наподобяващи) или като BAFF-R антагонисти. Варианти на BAFF-R белтъка могат да се получат чрез мутагенезис, например, дискретна точкова мутация или скъсяване на BAFF-R белтъка. Един агонст на BAFF-R белтъка може да запази фактически същите или част от биологичните активности на естествено срещащата се форма на BAFF-R белтъка. Антагонист на BAFF-R белтъка може да инхибира една или повече от активностите на естествено срещащата се форма на BAFF-R белтъка, например чрез конкурентно свързване към downstream или upstream член от клетъчната сигнална каскада, която включва BAFF-R белтъка. Следователно, специфични биологични ефекти могат да възникнат при третиране с вариант с ограничена функция. В един вариант, лечението на лице с вариант, притежаващ част от биологичните активности на естествено срещащата се форма от белтъка, има малко странични ефекти при лице в сравнение с лечението с естествено срещащата се форма на BAFF-R белтъците.

Вариантите на BAFF-R белтъка, които функционират или като BAFF-R агонисти (наподобяват) или като BAFF-R антагонисти, могат да се идентифицират чрез скриниране на комбинирани библиотеки от мутанти, например скъсени мутанти на BAFF-R белтъка за BAFF-R белтъчна агонистична, или антагонистична активност.

В един вариант, се създава разнообразна библиотека от BAFF-R варианти чрез комбинаторен мутагенезис на ниво нуклеинова киселина и се кодира от разнообразна генна библиотека. Разнообразна библиотека от BAFF-R варианти може да се получи например чрез ензимно лигиране на смес от синтетични олигонуклеотиди в генни секвенции така, че дегенеративен набор от възможни BAFF-R секвенции може да се експресира като отделни полипептиди, или съответно като набор от големи рекомбинантни белтъци (например, за проявяване на фаг), съдържащи набор от BAFF-R секвенции. Има разнообразни методи, които могат да се използват за получаване на библиотеки от възможни BAFF-R варианти чрез дегенеративна олигонуклеотидна секвенция. Химичен синтез на дегенеративна генна секвенция може да се извърши в автоматичен ДНК синтезатор и след това синтезираният гена да се лигира в подходящ експерионен вектор. Използването на дегенеративен набор от гени позволява осигуряването в една смес на всички секвенции, кодиращи нужния набор от възможни BAFF-R секвенции. Методите за синтезиране на дегенеративни олигонуклеотиди са известни от нивото на техниката (виж например, Narang (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al., (1984), Ann. Rev. Biochem., 53: 323; Itakura et al., (1977) Science 198: 1056-1063; Ike et al., (1983) Nucl. Acids Res. 11: 477-488.

Полипептидни библиотеки

В допълнение, могат да се използват библиотеки от фрагменти кодиращи секвенцията на BAFF-R белтъка, за да се получи разнообразна популация от BAFF-R фрагменти за

скриниране и последваща селекция на варианти от BAFF-R белтък. В един вариант, може да се получи библиотека от кодиращи секвенциите фрагменти, чрез третиране на двойно верижен PCR фрагмент от BAFF-R кодираща секвенция с нуклеаза, при условия в които се среща само едно скъсване в молекула, денатурирайки двойно верижната ДНК, ренатурирайки ДНК, за да се образува двойно верижна ДНК, която може да включва сенс/антисенс нуклеотидни двойки от различни продукти на скъсването, отстранявайки единично верижните участъци от реформираните дуплекси чрез третиране с S 1 нуклеаза и чрез лигиране на полученият фрагмент от библиотеката в експресионен вектор. Чрез този метод може да се получи експресионна библиотека, която кодира N-крайните и вътрешни фрагменти с различни размери на BAFF-R белтъка.

От нивото на техниката са известни няколко техники за скриниране на генни продукти от комбинираните библиотеки, направени чрез точкови мутации или скъсяване и за скриниране на кДНК библиотеки за генни продукти притежаващи селективни свойкства. Тези техники могат да се адаптират за бързо скриниране на генни библиотеки, получени чрез комбинативен мутагенезис на BAFF-R белтъци. Най-широко използваните техники, които са податливи за широко мащабен анализ, за скриниране на големи генни библиотеки, включват нормално клониране на генна библиотека в способни за реплициране експресионни вектори, трансформиране на подходящи клетки с получената библиотека от вектори и експресиране на комбинативните гени в условия, в които откриването на желаната активност улеснява изолирането на вектора, кодиращ гена, чийто продукт се детектира. Може да се използва рекрузивният пълен мутагенезис (REM), една нова

техника, която увеличава честотата на функционалните мутанти в библиотеките, в комбинация с анализите за скриниране, за да се идентифицират BAFF-R вариантите (Arkin and Yourvan (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7811-7815; Delgrave et al., (1993), Protein Engineering 6: 327-331).

Анти-BAFF-R- Антитела

Изолираният BAFF-R белтък или негова част, или негов фрагмент, може да се използва като имуноген за получаване на анитела, които се свързват с BAFF-R, като се използват стандарни техники за получаване на поликлонално и моноклонално антитяло. Може да се използва BAFF-R белтъкът с пълна дължина, или съответно, изобретението осигурява антигенни пептидни фрагменти от BAFF-R за използване като имуногени. Антигенният пептид от BAFF-R включва поне 8 аминокиселинни остатъка от аминокиселинната последователност показана на Фигура 2D (SEQ ID NO : 5) и включва епитоп от BAFF-R, така че антитялото образувано срещу пептида да формира специфичен имунен комплекс с BAFF-R. За предпочитане е антигенният пептид да включва поне 10 аминокиселинни остатъка, по-добре е поне 15 аминокиселинни остатъка, още по-добре е поне 20 аминокиселинни остатъка, а най-добре е да са поне 30 аминокиселинни остатъка. Предпочитани епитопи включени от антигенният пептид са области от BAFF-R, които са разположени по повърхността на белтъка, например, хидрофилни области.

Както се дискутира тук, белтъчната секвенция на BAFF-R от Фигура 2D (SEQ ID NO : 5), или производни, негови

фрагменти, аналози или хомолози, могат да се използват като имуногени за създаване на антитела, които се свързват имуноспецифично с тези белтъчни компоненти. Използваният тук термин "антитяло" се отнася до имуноглобулинови молекули и имунологично активни части от имуноглобулинови молекули, т. е. молекули, които съдържат антиген свързващо място, което се свързва специфично (взаимодейства по имунен път със) с антиген, такъв като BAFF-R. Такива антитела включват, но не се ограничават само до, поликлонални, моноклонални, химерни, едноверижни, Fab и F (ab') 2 фрагменти и Fab експресионна библиотека. В специфичен вариант са описани антитела към човешки BAFF-R белтъци. Могат да се използват различни методи, които са известни от нивото на техниката, за получаване на поликлонални или моноклонални антитела към BAFF-R белтъчната секвенция от Фигура 2D (SEQ ID NO : 5) или нейно производно, фрагмент, аналог или хомолог. Някои от тези белтъци се дискутират по-долу.

За получаване на поликлонални антитела могат да се имунизират различни подходящи животни като гостоприемници (например, заек, коза, мишка или друг бозайник), чрез инжектиране с нативен белтък или с негов синтетичен вариант, или производно на гореспоменатите. Един подходящ имуногенен препарат може да съдържа например, рекомбинантно експресиран BAFF-R белтък или химично синтезиран BAFF-R полипептид. Освен това препаратът може да включва адювант. Използват се различни адюванти, за да се повиши имунологичния отговор, които включват, но не се ограничават само до, адювант на Freund (пълен и непълен), минерални гелове (например, алуминиев хидроксид),

повърхностно активни субстанции (например, лизолецитин, pluronic полиоли, полианиони, пиптеди, маслени емулсии, динитрофенол и т.н.), човешки адюванти, такива като Bacille Calmette-Guerin (BCG) и Corynebacterium parvum, или сходни имуностимулиращи средства. Ако е необходимо, антитяло молекулите насочени срещу BAFF-R, могат да се изолират от бозайник (например, от кръвта) и след това да се пречистят чрез техниките, добре познати на специалистите в областта, такива като протеин А хроматография, за получаване на IgG фракция.

Използваният тук термин "моноклонално антитяло" или "състав от моноклонално антитяло", се отнася до популация от молекули антитела, които съдържат само един вид антиген свързващо място, способно да взаимодейства по имуногенен път със специфичния епитоп от BAFF-R. По този начин съставът на моноклоналното антитяло показва типичен афинитет за единствено свързваща активност за отделния BAFF-R белтък с който той взаимодейства имунологично. За получаване на моноклонални антитела, насочени към отделен BAFF-R белтък, или негови производни, фрагменти, аналози или хомолози, може да се използва която и да е техника, осигуряваща получаването на молекули от антитела от култура от трайна клетъчна линия. Такива техники включват, но не се ограничават само до, хибридомна техника (виж Kohler & Milstein, (1975), Nature, 256: 495-497); триома техниката; хибридомна техника с човешки В-клетки (виж, Kozbor et al., (1983), Immunol. Today, 4: 72) и EBV хибридомната техника, за получаване на човешки моноклонални антитела (виж, Cole, et al., in MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., 1985, pp. 77-96). Човешките моноклонални антитела могат да се използват в практиката от настоящото

изобретение и могат да се получат чрез използване на човешки хибридоми (see Cote et al., (1983), Proc. Natl. Acad. Sci., USA 80: 2026-2030) или чрез трансформиране на човешки В-клетки с Epstein Barr вирус in vitro (виж, Cole et al., in MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., 1985 pp. 77-96).

Съгласно изобретението, могат да се адаптират техниките за получаване на единично-верижни антитела, специфични за BAFF-R белтък (виж например, U. S. патент № 4,946,778). В допълнение, могат да се адаптират методите за конструиране на Fab експресионни библиотеки (виж например, Huse et al., (1989), Science, 246: 1275-1281), което позволява бързо и ефективно да се идентифицират моноклонални Fab фрагменти с желаната специфичност за BAFF-R белтък или негови производни, фрагменти, аналози или хомолози. Антителата, които не са от човек, могат да станат "наподобяващи човешките", чрез техники, добре известни от нивото на техниките. Виж например, U. S. Патент №. 5,225,539. Фрагментите от антитела, които съдържат идиотиповете за BAFF-R белтък, могат да се получат чрез техники добре познати в областта, включващи, но не ограничаващи се само до: (1) F (ab') 2 фрагмент, получен чрез разграждане на молекула от антитяло с пепсин; (2) Fab фрагмент, получен чрез редуциране на дисулфидните мостове на F (ab') 2 фрагмента; (3) Fab фрагмент, получен чрез третиране на молекула от антитяло с папаин и редуциращо средство и (4) Fv фрагменти.

В допълнение, в обхвата на изобретението са рекомбинантни анти-BAFF-R антитела, такива като химерни и такива, наподобяващи човешките моноклонални антитела, включващи части както от човешко, така и от антитяло,

различно от човешкото, които могат да се направят чрез използване на стандартни рекомбинантни ДНК техники. Такива химерни и наподобяващи човешките, моноклонални антитела могат да се получат чрез рекомбинантни ДНК техники, известни от нивото на техниката, например чрез използване на методите описани в PCT Международна Заявка № PCT/US86/02269; Европейска Патентна Заявка № 184, 187; Европейска Патентна Заявка № 171, 496; Европейска Патентна Заявка № 173, 494; PCT Международна Публикация № WO 86/01533; U. S. Патент № 4, 816, 567; Европейска Патентна Заявка № 125, 023; Better et al., (1988), Science, 240: 1041-1043; Liu et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 84: 3439-3443; Liu et al., (1987), J. Immunlol., 139 : 3521-3526 ; Sun et al., (1987), Proc. Natl. Acad. Sci., USA 84: 214-218 ; Nishimura et al., (1987), Cancer Res., 47: 999-1005; Wood et al., (1985), Nature, 314: 446-449; Shaw et al., (1988), J. Natl. Caracer Inst., 80: 1553-1559); Morrison (1985), Science, 229: 1202-1207; Oi et al., (1986), BioTechniques 4:214; U. S. Патент № 5, 225, 539; Jones et al., (1986), Nature, 321: 552-525; Verhoeyan et al., (1988), Science, 239: 1534; и Beidler et al., (1988), J. Immunol. 141: 4053-4060.

В един вариант, методите за скриниране на антитела, които притежават желаната специфичност включват, но не се ограничават само до, ензим-свързан имуносорбентен анализ (ELISA) и други имунологично-медиирани техники, известни от нивото на техниката. В специфичен вариант, селекцията на антитела, които са специфични за отделен домен на BAFF-R белтък се улеснява чрез създаване на хибридоми, които се свързват с фрагмента на BAFF-R белтъка, притежаващ такъв домен. Тук са осигурени също така антитела, които са специфични за един или повече домени в BAFF-R белтъка,

например, домени обхващащи по-горе идентифицираните консервативни области от семейството на BAFF-R белтъците или техни производни, фрагменти, аналози или хомолози.

Анти-BAFF-R антителата могат да се използват в методите известни от нивото на техниката, свързани с локализацията и/или количественото определяне на BAFF-R белтък (например, за използване измерването на нивата на BAFF-R белтъка в подходящи физиологични проби, за използване в диагностични методи, за използване в образен анализ на белтъка и други подобни). В даден вариант, антителата за BAFF-R белтъци, или техни производни, фрагменти, аналози или хомолози, които съдържат получения антитяло свързващ домен, се използват като фармакологично активни съединения (наречени тук "Терапевтици").

Анти-BAFF-R антитялото (например, моноклонално антитяло), може да се използва за изолиране на BAFF-R чрез стандартни техники, такива като афинитетна хроматография или имунопреципитация. Анти-BAFF-R антитялото може да улесни пречистването на естествен BAFF-R от клетки и на рекомбинантно получен BAFF-R, експресиран в клетки на гостоприемник. Освен това, анти-BAFF-R антитялото може да се използва за детекция на BAFF-R белтък (например, в клетъчен лизат или клетъчна супернатанта), за да се оцени изобилието и модела на експресия на BAFF-R белтъка. Анти-BAFF-R антителата, могат да се използват с диагностична цел, за контрол на белтъчните нива в тъканта, като част от процедура за клиничен анализ, например определяне на ефективността за даден режим на лечение. Детекцията може да се улесни чрез свързване (т. е., физично свързване) на антиялото със субстанция, която може да се детектира. Примери за

субстанции, които могат да се детектират включват различни ензими, простетични групи, флуоресцентни материали, луминисцентни материали, биолуминесцентни материали и радиоактивни материали.

Примери за подходящи ензими включват пероксидаза от хрян, алкална фосфатаза, В-галактозидаза, или ацетилхолинестераза; примери за подходящи комплекси от простетични групи включват стрептавидин/биотин и авидин/биотин; примери за подходящи флуоресцентни материали включват умбелиферон, флуоресцеин, флуоресцеин изотиоцианат, родамин, дихлоротриазиниламин флуоресцеин, данзил хлорид или фикоеритрин; пример за луминесцентен материал включва луминол; примери за биолуминесцентни материали включват луцифераза, луциферин и ехорин и примери за подходящ радиоактивен материал включва ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S или ^{3}H.

BAFF-R Рекомбинантни експресионни вектори и клетки на гостоприемник

Друг вариант от изобретението се отнася до вектори, за предпочитане експресионни вектори, съдържащи нуклеинова киселина, кодираща BAFF-R белтък или негови производни, фрагменти, аналози или хомолози. Използваният тук термин "вектор", се отнася до молекула нуклеинова киселина, способна да транспортира друга нуклеинова киселина с която тя е свързана. Един тип вектор е "плазмида", който се отнася до кръгов, двойно верижен ДНК луп, в които са лигирани допълнителни ДНК сегменти. Друг тип вектор е вирусният вектор, при който във вирусния геном са лигирани

допълнителни ДНК сегменти. Някои вектори са способни да се реплицират автономно в клетките на гостоприемника, в които те са въведени (например, бактериалният вектор притежаващ бактериално начало на репликацията и епизомалните вектори при бозайниците). Други вектори (например, не-епизомалните вектори при бозайниците) се интегрират в генома на клетката гостоприемник при въвеждането им в клетката гостоприемник и по този начин се реплицират заедно с генома на гостоприемника.

Освен това, някои вектори са способни да насочват експресията на гените с които те са свързани по оперативен път. Такива вектори се отнасят тук до "експресионни вектори". Най-общо експресионните вектори, които са полезни за рекомбинантните ДНК техники, често пъти са под формата на плазмиди.

В настоящата спецификация "плазмид" и "вектор" могат да се използват взаимозаменяемо, тъй като плазмид е най-често използваната форма за вектор. Обаче, изобретението има за цел да включва други такива форми на експресионни вектори, такива като вирусни вектори (например, реплициращи се дефектни ретровируси, аденовируси и адено-асоциирани вируси), които имат еквивалентни функции.

Рекомбинантните експресионни вектори от изобретението включват нуклеинова киселина от изобретението, под форма, подходяща за експресия на нуклеиновата киселина в клетката гостоприемник, което означава, че рекомбинантните експресионни вектори включват една или повече регулаторни секвенции, избрани в зависимост от клетките на гостоприемника, които се използват за експресия, което означава че са свързани по оперативен път със секвенцията от

нуклеинова киселина, която ще се експресира. В рекомбинантния експресионен вектор, "свързан по оперативен път" означава, че интересуващата ни нуклеотидна секвенция е свързана с регулаторната секвенция(ии) по начин, който позволява експресия на нуклеотидната секвенция (например, в in vitro система за транскрипция/транслация или в клетка на гостоприемник, когато векторът е въведен в такава клетка на гостоприемник). Използваният тук термин "регулаторна секвенция", означава, че включва промотори, енхансери и други контролни елементи за експресията (например, полиаденилирани сигнали). Такива регулаторни секвенции са описани например в Goeddel "Gene Expression Technology" METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif., 1990. Регулаторните секвенции включват тези, които управляват конститутивната експресия на нуклеотидна секвенция в много типове клетки на гостоприемника и тези, които управляват експресията на нуклеотидната секвенция само в някои клетки на гостоприемника (например, тъканно-специфични регулаторни секвенции). За специалистите в областта е ясно, че конструкцията на експресионния вектор може да зависи от такива фактори, като избора на клетката гостоприемник, която ще се трансформира, нивото на експресия на желания белтък и т.н. Експресионните вектори от изобретението могат да бъдат въведени в клетките на гостоприемника за да продуцират белтъци или пептиди, включващи рекомбинантни белтъци или пептиди, кодирани от нуклеинови киселини, както е описано тук (например, BAFF-R белтъци, мутантни форми на BAFF-R, рекомбинантни белтъци и т.н.)

Рекомбинантните експресионни вектори от изобретението могат да се конструират за експресия на BAFF-R в прокариотни или еукариотни клетки. Например, BAFF-R може да се експресира в бактериални клетки, такива като Escherichia coli, клетки на насекоми (като се използват бакуловирус експресионни вектори), дрождеви клетки или клетки на бозайник. Подходящите клетки на гостоприемници са дискутирани по-нататък в Goeddel, "Gene Expression Technology" METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif., 1990. Съответно, рекомбинантният експресионен вектор може да се транскрибира и транслира in vitro, например чрез използване на T7 промоторни регулаторни секвенции и на полимераза T7.

Експресията на белтъци в прокариотите се провежда най-често в E. coli с вектори, съдържащи конститутивни или индуциращи се промотори, управляващи експресията или на рекомбинантни или на не-рекомбинантни белтъци Рекомбинантните вектори прибавят известен брой от аминокиселини към кодирания белтък, обикновено към амино краищата на рекомбинантния белтък. Такива рекомбинантни вектори се използват нормално за следните три цели: (1) да повишат експресията на рекомбинантен белтък; (2) да повишат разтворимостта на рекомбинантния белтък; и (3) да помогнат за пречистването на рекомбинантния белтък, действайки като лиганд при афинитетно пречистване. Често пъти, в рекомбинантните експресионни вектори се въвежда протеолитично място за късане, в мястото на свързване на рекомбинантната група и рекомбинантния белтък, за да се подпомогне разделянето на рекомбинантния белтък от рекомбинантната група при пречистването на рекомбинантния

белтък. Такива ензими и техните сходни разпознавани секвенции включват Фактор Ха, тромбин и ентерокиназа.

Типичните рекомбинантни експресионни вектори включват pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson (1988), Gene, 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) и pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N. J.), които свързват глутатион S-трансферазата (GST), малтозо Е свързващ белтък или протеин А, респективно, с прицелния рекомбинантен белтък.

Примери за подходящи индуциращи не-рекомбинантни E. coli експресионни вектори включват pTrc (Amrami et al., (1988) Gene 69: 301-315) и pET 11d (Studier et al., "Gene Expression Technology" METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif, 1990, pp. 60-89).

Една стратегия за максимална експресия на рекомбинантен белтък в E. coli, е белтъкът да се експресира в бактерия гостоприемник с увреден капацитет за протеолитично разграждане на рекомбинантния белтък. Виж, Gottesman,"Gene Expression Technology" METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif., 1990, pp. 119-128. Друга стратегия е да се промени секвенцията на нуклеиновата киселина от вмъкнатата нуклеинова киселина в експресионния вектор, така че отделните кодони за всяка аминокиселина са тези, които се използват предпочитателно в E. coli (Wada et al., (1992), Nucleic Acids Res., 20: 2111-2118). Такава промяна в секвенциите на нуклеиновите киселини от изобретението може да се направи чрез стандартните техники за синтез на ДНК.

В друг вариант, BAFF-R експресионният вектор е дрождев експресионен вектор. Примери на вектори за експресия в дрожди (например, Saccharomyces cerivisae) включват pYepSecl

(Baldari, et al., (1987), EMBO J., 6: 229-234), pMFa (Kurjan and Herskowitz, (1982), Cell, 30: 933-943), pJRY88 (Schultz et al., (1987), Gene, 54: 113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.), а за P. pastoris включват pPIC семейство от вектори (Invitrogen Corp, San Diego, Calif.).

Съответно, BAFF-R може да се експресира в клетки на насекоми, като се използват бакуловирус експресионни вектори. Бакуловирус векторите, способни да експресират белтъци в култивирани клетки от насекоми (например, SF9 клетки) включват pAc серии (Smith et al., (1983), Mol. Cell. Biol., 3: 2156-2165) и pVL серии (Lucklow and Summers (1989), Virology, 170: 31-39).

В друг вариант, нуклеиновата киселина от изобретението се експресира в клетки на бозайници, като се използва експресионен вектор за бозайник. Примери на експресионни вектори за бозайници включват pCDM8 (Seed, (1987), Nature, 329: 840-842) и pMT2PC (Kaufman et al., (1987), EMBO J., 6: 187-195). Когато се използват в клетки на бозайници, функциите на експресионния векторен контрол се осигуряват често от вирусни регулаторни елементи. Например, най-често използваните промотори се получават от полиома, Аденовирус 2, цитомегаловирус и Simian вирус 40.

За други подходящи експресионни системи както за прокариотните, така и за еукариотните клетки виж например, Глава 16 и 17 от Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2ND ED., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989.

В друг вариант, рекомбинантният експресионен вектор на бозайник е способен да управлява експресията на нуклеиновата

киселина предимно в специфичен клетъчен тип (например, използват се тъканно-специфични регулаторни елементи за експресиране на нуклеиновата киселина). Тъканно-специфичните регулаторни елементи са известни от областта на техниката. Не-ограничаващи примери за подходящи тъканно-специфични промотори включват, албуминовият промотор (чернодробно специфичен; Pinkert et al., (1987), Genes, Dev. 1: 268-277), лимфоид-специфични промотори (Calame and Eaton (1988), Adv. Immunol., 43: 235-275), отчасти промотори на Т клетъчни рецептори (Winoto and Baltimore, (1989), EMBO J., 8 : 729-733) и имуноглобулини (Banerji et al., (1983), Cell, 33 : 729-740; Queen and Baltimore (1983), Cell, 33 : 741-748), неврон-специфични промотори (например, неврофиламентният промотор; Byrne and Ruddle (1989), Proc. Natl. Acad. Sci., USA 86 : 5473-5477), панкреасно-специфични промотори (Edlund et al., (1985), Science, 230: 912-916) и тироид-специфични промотори за бозайник (например, промотор за млечната суроватка; U. S. Патент № 4, 873, 316 и Европейска Заявка Публикация № 264, 166). Включени са също така и промоторите, регулиращи развитието, например миши hox промотори (Kessel and Gruss (1990), Science, 249: 374-379) и а-фетопротеиновият промотор (Campes and Tilghman (1989), Genes Dev., 3: 537-546).

Освен това, изобретението осигурява рекомбинантен експресионен вектор, включващ ДНК молекула от изобретението, клонирана в експресионния вектор в антисенс ориентация. Това означава, че ДНК молекулата е свързана по оперативен път с регулаторна секвенция по начин, който позволява експресията (чрез транскрипция на ДНК молекулата) на РНК молекула, която е антисенс за BAFF-R иРНК. Могат да

се избират регулаторни секвенции свързани по оперативен път с клонираната нуклеинова киселина в антисенс ориентация, които управляват непрекъснатата експресия на антисенс РНК молекулата в различни клетъчни типове, например вирусни промотори и/или енхансери, или могат да се избират регулаторни секвенции, които управляват постоянна, тъканно специфична или специфична за клетъчния тип експресия на антисенс РНК. Антисенс експресионният вектор може да е под формата на рекомбинантен плазмид, инактивиран или изтощен вирус, в който антисенс нуклеиновите киселини се получават под контрола на силно ефективна регулаторна област, чиято активност може да се определи от клетъчния тип, в който е въведен вектора. За дискусия на регулацията на генната експресия, като се използват антисенс гени виж Weintraub et al. (1986)" Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis," Reviews--Trends in Genetics, 1 (1):.

Друг вариант от изобретението се отнася до клетки на гостоприемник, в които е въведен рекомбинантен експресионен вектор от изобретението. Тук термините "клетка гостоприемник" и "рекомбинантна клетка гостоприемник" се използват като взаимозаменяеми. Ясно е, че тези термини се отнасят не само до определена клетка от индивида, но и до потомството или потенциалното потомство на тази клетка. Тъй като в следващите поколения могат да се срещат някои модификации или поради мутация или под влияние на околната среда, такова поколение фактически няма да е идентично с родителската клетка, но те са включени в обхвата от условията използвани тук.

Клетка гостоприемник може да бъде всяка прокариотна или еукариотна клетка. Например, BAFF-R белтък може да се

експресира в бактериални клетки, такива като E. coli, клетки от насекоми клетки от дрожди или бозайници (такива като овариални клетки от китайски хамстер (CHO) или COS клетки). На специалистите в областта са известни и други подходящи клетки на гостоприемник.

Векторна ДНК може да се въведе в прокариотни или еукариотни клетки чрез техниките за стандартна трансформация или трансфекция. Използваните тук термини "трансформация" и "трансфекция" се отнасят до разнообразни приложни техники за въвеждане на чужда нуклеинова киселина (например ДНК) в клетка гостоприемник, включващи ко-преципитация с калциев фосфат или калциев хлорид, DEAE-декстран-медиирана трансфекция, липофекция или електропорация. Подходящи методи за трансформация или трансфекция на клетки гостоприемници могат да се намерят в Sambrook et al. MOLECULAR CLONING : A LABORATORY MANUAL 2ND ED., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989), и в други лабораторни ръководства.

Известно е, че при стабилна трансфекция на клетки от бозайници, в зависимост от експресионният вектор и използваната техника за трансфекция, само малка част от клетките могат да интегрират чужда ДНК в техния геном. С цел да се идентифицират и подберат тези интегрирани участъци, обикновено в клетката гостоприемник заедно с гена, който ни интересува се въвежда ген, който кодира селективен маркер (например, устойчив към антибиотици). Различните селективни маркери включват такива, които определят устойчивост към лекарствени препарати, такива като G418, хигромицин и метотрексат. Нуклеиновата киселина кодираща селективния

маркер може да се въведе в клетка гостоприемник в същия вектор като този, кодиращ BAFF-R или може да се въведе в отделен вектор. Клетките, които са трансфектирани стабилно с въведената нуклеинова киселина могат да се идентифицират чрез селекция с лекарствен препарат (например, клетки в които е включен селективен маркерен ген ще останат живи, докато другите ще загинат).

Може да се използва клетка гостоприемник от изобретението, такава като прокариотна или еукариотна клетка в култура за получаване (т.е. експресия) на BAFF-R белтък. Съответно, по-нататък изобретението осигурява методи за получаване на BAFF-R белтък, като се използват клетките гостоприемници от изобретението. В един вариант, методът включва култивиране на клетката гостоприемник от изобретението (в която е въведен рекомбинантен експресионен вектор, кодиращ BAFF-R) в подходяща среда, така че да се продуцира BAFF-R белтъка. В друг вариант методът освен това включва изолиране на BAFF-R от средата или от клетката гостоприемник.

Трансгенни животни

Клетките гостоприемници от изобретението могат да се използват също така за получаване на трансгенни животни различни от човек. Например, в един вариант клетката гостоприемник от изобретението е оплоден овоцит или ембрионална стволова клетки, в която са въведени BAFF-R-кодиращи секвенции. Такива клетки гостоприемници могат да се използват след това за създаване на не-човешки трансгенни животни, в генома на които са въведени екзогенни

BAFF-R секвенции или хомоложни рекомбинантни животни, в които ендогенните BAFF-R секвенции са променени. Такива животни са полезни за изследване на функцията и/или активността на BAFF-R и за идентифициране и/или оценка на модулаторите на BAFF-R активността. Използваният тук термин "трансгенно животно" е животно, различно от човек, за предпочитане бозайник, още по-добре гризач, такъв като плъх или мишка, в който една или повече от клетките на животното включват трансген. Други примери на трансгенни животни включват не-човешки примати, овце, кучета, крави, кози, пилета, амфибии и други. Трансгенът е екзогенна ДНК, която е интегрирана в генома на клетката от която се развива трансгенното животно и която се запазва в генома на зрялото животно, като по този начин управлява експресията на кодирания генен продукт в един или повече клетъчни типове или тъкани на трансгенното животно. Използваният тук термин "хомоложно рекомбинантно животно" е животно, различно от човек, за предпочитане бозайник, още по-добре мишка, в което ендогенният BAFF-R ген е променен чрез хомоложна рекомбинация между ендогенният ген и екзогенната ДНК молекула, включена в клетка на животното, например ембрионална клетка от животно, преди развитие на животното.

Трансгенно животно от изобретението може да се създаде чрез въвеждане на BAFF-R-кодираща нуклеинова киселина в мъжките пронуклеуси на оплодения овоцит, например чрез микроинжектиране, ретровирусна инфекция и като се даде възможност на овоцита да се развива в псевдобременно женско животно. Човешката BAFF-R ДНК секвенция от Фигура 2A (SEQ ID NO : 3), Фигура 2C (SEQ ID NO : 4), Фигура 3 (SEQ ID NO : 6) може да се въведе като трансген в генома на животно,

различно от човек. Съответно може да се изолира не-човешки хомолог на човешкия BAFF-R ген, такъв като миши BAFF-R ген (Фигура 4A) (SEQ ID NO : 8), на базата на хибридизация с човешката BAFF-R кДНК (описана преди това по-горе) и да се използва като трансген. В трансгена могат да се включат интронни секвенции и сигнали за полиаденилиране, за да се увеличи ефективността на експресия на трансгена. Към BAFF-R трансгена може да се свърже по оперативен път тъканно-специфична регулаторна секвенция(ии), за да се управлява експресията на BAFF-R белтъка в отделните клетки. Методите за създаване на трансгенни животни чрез ембрионална манипулация и микроинжектиране, по-специално животни такива като мишки, са стандартни в областта и са описани, например в U. S. Патент № 4, 736, 866; 4, 870, 009; и 4, 873, 191; и Hogan в MANIPULATING THE MOUSE EMBRYO, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1986. Сходни методи се използват за получаване на други трансгенни животни. Трансгенно създаденото животно може да бъде идентифицирано въз основа на присъствието на BAFF-R трансгена в неговия геном и/или експресията на BAFF-R иРНК в тъканите или клетките на животните. След това създаденото трансгенно животно може да се използва за размножаване на допълнителни животни, носещи трансгена. Освен това, трансгенните животни носещи трансген кодиращия BAFF-R, могат след това да бъдат оплодени с други трансгенни животни, носещи други трансгени.

За създаване на хомоложно рекомбинантно животно, се приготвя вектор, който съдържа поне част от BAFF-R гена, в който е въведена делеция, добавяне или заместване, за да се промени BAFF-R гена, например функционално нарушение.

BAFF-R генът може да бъде човешки ген (например, Фигура 2A (SEQ ID NO : 3), Фигура 2C (SEQ ID NO : 4), Фигура 3 (SEQ ID NO : 6)), но за предпочитане той е не-човешки хомолог на човешки BAFF-R ген. Например, може да се използва миши хомолог (Фигура 4a) на човешки BAFF-R ген от Фигура 2A (SEQ ID NO : 3), Фигура 2C (SEQ ID NO : 4), Фигура 3 (SEQ ID NO : 6), за да се конструира хомоложен рекомбинантен вектор, подходящ за промяна на ендогенния BAFF-R ген в мишия геном.

В един вариант векторът е конструиран така, че при хомоложна рекомбинация ендогенният BAFF-R ген е функционално нарушен (т.е., не може повече да кодира функционален белтък; известен също така като "knock out" вектор).

Съответно, векторът може да се конструира така, че при хомоложна рекомбинация ендогенният BAFF-R ген да е мутирал или променен по друг начин, но да кодира все още функционален белтък (например, upstream регулаторната област може да е променена, за да се промени експресията на ендогенния BAFF-R белтък). В хомоложния рекомбинантен вектор, променената част от BAFF-R гена е фланкирана в 5' и 3' краищата си, от допълнителна нуклеинова киселина от BAFF-R гена, за да може да стане хомоложна рекомбинация между екзогенният BAFF-R ген, носен от вектора и ендогенният BAFF-R ген в ембрионалната стволова клетка. Допълнителната фланкираща BAFF-R нуклеинова киселина е с достатъчна дължина за да се осъществи успешна хомоложна рекомбинация с ендогенния ген. Обикновено във вектора се включват няколко килобази от фланкиращата ДНК (и в двата 5' и 3' краищата). Виж, Thomas et al. (1987) Cell 51 : 503 за описание на

хомоложни рекомбинантни вектори. Векторът се въвежда в ембрионална стволова клетъчна линия (например чрез електропорация) и се избират клетки, в които въведеният BAFF-R ген се е рекомбинирал хомоложно с ендогенния BAFF-R ген (виж например, Li et al. (1992) Cell 69 : 915).

Избраните клетки след това се инжектират в бластоциста на животно (например, мишка), за да се образуват маса химери. Виж например, Bradley, в TERATOCARCINOMAS AND EMBRYONIC STEM CELLS: A PRACTICAL APPROACH, Robertson, Ed. IRL, Oxford, 1987, pp. 113-152. След това химерният ембрион може да бъде имплантиран в подходящо псевдобременно женско животно за отглеждане и ембрионът се носи до термина. Поколението носещо хомоложно рекомбинантната ДНК в своите зародишни клетки, може да се използва за отглеждане на животни, в които всички клетки от животното съдържат хомоложно рекомбинантната ДНК чрез предаване на трансгена от зародишните клетки. Методите за конструиране на хомоложно рекомбинантни вектори и хомоложно рекомбинантни животни са описани в Bradley (1991) Curr. Opin. Biotechnol. 2: 823-829; PCT Международна Публикация №-ра: WO 90/11354; WO 91/01140; WO 92/0968; и WO 93/04169.

В друг вариант, могат да се получат трансгенни нечовешки животни, които съдържат селективни системи, позволяващи да се регулира експресията на трансгена. Един пример за такава система е cre/loxP рекомбиназната система на бактериофага P1. За описание на cre/loxP рекомбиназната система, виж например, Lakso et al. (1992) Proc. Natl. Acad Sci. USA 89: 6232-6236. Друг пример за рекомбиназна система е FLP рекомбиназната система на S. cerevisiae (O'Gorman et al.

(1991) Science 251: 1351-1355. Ако се използва cre/loxP рекомбиназна система за регулиране на експресията на трансгена, необходими са животни, носещи трансгени, кодиращи както Cre рекомбиназата, така и избраният белтък. Такива животни могат да се осигурят чрез конструиране на "двойни" трансгенни животни, например чрез свързване на две трансгенни животни, едното съдържащо трансген, кодиращ селективен белтък, а другото съдържащ трансген, кодиращ рекомбиназа.

Клонове от трансгенните не-човешки животни описани тук, могат да се получат също така съгласно методите описани от Wilmut et al. (1997) Nature 385: 810-813. Накратко, от трансгенно животно може да се изолира клетка, например соматична клетка и да се индуцира да встъпи в клетъчния цикъл и да влезе в Go фаза. След това клетката в покой може да се слее, например чрез използване на електрични импулси, с овоцит, от животно от същия вид от който е изолирана клетката в покой, на който е премахнато ядрото. След това реконструираният овоцит се култивира така, че той да се развие до морула или бластоцист и след това се пренася в псевдобременно женско животно за да се развие. Роденото потомство от това женско животно ще бъде клон от животното от което е изолирана клетката, например соматичната клетка.

Фармацевтични състави

BAFF-R молекулите нуклеинова киселина, BAFF-R белтъците и анти-BAFF-R антителата (означавани тук също така като "активни съединения") от изобретението и техни производни, фрагменти, аналози и хомолози, могат да се

включат във фармацевтични състави подходящи за прилагане. Такива състави включват обикновено молекула нуклеинова киселина, белтък или антитяло и фармацевтично приемлив носител. Използваният тук термин "фармацевтично приемлив носител" включва който и да е и всички разтворители, дисперсионни среди, покрития, антибактериални и антигъбични средства, изотонични и абсорбционни задържащи доставянето средства и други подобни, съвместими с фармацевтичното приложение. Подходящи носители са описани в най-новото издание на Remington's Pharmaceutical Sciences, стандартна справка в областта, която е включена тук в цитираната литература. Предпочитани примери за такива носители или разредители включват, но не се ограничават само до, вода, солеви разтвор, разтвори на finger's, разтвор на декстроза и 5 % човешки серумен албумин. Могат да се използват също така липозоми и не-водни носители, такива като нелетливи масла. Използването на такива среди и средства като активни субстанции за фармацевтиката, е добре известно от нивото на техниката. Може да се използва всяка една подходяща среда или средство, с изключение на тези, които не са съвместими с активното съединение. В съставите могат да бъдат включвани също така и допълнителни активни съединения.

Фармацевтичният състав от изобретението се формулира така, че да е съвместим с неговия предполагаем начин на прилагане. Примери за начини на прилагане включват, парентерално, например интравенозно, интрадермално, подкожно, орално (например, чрез инхалиране), трансдермално, (локално), трансмукозно и чрез ректално приложение. Разтворите или суспензиите използвани за парентерално, интрадермално или подкожно приложение, могат да включват

следните компоненти: стерилен разредител, такъв като вода за инжектиране, солеви разтвор, нелетливи масла, полиетилен гликоли, глицерин, пропилен гликол или други синтетични разтворители; анти-бактериални средства, такива като бензил алкохол или метил парабени; антиоксиданти, такива като аскорбинова киселина или натриев бисулфит; хелатни средства, такива като етилендиаминтетраоцетна киселина (EDTA); буфери, такива като ацетатни, цитратни или фасфатни и средства за коригиране на тоничността, такива като натриев хлорид или декстроза. pH може да се коригира с киселини или основи, такива като солна киселина или натриева основа. Парентералният препарат може да бъде затворен в ампули, спринцовки за еднократна употреба или фиолки за голяма доза, направени от стъкло или пластмасови.

Фармацевтичните състави подходящи за инжекционно приложение включват стерилни водни разтвори (където водата е разтворител) или дисперсии и стерилни прахове за импровизиран препарат от стерилни разтвори за инжектиране или дисперсия. За интравенозно приложение подходящите носители включват физиологичен солеви разтвор, бактериостатична вода, Cremophor EL (BASF, Parsippany, N. J.) или фосфатен солеви буфер (PBS). Във всички случаи съставът трябва да бъде стерилен и трябва да е до такава степен течен, че да е подходящ за лесно инжектиране. Той трябва да е стабилен при използваните условия за производство и да се съхранява и трябва да се пази от контаминиращото действие на микроорганизми, такива като бактерии и гъби. Носителят може да бъде разтворител или дисперсионна среда, съдържаща например, вода, етанол, полиол (например,

глицерол, пропилен гликол и течен полиетилен гликол и други подобни) и подходящи нейни смеси.

Подходящата течливост може да се поддържа например, чрез използване на покрития, такива като лецитин, чрез поддържане на необходимия размер на частицата в случай на дисперсия и чрез използването на сърфактанти. Предпазване от действието на микроорганизми може да се постигне чрез различни анти-бактериални и анти-гъбични средства, например, парабени, хлоробутанол, фенол, аскорбинова киселина, тимерозал и други подобни. За предпочитане е в много случаи в състава да се включат изотонични средства, например захари, полиалкохоли, такива като манитол, сорбитол, натриев хлорид. Продължителна абсорбция на инжекционните състави може да се постигне чрез включване в състава на средство, което забавя абсорбцията, например, алуминиев моностеарат и желатин.

Могат да се приготвят стерилни инжекционни разтвори чрез включване на активно съединение (например, BAFF-R белтък или анти-BAFF-R антитяло) в необходимото количество в подходящ разтворител с една или комбинация от съставки изброени по-горе, както се изисква последвано от стерилизация чрез филтруване. Най-общо дисперсиите се приготвят чрез включване на активно съединение в стерилен носител, който съдържа основна дисперсионна среда и необходимите други съставни части от тези изброени по-горе. В случай на стерилни прахове за приготвяне на стерилни инжекционни разтвори методите за приготвяне са изсушаване чрез вакуум и сушене чрез замразяване, което води до получаване на прах от активната съставка плюс която и да е допълнително желана съставка от предишния стерилно филтруван разтвор.

Оралните състави обикновено включват инертен разредител или хранителен носител. Те могат да бъдат включени в желатинови капсули или да бъдат компресирани в таблетки. Ако са с цел орално терапевтично приложение, активното съединение може да бъде включено с ексципиенти и да се използва под формата на таблетки, хапчета или капсули. Орални състави могат да се приготвят също така като се използва течен носител приложим за изплакване на уста, където съединението в течния носител се прилага орално и се прави гаргара и се изхвърля или се поглъща. Като част от състава могат да се включат фармацевтични съвместими свързващи средства и/или адювантни материали. Таблетките, пилюлите, капсулите, хапчетата и други могат да съдържат която и да е от следните съставки или съединения със сходна природа: свързващо средство, такова като микрокристална целулоза, клей, трагакант или желатин; ексципиент като нишесте или лактоза, дезинтегриращо средство като алгинова киселина, Primogel или царевично нишесте; смазочно средство като магнезиев стеарат или Sterotes; придаващи хлъзгавост средство като колоидален силиконов диоксид; подслаждащо средство като захароза или захарин; или ароматизиращо средство, такова като мента, метил салицилат или портокалов аромат.

За прилагане чрез инхалиране, съединенията се доставят под формата на аерозолен спрей във флакон под налягане или чрез диспергатор, който съдържа подходящ пропелант, например газ, като въглероден диоксид или небулайзер.

Системно прилагане може да се осъществи също чрез трансмукозални или трансдермални средства. За трансмукозално или трансдермално приложение в препарата се използват пенетранти подходящи да преминат през бариерата.

Такива пенетранти са известни обикновено в областта на техниката и например включват, за трансмукозално приложение детергенти, физиологични соли и производни на фузидиевата киселина. Трансмукозалното приложение може да се осъществи чрез използване на назални спрейове или супозитории. За трансдермално прилагане, активните съединения се формулират като кремове,мазила, гелове или кремове които обикновено са известни в областта на техниката.

Съединенията могат да се приготвят също така под формата на супозитории (например, с конвенционални супозиториални бази, такива като какаово масло и други глицериди) или задържащи клизми за ректално използване.

В един вариант активните съединение се приготвят с носители, които ще предпазят съединението от бързото му елиминиране от тялото, такива като препарат с контролирано освобождаване, включващи импланти и микрокапсулирани системи за доставяне. Могат да се използват полимери способни да биодеградират и биосъвместими полимери, такива като етилен винил ацетат, полианхидриди, полигликолова киселина, колаген, полиортоестери и полимлечна киселина. Методите за приготвяне на такива формулировки ще са очевидни за специалистите в областта. Материалите могат да бъдат получени също така и чрез търговската мрежа от Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. Като фармацевтично приемливи носители могат да се използват също така липозомни суспенсии (включващи липозоми насочени към инфектирани клетки с моноклонални антитела към вирусните антигени). Те могат да се приготвят съгласно методите известни на специалистите в областта, например както е описано в U. S. Патент № 4,522,811.

Особено предимство е да се формулират орални или парентерални състави като единично дозирана форма за лесното за прилагане и еднаквост на дозата. Използваният тук термин единично дозирана форма се отнася до физично дискретни единици подходящи като единни дози за лицето, което ще бъде лекувано; всяка единица съдържа предварително определено количество от активното съединение, изчислено да даде желаният терапевтичен ефект свързан с необходимия фармацевтичен носител. Спецификацията за единично дозираните форми от изобретението се диктува от и зависи директно от уникалните характеристики на активното съединение и от специфичният терапевтичен ефект, който трябва да се постигне.

Молекулите нуклеинова киселина от изобретението могат да бъдат вмъкнати във вектори и да се използват като генно терапевтични вектори. Генно терапевтичните вектори могат да се доставят на пациента чрез всеки един от начините, например както е описано в U. S. Патент №. 5,703,055. Следователно, доставянето може да включва също така например интравенозна инжекция, локално приложение (виж U. S. Патент №. 5,328,470) или стереотактично инжектиране (виж например, Chen et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 3054-3057). Фармацевтичния препарат от генно терапевтичния вектор може да включва генен терапевтичен вектор в приемлив разредител или може да включва бавно освобождаващ матрикс, в който е включено средството даставящо гена. Съответно, когато може да се получи интактен цял вектор за доставяне на гена от рекомбинантни клетки, например ретровирусни вектори, фармацевтичния препарат може да включва една или повече клетки, които продуцират системата за доставяне на гена.

Фармацевтичните състави могат да бъдат включени в кутия, пакет или разпределителна кутия, заедно с инструкциите за приложение.

Приложения и методи на изобретението

Молекулите нуклеинова киселина, белтъците, белтъчните хомолози и антителата описани тук, могат да се използват в един или повече от следните методи: (а) анализи за скриниране ; (б) анализи за детекция (например, хромозомно картиране, тъканно типизиране, съдебна биология), (в) предсказване в медицината (например, диагностични анализи, анализи за прогноза, контролни клинични опити и фармакогеномики); и (г) методи за лечение (например, терапевтични и профилактични). Както е описано тук в един вариант, BAFF-R белтъкът от изобретението има способността да се свързва с BAFF.

Изолираните молекули нуклеинова киселина от изобретението могат да се използват за да експресират BAFF-R белтъка (например, чрез рекомбинантен експресионен вектор в клетка гостоприемник при генно терапевтични приложения), за да се детектира BAFF-R иРНК (например, в биологична проба) или за генетична лезия в BAFF-R гена и за да се модулира BAFF и/или BAFF-R активността , както е описано по-нататък по-долу. В допълнение, BAFF-R белтъците могат да се използват за скриниране на лекарствени препарати или съединения, които модулират активността на BAFF-R или експресията, така както и за лечение на нарушения, които се характеризират чрез недостатъчна или свръх продукция на BAFF и/или BAFF-R белтъка, или продукция на BAFF-R

белтъчни форми, които имат намалена или променена активност в сравнение с див тип белтък BAFF-R. В допълнение анти-BAFF-R антителата от изобретението могат да се използват за детектиране и изолиране на BAFF-R белтъци и за модулиране на BAFF и/или на BAFF-R активността.

Това изобретение освен това се отнася до нови средства идентифицирани чрез по-горе описаните анализи за скриниране и тяхното приложение за лечение, както е описано тук.

Анализи за скриниране

Изобретението осигурява метод (означен също така като "скриниращ анализ") за идентифициране на модулатори, т.е. кандидати или тест съединения или средства (например, пептиди, имитиращи пептиди, малки молекули или други лекарствени препарати) които се свързват с BAFF-R белтъците или имат стимулиращ, или инхибиторен ефект например, върху BAFF-R експресията или активността на BAFF-R.

В един вариант изобретението осигурява анализ за скриниране на кандидати или тест съединения, които се свързват с или модулират активността на BAFF-R белтъка или полипептида, или негова биологично активна част. Тест съединенията от настоящото изобретение могат да се получат като се използва, който и да е от многото подходи в комбинаторната библиотека от методи известни в областта, включващи: биологични библиотеки, специално адресирани поредици за успоредна твърда фаза или разтворена фаза; поредици от синтетични методи, изискващи деспирализиране; "one-bead one-compound" метод; и поредици от синтетични методи, използващи избор на афинитетна

хроматография. Подхода на биологична библиотека се ограничава до пептидни поредици, докато другите четири подхода са приложими за пептид, не-пептиден олигомер или малки молекулни поредици от съединения (Lam (1997) Anticancer Drug Des., 12: 145-167).

Примери за методи за синтез на поредица от молекули могат да се намерят в областта на техниката, например в: DeWitt et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6909-6013; Erb et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11422-11426; Zuckermann et al. (1994) J. Med. Chem. 37: 2678-2685 ; Cho et al. (1993) Science 261: 1303; Carrell et al. (1994) Angew Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059; Carell et al. (1994) Aragew Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061; and Gallop et al. (1994) J. Med. Chem. 37: 1233-1251.

Поредици от съединения могат да присъстват в разтвор (например, Houghten (1992), Biotechniques 13: 412-421), или върху зърна (Lam (1991), Nature 354 : 82-84), върху чипове (Fodor (1993) Nature 364: 555-556), бактерии (Ladner U. S. Патентен № 5, 223, 409), спори (Ladner U. S. Патент 5, 223, 409), плазмиди (Cull et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1865-1869), или върху фаги (Scott and Smith (1990) Science 249: 386-390; Devlin (1990) Science 249: 404-406; Cwirla et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6378-6382; Felici (1991) J MOL Biol. 222: 301-310; Ladner U. S. Патент 5, 223, 409).

В един вариант, анализът е анализ на базата на клетка, при който клетка, която експресира мембранно-свързана форма на BAFF-R белтъка или биологично активна негова част, по клетъчната повърхност, контактува със съединението за анализ и се определя способността на съединението за анализ да се свързва с BAFF-R белтъка. Клетката може да бъде например с

произход от бозайник или дрождева клетка. Определянето на способността на съединението за анализ да се свързва с BAFF-R белтъка, може да се осъществи например чрез свързване на съединението за анализ с радиоизотопен или ензимен маркер, така че свързването на съединението за анализ с BAFF-R белтъка или с биологично активна негова част, може да се определи чрез детектиране на белязаното съединение в комплекса. Например, съединението за анализ може да бъде белязано с ^{125}I, ^{35}S, ^{14}C, или ^{3}H, или директно, или индиректно и радиоизотопът да се детектира чрез директно броене на радиоемисията, или чрез сцинтилационно броене.

Съответно, съединенията за анализ могат да се бележат ензимно, например с пероксидаза от хрян, алкална фосфатаза или луцифераза и ензимният белег да се детектира чрез определяне на превръщането на подходящия субстрат в продукт. В един вариант, анализът включва контактуване на клетка, която експресира мембранно-свързана форма на BAFF-R белтъка, или на биологично активна негова част, върху клетъчната повърхност с известно съединение, което се свързва с BAFF-R, за да образува сместа за анализ, контактуване на сместа за анализ със съединението за анализ и определяне на способността на съединението за анализ да взаимодейства с BAFF-R белтъка, където определянето на способността на съединението за анализ да взаимодейства с BAFF-R белтъка, включва определяне на способността на съединението за анализ да се свързва предимно с BAFF-R или биологично активна негова част, в сравнение с известното съединение.

В друг вариант, анализът е анализ на базата на клетка, включващ контактуване на клетка, която експресира мембранно-свързана форма на BAFF-R белтъка или биологично

активна негова част, по клетъчната повърхност, със съединението за анализ и определяне способността на съединението за анализ да модулира (например, стимулира или инхибира) активността на BAFF-R белтъка или на биологично активна негова част. Определянето на способността на съединението за анализ да модулира активността на BAFF-R или на биологично активно негова част, може да се осъществи например, чрез определяне способността на BAFF-R белтъка да се свързва с или да взаимодейства с BAFF-R прицелната молекула. Използваният тук термин "прицелна молекула", е молекула с която BAFF-R белтъка се свързва или взаимодейства по природа, например, молекула по повърхността на клетката, която експресира BAFF-R белтък, молекула по повърхността на втора клетка, молекула от извънклетъчната среда, молекула свързана с вътрешната повърхност на клетъчната мембрана или цитоплазмена молекула. BAFF-R прицелната молекула може да бъде не-BAFF-R молекула или BAFF-R белтък, или полипептид от настоящото изобретение. В един вариант BAFF-R прицелната молекула е компонент на сигналния трансдукционен път, който улеснява трансдукцията на извънклетъчния сигнал (например, сигнал получен от свързване на компонент с мембранно-свързаната BAFF-R молекула) чрез клетъчната мембрана и вътре в клетката. Мишената може да бъде например втори вътреклетъчен белтък, който има каталитична активност или белтък, който улеснява свързването на downstream сигналните молекули с BAFF-R.

Определянето на способността на BAFF-R белтъка да се свързва с или да взаимодейства с BAFF-R прицелна молекула може да се осъществи чрез един от методите описани по-горе за

определяне на директното свързване. В един вариант, определянето на способността на BAFF-R белтъка да се свързва с или да взаимодейства с BAFF-R прицелна молекула, може да се осъществи чрез определяне на активността на прицелната молекула. Например, активността на прицелната молекула може да се определи чрез детектиране на индукцията на вторичен клетъчен месенджер на мишената (т.е. вътреклетъчен Ca^{2+}, диацилглицерол, IP3, и т.н.), детектиране на каталитична/ ензимна активност на мишената с подходящ субстрат, детектиране на индукцията на репортерен ген (включващ регулаторен елемент за BAFF-R-отговор, свързан по оперативен път с нуклеинова киселина, кодираща маркера, който може да се детектира, например луциферaза), или детектиране на клетъчен отговор, например преживяване на клетките, клетъчна диференцировка или клетъчна пролиферация.

В друг вариант, анализ от настоящото изобретение е анализ в безклетъчна система, включващ контактуване на BAFF-R белтък или на биологично активна негова част със съединението за анализ и определяне способността на съединението за анализ да се свързва с BAFF-R белтъка или с биологично активна негова част. Свързването на съединението за анализ с BAFF-R белтъка може да се определи или директно или индиректно, както е описано по-горе. В един вариант, анализът включва контактуване на BAFF-R белтъка или на биологично активна негова част с известно съединение, което се свързва с BAFF-R, за да се образува сместта за анализ, контактуване на сместта за анализ със съединението за анализ и определяне на способността на съединението за анализ да взаимодейства с BAFF-R белтък, където определянето на способността на съединението за анализ да взаимодейства с

BAFF-R белтък, включва определяне на способността на съединението за анализ да се свързва предимно с BAFF-R или биологично активна негова част, в сравнение с известното съединение.

В друг вариант, анализът е анализ в безклетъчна система, включващ контактуване на BAFF-R белтък или на биологично активна негова част със съединението за анализ и определяне на способността на съединението за анализ да модулира (например, стимулира или инхибира) активността на BAFF-R белтъка или на биологично активна негова част. Определянето на способността на съединението за анализ да модулира активността на BAFF-R, може да се осъществи например, чрез определяне на способността на BAFF-R белтъка да се свързва с BAFF-R прицелна молекула чрез един от методите описани по-горе за определяне на директното свързване. В алтернативен вариант, определяне на способността на съединението за анализ да модулира активността на BAFF-R, може да се осъществи чрез определяне способността на BAFF-R белтъка да модулира по-нататък BAFF-R прицелната молекула. Например, каталитичната/ензимна активност на прицелната молекула върху подходящ субстрат може да се определи както е описано пред това.

В един друг вариант, анализът в безклетъчна система включва контактуване на BAFF-R белтъка или на биологично активна негова част с известно съединение, което се свързва с BAFF-R, за да се образува сместта за анализ, контактуване на сместа за анализ със съединението за анализ и определяне на способността на съединението за анализ да взаимодейства с BAFF-R белтък, където определянето на способността на съединението за анализ да взаимодейства с BAFF-R белтък,

включва определяне на способността на BAFF-R белтъка да се свързва предимно с или да модулира активността на BAFF-R прицелната молекула.

Анализите в безклетъчна система от настоящото изобретение са удобни за използване както за разтворимата форма, така и за мембранно-свързаната форма на BAFF-R. В случай на анализ в безклетъчна система, включващ мембранно-свързаната форма на BAFF-R, може да е желателно да се използва разтварящо средство, така че мембранно-свързаната форма на BAFF-R се поддържа в разтвор. Примери за такива разтварящи средства включват не-йонни детергенти, такива като n-октилглюкозид, n-додецилглюкозид, n-додецилмалтозид, октаноил-N-метилглюкамид, деканоил-N-метилглюкамид, Triton®X-100, Triton®X-114, Thesit®, Изотридециполи (етилен гликол етер)$_n$, 3-(3-холамидопропил) диметиламониол-1-пропан сулфонат (CHAPS), 3- (3-холамидопропил) диметиламониол-2-хидрокси-1-пропан сулфонат (CHAPSO), или N-додецил-N, N-диметил-3-амонио-1-пропан сулфонат.

В повече от един вариант от по-горните методи за анализ от настоящото изобретение, може да е желателно да се имобилизира или BAFF-R или неговата прицелна молекула, за да се улесни отделянето на комплексираната от не-комплексираната форма на един или на двата белтъка, така както и за да се приспособи автоматизацията на анализа. Свързването на съединението за анализ с BAFF-R, или взаимодействието на BAFF-R с прицелната молекула в присъствие и отсъствие на кандидат съединението, може да се осъществи във всеки съд, подходящ за контактуване на реактантите. Примери за такива съдове включват микротитърни плаки, епруветки за анализ и микро-епруветки за

центрофугиране. В един вариант, се осигурява рекомбинантен белтък, който дава домен, позволяващ един или и двата белтъка да се свържат с матрикса. Например, GST-BAFF-R рекомбинантните белтъци или GST-прицелните рекомбинантни белтъци могат да се адсорбират върху зърна от глутатион сефароза (Sigma Chemical, St. Louis, MO), или микротитърни плаки, дериватизирани с глутатион, които след това се комбинират със съединението за анализ или тест съединението и или не-адсорбирания прицелен белтък, или BAFF-R белтъка и сместа се инкубира в условия, които са удачни за образуване на комплекс (например, при физиологични солеви условия и pH). След инкубацията, зърната или ямките от микротитърните плаки се измиват, за да се отстранят всички несвързани компоненти, матриксът се имобилизира в случай на зърна, комплексът се определя или директно, или индиректно, например както е описано по-горе. Съответно, комплексите могат да се дисоциират от матрикса и да се определи нивото на свързване на BAFF-R или активността, като се използват стандартни техники.

Могат да се използват също така и други техники за имобилизиране на белтъци върху матрикси в анализите за скриниране от изобретението. Например, или BAFF-R или неговата прицелна молекула могат да бъдат имобилизирани чрез използване на конюгация с биотин и стрептавидин. Биотинилиран BAFF-R или прицелни молекули могат да се приготвят от биотин-NHS (N-хидрокси-сукцинимид), като се използват техниките добре познати от нивото на техниката (например, кит за биотинилиране, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.) и като се имобилизират в покритите със стрептавидин ямки от 96 ямковите плаки (Pierce Chemical). Съответно, в ямките на

плаката могат да се получат антитела реагиращи с BAFF-R или прицелните молекули, но които не пречат на свързването на BAFF-R белтъка с неговата прицелна молекула и несвързана мишена или задържан BAFF-R в ямките, чрез конюгиране на антитяло. Методите за откриване на такива комплекси, в допълнение на тези описани по-горе за GST-имобилизираните комплекси, включват имунодетекция на комплекси, като се използват антитела, реагиращи с BAFF-R или прицелната молекула, така както и ензим-свързан анализ, който се базира на откриването на ензимна активност свързана с BAFF-R или прицелната молекула.

В друг вариант, се идентифицират модулаторите за експресията на BAFF-R чрез метод, където клетка контактува със съединението кандидат и в клетката се определя експресията на BAFF-R иРНК или белтъка. Нивото на експресия на BAFF-R иРНК или белтъка в присъствие на съединението кандидат се сравнява с нивото на експресия на BAFF-R иРНК или белтъка в отсъствие на съединението кандидат. След това съединението кандидат може да се идентифицира като модулатор на BAFF-R експресията, въз основа на това сравнение. Например, когато експресията на BAFF-R иРНК или белтъка е по-голяма (статистически значително по-голяма) в присъствие на съединението кандидат, отколкото при неговото отсъствие, съединението кандидат се идентифицира като стимулатор на BAFF-R иРНК или на белтъчната експресия.

Съответно, когато експресията на BAFF-R иРНК или на белтъка е по-малка (статистически значително по-малка) в присъствие на съединението кандидат, отколкото в негово отсъствие, съединението кандидат се идентифицира като

инхибитор на BAFF-R иРНК или на белтъчната експресия. Нивото на BAFF-R иРНК или на белтъчната експресия в клетките може да се определи чрез методите описани тук за детекция на BAFF-R иРНК или на белтъка.

В друг вариант от изобретението, BAFF-R белтъците могат да се използват като "белтъци примамка" в дву-хибриден анализ или три-хибриден анализ (виж например, U. S. Патент № 5, 283, 317; Zervos et al. (1993) Cell 72 : 223-232; Madura et al. (1993) J. Biol. Chem. 268: 12046-12054; Bartel et al. (1993) Biotechniques 14: 920-924; Iwabuchi et al. (1993) Oncogene 8: 1693-1696; and Brent WO 94/10300), за да се идентифицират други белтъци, които се свързват със или взаимодействат с BAFF-R ("BAFF-R-свързващи белтъци" или "BAFF-R-bp") и модулират активността на BAFF-R. Твърде възможно е също така такива BAFF R-свързващи белтъци да бъдат включени в разпространението на сигнала чрез BAFF-R белтъците, например като upstream или downstream елементите от BAFF-R пътя.

Дву-хибридната система се базира на модулаторната природа на повечето транскрипционни фактори, които съдържат отделни ДНК-свързващи и активиращи домени. Накратко, анализът използва два различни ДНК конструкта. В единия конструкт, генът който кодира BAFF-R е свързан с ген, кодиращ ДНК свързващия домен на известен транскрипционен фактор (например, GAL-4). В другия конструкт, ДНК секвенция, от библиотеката на ДНК секвенциите, която кодира неидентифициран белтък ("жертва" или "проба") се свързва с ген, който кодира активиращ домен от известен транскрипционен фактор. Ако белтъците "примамка" и "жертва" са способни да взаимодействат in vivo, формирайки

BAFF-R-зависим комплекс, ДНК-свързващите и активиращи домени на транскрипционния фактор са създадени близко един до друг. Тази близост позволява транскрипция на репортерен ген (например, LacZ), който е свързан по оперативен път с транскрипционно регулаторно място, отговорно за транкрипционния фактор. Експресията на репортерния ген може да се детектира и могат да се изолират клетъчни колонии, съдържащи функционалния транскрипционен фактор и те да се използват за получаване на клонирания ген, който кодира белтъка, взаимодействащ с BAFF-R.

Това изобретение по-нататък се отнася до нови средства, идентифицирани чрез по-горе описаните анализи за скриниране и тяхното приложение за лечение, както е описано тук.

Анализи за детекция

Части или фрагменти от кДНК секвенциите идентифицирани тук (и съответните цели генни секвенции) могат да се използват по много различни начини като полинуклеотидни реагенти. Например, тези секвенции могат да се използват за: (1) да се картират техните съответни гени върху хромозома; а по този начин да се локализират генните области свързани с генетично заболяване; (2) да се идентифицира един индивид от точна биологична проба (тъканно типизиране); и (3) да се подпомогне съдебното идентифициране на биологична проба. Тези приложения са описани в подразделите по-долу.

Хромозомно картиране

Веднъж след като е изолирана секвенцията (или част от секвенцията) на ген, тази секвенция може да се използва за картиране локализацията на гена върху хромозома. Този метод се нарича хромозомно картиране. Съответно, части или фрагменти от BAFF-R секвенциите описани тук, могат да се използват за картиране локализацията на BAFF-R гените респективно върху хромозома. Картирането на BAFF-R секвенциите в хромозомите е много важен първи етап за установяване на корелацията на тези секвенции с гените, свързани със заболяването.

Накратко, BAFF-R гените могат да се картират в хромозомите чрез приготвяне на PCR праймери (за предпочитане с дължина 15-25 bp) от BAFF-R секвенциите. Може да се използва компютърен анализ за BAFF-R, секвенциите, за да се изберат бързо праймери, които не обхващат повече от един екзон в геномната ДНК, което би довело до усложнения на метода за амплификация. След това тези праймери могат да се използват за PCR скриниране на соматични клетъчни хибриди, съдържащи отделни хромозоми от даден вид. Само тези хибриди, съдържащи видово-специфичен ген отговарящ на BAFF-R секвенциите, ще дадат амплифициран фрагмент.

PCR картирането на соматични клетъчни хибриди е бърз метод за определяне на отделна секвенция към специфична хромозома. Три или повече секвенции могат да се определят на ден, като се използва еднократен температурен цикъл. Като се използват BAFF-R секвенциите за конструиране на олигонуклеотидни праймери, може да се постигне

сублокализация с групи или фрагменти от специфични хромозоми.

Освен това, за да се осигури прецизна хромозомна локализация само с едно стъпало, може да се използва флуоресцентна in situ хибридизация (FISH) на ДНК секвенция със разстлани метафазни хромозоми. Разстлани хромозоми могат да се получат като се използват клетки, чието делене е блокирано в метафаза, чрез използване на химикал, като колцемид, който разрушава митотичното вретено. Хромозомите могат да се третират за кратко време с трипсин и след това да се оцветят с Гимза. Получават се светли и тъмни ивици върху всяка хромозома, така че хромозомите могат да се идентифицират поотделно. FISH техниката може да се използва с ДНК секвенция с дължина от 500 или 600 бази. Обаче, клонове по-дълги от 1,000 бази имат по-голяма възможност да се свържат с уникално хромозомно място с достатъчен интензитет на сигнала за да се открие лесно. За предпочитане е 1,000 бази, а още по добре 2,000 бази, които ще са достатъчни, за получаване на добри резултати за приемлив период от време. Като обзор за тази техника, виж Verma et al. HUMAN CHROMOSOMES : A MANUAL OF BASIC TECHNIQUES, Pergamon Press, N. Y., 1988.

Реагентите за хромозомно картиране могат да се използват поотделно за маркиране на отделна хромозома или на единично място от тази хромозома, или може да се използва група от реагенти за маркиране на много места и/или много хромозоми. Фактически за целите на картирането се предпочитат реагенти, съответстващи на не-кодиращи области от гените. Кодиращите секвенции по-вероятно са консервативни в рамките на генните

семейства и следователно се увеличава шанса за крос хибридизация по време на хромозомното картиране.

След като вече секвенцията е картирана в прецизно хромозомно място, физическата позиция на секвеницята върху хромозомата може да корелира на данните от генната карта. Такива данни са намерени например в McKusick, MENDELIAN INHERITANCE IN MAN, и са налични и на разположение чрез Johns Hopkins University Welch Medical Library). След това може да се идентифицира връзката между гените и заболяването, картирани в една и съща хромозомна област чрез скачен анализ (едновременно унаследяване на физически съседни гени), което е описано например, от Egeland et al. (1987) Nature, 325: 783-787.

Освен това могат да се определят различията в ДНК секвенциите между индивидите, засегнати или незасегнати от заболяването свързано с BAFF-R гена. Ако се наблюдава мутация в някои или във всички засегнати индивиди, но не и в незасегнатите индивиди, тогава най-вероятната причина за това специфично заболяване е мутацията. Сравняването на засегнатите и незасегнати индивиди обикновено включва най-напред търсене на структурни промени в хромозомите, такива като делеции или транслокации, които са видими от хромозомните препарати, или се откриват чрез използване на PCR, въз основа на тази ДНК секвенция. Накрая може да се направи пълно секвениране на гени от няколко индивида, за да се потвърди присъствието на мутация и за да се разграничат мутациите от полиморфизмите.

Тъканно типизиране

BAFF-R секвенциите от настоящото изобретение могат да се използват също така за идентифициране на индивиди от определени биологични проби. При тази техника индивидуалната геномна ДНК се разгражда с един или повече рестриктазни ензима и се използват като сонди за Southern блот, за да се получат отделни ивици за идентифициране. Секвенциите от настоящото изобретение са полезни като допълнителни ДНК маркери за RFLP ("полиморфизми по дължината на рестриктазен фрагмен", описан в U. S. Патент, №. No. 5, 272, 057).

Освен това, секвенциите от настоящото изобретение могат да се използват за да се осигури алтернативна техника, която определя действителната база-по-база ДНК секвенция от избраните части на отделния геном. Следователно, описаните тук BAFF-R секвенции, могат да се използват за приготвянето на два PCR праймера от 5' и 3' краищата на секвенциите. След това тези праймери могат да се използват за амплифициране на индивидуална ДНК и в последствие за нейното секвениране.

Групи от съответните ДНК секвенции от индивиди, получени по този начин, могат единствено да осигурят индивидуални идентификации, тъй като всеки индивид ще има уникален набор от такива ДНК секвенции, поради алелните различия. Секвенциите от настоящото изобретение могат да се използват за получаване на такива идентифицирани секвенции от индивиди и от тъкан. BAFF-R секвенциите от изобретението представляват уникални части от човешкия геном. Срещат се в известна степен алелни вариации в кодиращите области на тези секвенции и в по-голяма степен в не-кодиращите области.

Направена е оценка, че алелни вариации между отделните хора се срещат с честота от около 1 на всеки всеки 500 бази. Повечето от алелните вариации се дължат на единични нуклеотидни полиморфизми (SNPs), които включват полиморфизми по дължината на рестриктазен фрагмент (RFLPs).

Всяка една от описаните тук секвенции може да се използва до известна степен като стандарт, спрямо който може да се сравнява ДНК от индивид, с цел идентифициране. Тъй като се срещат голям брой полиморфизми в некодиращите области, необходими са ограничен брой секвенции, за да се разграничат индивидите. Не-кодиращите секвенции от Фигура 1A (SEQ ID NO : 1), Фигура 1B (SEQ ID NO : 2), Фигура 2A (SEQ ID NO : 3), Фигура 2B (SEQ ID NO : 4), Фигура 3 (SEQ ID NO : 6), могат спокойно да осигурят положителна индивидуална идентификация с група от около 10 до 1,000 праймера, като всеки води до получаването на не-кодираща амлифицирана секвенция от 100 бази. Ако се използват предсказаните кодиращи секвенции, като тези от Фигура 1A (SEQ ID NO : 1), Фигура 1B (SEQ ID NO : 2), Фигура 2A (SEQ ID NO : 3), Фигура 2B (SEQ ID NO : 4), Фигура 3 (SEQ ID NO : 6), то броят на подходящите праймери за положително индивидуално идентифициране ще бъде 500-2,000.

Предсказване в медицината

Настоящото изобретение се отнася също така до област в медицината за предсказване, в която се използват диагностичен анализ, прогностичен анализ, фармакогеномика и се контролират клиничните опити, с прогностични цели

(предсказващи), като по този начин се въздейства на индивидуалната профилактика. Съответно, един вариант от настоящото изобретение се отнася до диагностични анализи за определяне на експресията на BAFF-R белтък и/или на нуклеинова киселина, така както и на BAFF-R активността, в контекста на биологична проба (например, кръв, серум, клетки, тъкан), за да се определи дали един индивид е засегнат от заболяване или има нарушение или съществува риск за развитие на нарушение, свързано с ненормална експресия или BAFF-R активност. Изобретението осигурява също така прогностични (или предсказващи) анализи, за да се определи дали съществува риск за даден индивид да развитие някакво нарушение свързано с експресията на BAFF-R белтък, нуклеинова киселина или с активността му. Например, мутации в BAFF-R гена могат да се анализират в биологична проба. Тези анализи могат да се използват с цел прогноза или предсказване, за профилактично лечение на индивида преди началото на заболяването, характеризиращо се с или свързано с експресията на BAFF-R белтък, нуклеинова киселина или с неговата активност.

Друг вариант от изобретението осигурява методи за определяне експресията на BAFF-R белтък, нуклеинова киселина или на BAFF-R активността в индивид, като по този начин се избират подходящите терапевтични или профилактични средства за този индивид (тук означени като “фармакогеномики”). Фармакогеномиките позволяват избор на средства (например, на лекарствени препарати) за терапевтично или профилактично лечение на индивида, на базата на генотипа на индивида (например, изследва се генотипа на даден индивид, за да се определи способността в отговора на индивида към даденото средство).

Друг вариант от изобретението се отнася до контрол за влиянието на лекарствените средства (например лекарствени препарати, съединения) върху експресията или активността на BAFF-R при клинични опити.

Тези и други средства са описани подробно в следващите глави.

Диагностични анализи

Един примерен метод за детектиране присъствието или отсъствието на BAFF-R в биологична проба, включва получаване на биологична проба от лицето, което ще се тестува и контактуване на биологичната проба със съединение или средство, способно да детектира BAFF-R белтък или нуклеинова киселина (например, иРНК, геномна ДНК), която кодира BAFF-R белтък, така че се детектира присъствието на BAFF-R в биологичната проба. Едно средство за детектиране на BAFF-R иРНК или геномна ДНК е белязана сонда от нуклеинова киселина, способна да хибридизира с BAFF-R иРНК или с геномна ДНК.

Сондата от нуклеинова киселина може да бъде например BAFF-R нуклеинова киселина с пълна дължина, такава като нуклеиновите киселини от която и да е от Фигура 1A (SEQ ID NO : 1), Фигура 1B (SEQ ID NO : 2), Фигура 2A (SEQ ID NO : 3), Фигура 2B (SEQ ID NO : 4), Фигура 3 (SEQ ID NO : 6) или част от тях, като олигонуклеотид с дължина поне от 15, 30, 50, 100, 250 или 500 нуклеотида и достатъчна, за да хибридизира специфично при точно определени условия с BAFF-R иРНК или с геномната ДНК. Тук са описани и други

подходящи сонди за използване в диагностичните анализи от изобретението.

Едно средство за детектиране на BAFF-R белтък е антитяло, способно да се свързва с BAFF-R белтъка, за предпочитане белязано антитяло, което може да се детектира. Антителата могат да бъдат поликлонални или още по-добре е да са моноклонални. Може да се използва интактно антитяло или негов фрагмент (например, Fab или F (ab') 2). Терминът "белязано" по отношение на сондата или на антитялото, обхваща директно белязане на сондата или антитялото, чрез свързване на (т. е., физично свързване) сондата или антитялото със субстанция, която може да се детектира, така както и индиректно белязане на сондата или антитялото чрез взаимодействие с друг реагент, който е маркиран директно. Примери за индиректно белязане включват детектиране на първо антитяло чрез използване на флуоресцентно белязано второ антитяло и крайно-белязане на ДНК сонда с биотин, така че тя може да се детектира с флуоресцентно белязан стрептавидин.

Терминът "биологична проба" означава, че включва тъкани, клетки и биологични течности изолирани от лице, така както и тъкани, клетки и течности, присъстващи в лицето. Това означава, че методът за детекция от изобретението може да се използва за откриване на BAFF-R иРНК, белтък или геномна ДНК в биологична проба in vitro, а така също и in vivo. Например, in vitro техниките за откриване на BAFF-R иРНК включват Northern хибридизация и in situ хибридизация. In vitro техниките за откриване на BAFF-R белтък включват ензим-свързани имуносорбентни анализи (ELISAs), Western блотове, имунопреципитации и имунофлуоресценция. In vitro техниките

за откриване на BAFF-R геномна ДНК, включват Southern хибридизации. Освен това, in vivo техниките за откриване на BAFF-R белтък, включват въвеждане в лицето на белязано анти-BAFF-R антитяло. Например, антитялото може да бъде белязано с радиоактивен маркер, чието присъствие и локализация в лицето може да се открие чрез стандартните изобразителни техники.

В един вариант, биологичната проба съдържа белтъчни молекули от лицето, което ще се тестува. Съответно, биологичната проба може да съдържа иРНК молекули от лицето, което ще се тестува, или геномни ДНК молекули от лицето, което ще се тестува. Предпочитана биологична проба е проба от периферни кръвни левкоцити, изолирана от лицето чрез стандартните техники.

В друг вариант, методите по-нататък включват получаване на контролна биологична проба от контролно лице, контактуване на контролната проба със съединение или средство, способно да открива BAFF-R белтък, иРНК, или геномна ДНК, така, че присъствието на BAFF-R белтък, иРНК или геномна ДНК се открива в биологичната проба и се сравнява присъствието на BAFF-R белтък, иРНК или геномна ДНК в контролната проба със присъствието на BAFF-R белтък, иРНК или геномна ДНК в анализираната проба.

Изобретението се отнася също така до китове зе детектиране присъствието на BAFF-R в биологична проба. Например, китът може да съдържа: белязано съединение или средство, способно да детектира BAFF-R белтък или иРНК в биологична проба; средства за определяне на количеството на BAFF-R в пробата; и средства за сравняване на количеството на BAFF-R в пробата със стандарта. Съединението или средството

може да бъде пакетирано в подходяща опаковка. Освен това китът може да включва инструкции за използването на кита за откриване на BAFF-R белтък или нуклеинова киселина.

Прогностични анализи

Диагностичните методи описани тук могат да се използват освен това за идентифициране на лица притежаващи или с риск да развият заболяване или нарушение, свързано с анормална BAFF-R експресия или активност. Например, описаните тук анализи, като предишните диагностични анализи или следващите анализи, могат да се използват за идентифициране на лице притежаващо, или с риск да развие нарушение свързано с експресията на BAFF-R белтък, нуклеинова киселина или с неговата активност, например автоимунни условия, такива като автоимунна хемолитична анемия и системик лупус еритематозус. Съответно, прогностичните анализи могат да се използват за идентифициране на лице притежаващо или с риск да развие заболяване или нарушение. Следователно, настоящото изобретение осигурява метод за идентифициране на заболяване или разстройство, свързано с анормална експресия на BAFF-R или с неговата активност, при който от лицето се получава проба за анализ и се детектира BAFF-R белтъка или нуклеинова киселина (например, иРНК, геномна ДНК), където присъствието на BAFF-R белтък или нуклеинова киселина е като диагноза за лицето притежаващо или с риск да развие заболяване или разстройство, свързано с анормална експресия на BAFF-R или с неговата активност. Използваният тук термин “проба за анализ”, се отнася до биологична проба, получена от лицето, което ни интересува. Например, пробата за анализ може

да бъде биологична течност (например, серум), клетъчна проба или тъкан.

Освен това прогностичните анализи описани тук, могат да се използват, за да се определи дали на лицето може да се приложи средство (например, агонист, антагонист, имитиращ пептид, белтък, пептид, нуклеинова киселина, малка молекула или друг кандидат като лекарствен препарат) за лечение на заболяване или нарушение, свързано с анормална експресия или активност на BAFF-R. Например, тези методи могат да се използват, за да се определи дали лицето може да бъде лекувано ефективно с лекарствения препарат за заболяването.

Следователно, настоящото изобретение осигурява методи чрез които ще се определя дали лицето може да бъде лекувано ефективно със средството срещу разстройство, свързано с анормалната експресия или активност на BAFF-R, чрез които се получава проба за анализ и се детектират BAFF-R белтъка или нуклеиновата киселина (например, където присъствието на BAFF-R белтък или нуклеинова киселина е диагностично за лицето, на което може да се приложи средството за лечение на нарушението, свързано с анормална експресия или активност на BAFF-R).

Методът от изобретението може да се използва също така за откриване на генетични лезии в BAFF-R гена, като по този начин може да се определи, дали лицето с увреден ген е с риск за, или страда от туморогенно или автоимунно нарушение. В различни варианти методите включват откриване в проба от клетки, от лицето, наличието или отсъствието на генетично увреждане, което се характеризира поне с една промяна, повлияваща интегритета на гена, кодиращ BAFF-R-белтъка, или отсъствие на експресия на BAFF-R гена. Например, такива

генетични увреждания могат да се открият чрез установяване съществуването поне на едно от (1) делеция на един или повече нуклеотиди в BAFF-R гена; (2) прибавяне на един или повече нуклеотиди към BAFF-R гена; (3) заместване на един или повече нуклеотиди в BAFF-R гена, (4) хромозомна реорганизация на BAFF-R гена; (5) промяна в нивото на месенджер РНК транскрипт от BAFF-R гена, (6) променена модификация на BAFF-R гена, такава като метилиране на геномната ДНК, (7) присъствие на не-див тип сплайсинг модел на месенджер РНК транскрипт от BAFF-R гена, (8) не-див тип ниво на BAFF-R-белтък, (9) алелна загуба на BAFF-R гена, и (10) неподходяща пост-транслационна модификация на BAFF-R-белтъка. Както е описано тук, има широк набор от техники за анализ, известни от областта на техниката, които могат да се използват за откриване на увреждания в BAFF-R гена. Предпочитана биологична проба е проба от периферни кръвни левкоцити, изолирана от лицето чрез конвенционалните средства. Обаче може да се използва всяка една биологична проба, съдържаща ядрени клетки, включваща например, букални мукозни клетки.

В някои варианти, детекцията на увреждането включва използването на сонда/праймер в полимеразно верижна реакция (PCR) (виж например, U. S. Патент № 4, 683, 195 и 4, 683, 202), такава като прикрепен PCR или RACE PCR, или, съответно, в лигираща верижна реакция (LCR) (виж например, Landegran et al. (1988) Science 241: 1077-1080; and Nakazawa et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 360-364), последната от които може да бъде особено полезна за откриване на точкови мутации в BAFF-R-гена (виж, Abravaya et al. (1995) Nucl. Acids Res. 23: 675-682).

Този метод може да включва етапите на събиране на проба от клетки от пациент, изолиране на нуклеинова киселина (например, геномна, иРНК или и двете) от клетките от пробата, контактуване на пробата от нуклеинова киселина с един или повече праймери, които хибридизират специфично с BAFF-R гена, при строго определени условия, така че става хибридизация и амплификация на BAFF-R гена (ако присъства) и детектиране присъствието или отсъствието на амплифициран продукт, или детектиране размера на амплифицирания продукт и сравняване на дължината с контролната проба. Предвижда се ако е желателно PCR и/или LCR да се използват като предварително амплифициращо стъпало, свързано с която и да е от техниките използвани за откриване на описаните тук мутации.

Съответно амплификационните методи включват: секвенция, със самостоятелна постоянна репликация (Guatelli et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874-1878), траскрипционна амплификационна система (Kwoh, et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173-1177), Q-Beta Replicase (Lizardi et al. (1988) BioTechnology 6: 1197), или който и да е друг метод за амплифициране на нуклеинова киселина, последван от детекция на амплифицираните молекули, като се използват техниките добре известни на специалистите от областта. Тези схеми за детекция са особено полезни за детекция на молекули от нуклеинови киселини, ако присъстват много малък брой такива молекули.

В алтернативен вариант, мутации в BAFF-R гена от клетъчна проба, могат да се идентифицират като се променя модела на разграждане на рестриктазните ензими. Например, изолира се ДНК от проба и контрола, амплифицира се (по

избор), разгражда се с една или повече рестриктазни ендонуклеази и чрез гел електрофореза се определят и сравняват размера и дължината на фрагментите. Различията в дължината и размера на фрагментите между ДНК от пробата и контролата показват мутациите в ДНК от пробата. Освен това, могат да се използват секвенционно специфични рибозими (виж например, U. S. Патент, № 5, 493, 531), за да се отбележи присъствието на различни мутации чрез образувани или загуба на рибозимно място за разграждане.

В друг вариант, генетичните мутации в BAFF-R могат да се идентифицират чрез хибридизиране на нуклеинови киселини от проба и контрола, например ДНК или РНК със силно компактни сонди, съдържащи стотици или хиляди олигонуклеотиди. (Cronin et al. (1996) Human Mutation 7: 244-255; Kozal et al. (1996) Nature Med. 2: 753-759). Например, генетични мутации в BAFF-R могат да се идентифицират чрез дву-измерно подреждане, съдържащо сонди от леки ДНК, както е описано в Cronin et al. (1996) Human Mutation 7: 244-255. Накратко, първото хибридизационно подреждане на пробите може да се използва, за да се сканира ДНК по цялата и дължина в пробата и контролата и за да се идентифицират промените в базите между секвенциите, чрез линейно подреждане на последователно припокриващите се сонди. Този етап позволява да се идентифицират точкови мутации. Този етап се последва от втора хибридизация, която позволява да се характеризират специфичните мутации чрез използване на по-малко специализирани сонди, комплементарни на всички детектирани варианти или мутации. Всяка група мутации е съставена от паралелен набор от сонди, едни комплементарни на дивия-тип ген, а други комплементарни на мутантния ген.

В друг вариант, може да се използва всяка една от различните секвенционни реакции, известни от областта на техниката, за да се секвенира директно BAFF-R гена и да се детектират мутациите чрез сравняване на секвенцията от BAFF-R пробата със съответната секвенция (контрола) от див тип. Примери на реакции за секвениране включват тези, на базата на техники, разработени от Maxim и Gilbert (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 560 или Sanger (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463. Проектира се също така използването на който и да е от разнообразните методи за автоматично секвениране, когато се провежда диагностичен анализ (Naeve et al. (1995) Biotechniques 19: 448), включващи секвениране чрез мас спектрометрия (виж например, PCT Международна Публикация № WO 94/16101 ; Cohen et al. (1996) Adv. Chromatogr. 36 : 127-162; и Griffin et al. (1993) Appl. Biochem. Biotechnol. 38 : 147-159).

Други методи за детектиране на мутации в BAFF-R гена включват методи при които се използва протектиране от действието на разграждащите агенти, за да се открият некмплиментарните бази в РНК/РНК или РНК/ДНК хетеродуплексите (Myers et al. (1985) Science 230: 1242). Най-общо, тази техника на "разграждане на некомплиментарност" започва чрез осигуряване на хетеродуплекси образувани чрез хибридизация на (белязана) РНК или ДНК, съдържаща див-тип BAFF-R секвенция с възможна мутанта РНК или ДНК, получена от тъканна проба. Двойно верижните дуплекси се третират с агент, който разгражда единично-верижни участъци от дуплекса, такива които съществуват, поради липса на комплементарност между веригите в контролата и пробата. Например, дуплексите от РНК/ДНК могат да се третират с РНКаза, а ДНК/ДНК хибридите да се третират със S 1 нуклеаза,

за да се разградят ензимно неправилно свързаните участъци. В други варианти, ДНК/ДНК или РНК/ДНК дуплексите, могат да се третират с хидроксиламин или осмиев четириокис и с пиперидин , за да се разградят не комплиментарните участъци. След разграждане на не комплиментарните области, полученият материал след това се разделя в зависимост от размера чрез денатуриращ полиакриламиден гел, за да се определи размера на мутацията. Виж например, Cotton et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4397; Saleeba et aL (1992) Methods Enzymol. 217: 286-295. В даден вариант контролната ДНК или РНК може да бъде белязана за да се детектира.

В друг вариант, при реакцията за разграждане на не комплиментарните участъци се използват един или повече белтъци, които разпознават неправилно свързаните базови двойки в двойно-верижната ДНК (така наречените ензими, "поправящи не комплиментарна ДНК"), в определени системи, за откриване и картиране на точкови мутации в BAFF-R кДНК-и, получени от клетъчни проби. Например, mut Y ензима от E. coli, разгражда A в G/A неправилно свързаните участъци, а тимидин ДНК гликозилазата от HeLa клетки, разгражда T в G/T свързаните участъци (Hsu et al. (1994) Carcinogenesis 15: 1657-1662). Съгласно един примерен вариант, сонда на базата на BAFF-R секвенция, например див-тип BAFF-R секвенция , се хибридизира с кДНК или друг ДНК продукт от клетката(те) за анализ. Дуплексът се третира с ензим, поправящ не комплиментарна ДНК и разградените продукти, ако има такива, могат да се детектират чрез протоколи за електрофореза или други подобни. Виж например, U. S. Патент, № 5, 459, 039.

В друг вариант, за идентифициране на мутациите в BAFF-R гените, могат да се използват промени в електрофоретичната

подвижност. Например, може да се използва единично верижен конформационен полиморфизъм (SSCP), за откриване на различията в електрофоретичната подвижност между мутантните и див-тип нуклеинови киселини (Orita et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2766, виж също така Cotton (1993) Mutat. Res. 285 : 125-144; Hayashi (1992) Genet. Anal. Tech. Appl. 9: 73-79). Единично-верижните ДНК фрагменти от BAFF-R нуклеиновите киселини от пробата и контролата, ще се денатурират и след това ще им се даде възможност да ренатурират. Вторичната структура на едно-верижните нуклеинови киселини варира в зависимост от секвенцията и получената разлика в електрофоретичната подвижност позволява да се открие дори промяна само в една база. ДНК фрагментите могат да се бележат или да се детектират с белязани сонди. Чувствителността на анализа може да се повиши чрез използване на РНК (по-скоро отколкото ДНК), в която вторичната структура е по-чувствителна на промени в секвенцията. В един вариант, метода използва хетеродуплексен анализ, за да се разделят двойно-верижните хетеродуплексни молекули, въз основа на промените в електрофоретичната подвижност (Keen et al. (1991) Trends Genet. 7: 5).

В друг вариант се анализира движението на мутанти или див-тип фрагменти в полиакриламидни гелове, съдържащи денатуриращ градиент, като се използва гел електрофореза с денатуриращ градиент (DGGE) (Myers et al. (1985) Nature 313: 495). Когато се използва DGGE като метод за анализ, ДНК ще се модифицира, за да сме сигурни, че тя няма да се денатурира напълно, например чрез добавяне на GC фрагмент от приблизително 40 bp от високо топяща се GC-богата ДНК чрез PCR. В друг вариант се използва температурен градиент вместо

денатуриращ градиент, за да се идентифицират разликите в подвижността на контролната ДНК и ДНК пробата (Rosenbaum and Reissner (1987) Biophys. Chem. 265: 12753).

Примери на други техники за откриване на точкови мутации включват, но не се ограничават само до, селективна олигонуклеотидна хибридизация, селективна амплификация или селективно удължаване на праймерите. Например, могат да се приготвят олигонуклеотидни праймери, в които известната мутация е поставена в центъра и след това да се хибридизират с прицелната ДНК, като се използват условия, които позволяват хибридизация само, ако има перфектна комплиментарност (Saiki et al. (1986) Nature 324: 163); Saiki et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6230). Такива алелно специфични олигонуклеотиди хибридизират с PCR амплифицирана прицелна ДНК или с голям брой различни мутации, когато олигонуклеотидите са прикрепени към мембрани за хибридизация и хибридизират с белязаната прицелна ДНК.

Съответно, могат да се използват алел специфични технологии за амплификация, които зависят от селективната PCR амплификация, в съответствие с настоящото изобретение. Олигонуклеотидите използвани като праймери за специфична амплификация, могат да носят интересуващата ни мутация в центъра на молекулата (така, че амплификацията зависи от различната хибридизация) (Gibbs et al. (1989) Nucl. Acids Res. 17: 2437-2448) или в отдалечения 3' край на един праймер, където при подходящи условия може да се избегне неправилното свързване, или да се редуцира полимеразното удължаване (Prossner (1993) Tibtech 11: 238). В допълнение, може да е необходимо да се въведе ново рестриктазно място в областта на мутацията, за да се детектира създаденото ново

място за разграждане (Gasparini et al. (1992) Mol. Cell. Probes 6: 1). В някои варианти се предвижда също така амплификацията да се извършва чрез използване на Taq лигаза за амплифициране (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 189). В тези случаи, лигиране ще стане само тогава, когато има перфектна комплиментарност в 3' края и в на 5' секвенцията, което дава възможност да се открие присъствието на известна мутация в специфично място, като се следи за наличието или отсъствието на амплификация.

Описаните тук методи могат да се проведат например чрез използване на предварително пакетирани диагностични китове, включващи поне една сонда нуклеинова киселина или антитяло реагент, описан тук, които могат да се използват удачно, например при клинични условия, за диагностициране на пациенти показващи симптоми или с фамилна обремененост за заболяване или болест включваща BAFF-R ген.

Освен това, в описания тук прогностичен анализ, може да се използва всеки клетъчен тип или тъкан, в която BAFF-R се експресира. Обаче може да се използва каквато и да е биологична проба съдържаща ядрени клетки, включваща например букални мукозни клетки.

Фармакогеномики

Средствата или модулаторите, които имат стимулиращ или инхибиторен ефект върху BAFF-R активността (например, BAFF-R генната експресия), както се идентифицира чрез описания тук анализ за скриниране, могат да се приложат на индивиди за лечение на (профилактично или терапевтично) разстройства (например, тумор-свързани или автоимунни

нарушения). Във връзка с това лечение може да се има предвид или трябва да се отчитат фармакогеномиките (т. е.изследване на връзката между генотипа на индивидите и отговора на индивидите към чуждото съединение или чуждия лекарствен препарат) на индивида. Различията в метаболизма на терапевтиците може да доведе до сериозна токсичност или до терапевтичен неуспех като се променя зависимостта между дозата и кръвната концентрация на фармакологично активния лекарствен препарат. Следователно, фармакогеномиките на индивида дава възможност за селекция на ефективни средства (например, лекарствени препарати) за профилактично или терапевтично лечение, въз основа на отчитане на индивидуалния генотип. Такива фармакогеномики могат да се използват освен това за определяне на подходящи дози и терапевтични режими. Съответно, може да се определи активността на BAFF-R белтъка, експресията на BAFF-R нуклеиновата киселина или съдържанието на мутации в BAFF-R гените в един индивид, като по този начин може да се избере подходящото средство(а) за терапевтично или профилактично лечение на индивида.

Фармакокинетиките се отнасят до клинично значими наследствени варианти в отговор на лекарствените препарати, дължащи се на промяна в предразположението към лекарствения препарат и неправилното действие в засегнатите лица. Виж например, Eichelbaum (1996), Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 23: 983-985 и Linder (1997) Clin. Chem. 43: 254-266. Най-общо могат да се разграничат два типа фармакогенетични състояния. Генетични състояния предавани като единичен фактор, променящ начина на действие на лекарствените препарати върху тялото (променено действие на лекарствения

препарат) или генетични състояния предавани като отделни фактори, променящи начина по който тялото влияе на лекарствените препарати (променен лекарствен метаболизъм). Тези фармакогенетични състояния могат да се срещат или като редки дефекти или като полиморфизми. Например, недостигът на глюкозо-6-фосфат дехидрогеназата (G6PD) е често унаследявана ензимопатия при която главното клинично усложнение е хемолиза след приемане на оксидантни лекарствени препарати (анти-маларийни, сулфонамиди, аналгетици, нитрофурани) и консумиране на fava beans.

Като илюстративен вариант, активността на ензимите метаболизиращи лекарствен препарат, е главния определящ фактор както за интензитета, така и за продължителността на действие на лекарствения препарат. Откриването на генетични полиморфизми за ензимите метаболизиращи лекарствен препарат (например, N-ацетилтрансфераза 2 (NAT 2) и цитохром P450 ензимите CYP2D6 и CYP2C19), дават например едно обяснение за това, защо някои пациенти не получават очакваните ефекти от лекарствения препарат или показват подчертан отговор към лекарствения препарат и сериозна токсичност след приемане на стандартна и безопасна доза от лекарството. Тези полиморфизми се експресират като два фенотипа в популацията, със силна регулация на метаболизма (EM) и със слаба регулация на метаболизма (PM). Преобладаването на PM е различно сред различните популации. Например, генът кодиращ CYP2D6 е със силно изразен полиморфизъм и са идентифицирани няколко мутации в PM, като всички от които водят до отсъствие на функционален CYP2D6. Фенотипите със слабо изразен метаболизъм на CYP2D6 и CYP2C19 доста често дават повишен отговор към

лекарствен препарат и странични ефекти, когато те получават стандартни дози. Ако метаболитът е активно терапевтична група, PM не показва терапевтичен отговор, както е показано за аналгетичния ефект на кодеин медиирането от неговия CYP2D6-образуван морфинов метаболит. Други крайности, са така наречените ултра-бързи регулатори на метаболизма, които не отговарят на стандартните дози. Не отдавна е идентифицирана молекулната основа на ултра-бързия метаболизъм, която се дължи на генната амплификация на CYP2D6.

Следователно активността на BAFF-R белтъка, експресията на BAFF-R нуклеинова киселина или съдържанието на мутациите в BAFF-R гените в индивида, може да се определи като се избере подходящо средство (средства) за терапевтично или профилактично лечение на индивида. В допълнение, фармакогенетичните изследвания могат да се използват за прилагане на генотипиране на полиморфни алели, кодиращи ензими метаболизиращи лекарствения препарат за идентифициране на индивидуалния фенотип-отговор към лекарствен препарат. Тези знания, когато се прилагат за дозиране или за избор на лекарствен препарат, могат да избегнат неблагоприятните реакции или терапевтичния неуспех и по този начин увеличават терапевтичната или профилактична ефективност, когато се лекува дадено лице с BAFF-R модулатор, като модулатор идентифициран чрез един от примерите, описани тук при анализа на скриниране.

Контрол на клиничната ефективност

Контролът за влияние на средства (например, лекарствени препарати, съединения) върху експресията или активността на BAFF-R (например, способността да модулират променена клетъчна пролиферация и/или диференцировка) може да се прилага не само при скриниране на основен лекарствен препарат, но също и при клинични опити. Например, ефективността на едно средство, определена чрез анализ за скриниране, както е описано тук, за да увеличи генната експресия на BAFF-R, нивата на белтък или да повиши активността на BAFF-R, може да се проследи в клинични опити на лица, показващи намалена генна експресия на BAFF-R, на нива на белтък, или с понижена BAFF-R активност. Съответно ефективността на средство, определено чрез анализ за скриниране, за да намали генната експресия на BAFF-R, на нивата на белтък или да понижи активността на BAFF-R, може да се проследи в клинични опити на лица, показващи увеличена генна експресия на BAFF-R, на нива на белтък или с повишена BAFF-R активност. В такива клинични опити, експресията или активността на BAFF-R и предимно на други гени, които участват например в нарушение, може да се използва, като "обяснение" или маркери за имунния отговор на определена клетка.

Например, могат да се идентифицират гени включващи BAFF-R, които се модулират в клетки, чрез третиране със средство (например, съединение, лекарствен препарат или малка молекула) което модулира BAFF-R активността (например, идентифицирана, чрез анализ за скриниране, както е описано тук). Следователно, за да се изследва ефекта на

средства при нарушения в клетъчната пролиферация, например, в клиничен опит, могат да се изолират клетки и да се приготви РНК и тя да се анализира за нивата на експресия на BAFF-R и други гени, участващи в това нарушение. Нивата на генна експресия (т.е. модела на генна експресия) може да се определи количествено, чрез Northern блот анализ или RT-PCR, както е описано тук или съответно чрез измерване на количеството на получения белтък, чрез един от методите, както е описано тук, или чрез измерване нивата на активност на BAFF-R или на други гени. По този начин, моделът на генна експресия може да послужи като маркер, показващ физиологичният отговор на клетките към средството. Съответно, това състояние на отговора може да се определи преди това и в различни точки по време на лечението на индивида с даденото средство.

В един вариант, изобретението осигурява метод за контрол на ефективността на лечение на лице със средство (например, агонист, антагонист, белтък, пептид, наподобяващ пептид, нуклеинова киселина, малка молекула или друг кандидат за лекарствен препарат, идентифицирани чрез анализ за скриниране, описан тук) включващ етапите на (1) получаване на предварително приложена проба от лице, преди прилагане на средството; (2) детектиране нивото на експресия на BAFF-R белтък, иРНК, или геномна ДНК в предварително приложената проба; (3) получаване на една или повече проби от лицето след прилагане; (4) детектиране нивото на експресия или активността на BAFF-R белтък, иРНК или геномна ДНК в проби след прилагане; (5) сравняване нивото на експресия или на активност на BAFF-R белтъка, иРНК, или геномна ДНК в проба преди прилагане със BAFF-R белтъка, иРНК или геномна ДНК в проба или проби след прилагане; и (6) съответно

променяйки прилагането на средствата към лицето. Например, може да е желателно повишено прилагане на средството за да се увеличи експресията или активността на BAFF-R до по-високи нива от детектираните, т.е. да се повиши ефективността на средството. Съответно, може да е желателно понижено прилагане на средството, за да се намали експресията или активността на BAFF-R до по-ниски нива от детектираните, т.е. да се намали ефективността на средството.

Методи за лечение

Настоящето изобретение осигурява както профилактични така и терапевтични методи за лечение на лице с риск от (или с предразположение към) нарушение или притежаващо разстройство свързано с анормална BAFF-R експресия или активност.

Заболяванията или нарушенията, които се характеризират с увеличени нива (по отношение на лицето не страдащо от заболяване или нарушение) или биологична активност, могат да се лекуват с терапевтици които са антагонисти на активността (т.е. намаляват или инхибират). Терапевтиците, които са антагонисти на активността, могат да се прилагат, като терапевтичен или профилактичен начин. Терапевтиците, които могат да се използват включват, но не се ограничават само до (1) BAFF-R полипептид или негови аналози, производни, фрагменти или хомолози; (2) антитела, към BAFF-R пептид; (3) нуклеинови киселини, кодиращи BAFF-R пептид; (4) прилагане на анти-сенс нуклеинова киселина и нуклеинови киселини, които са "не-функционални" (т.е. поради хетероложно включване в кодиращите секвенции на кодиращи секвенции за

BAFF-R пептид) се използва за да се нокаутира ендогенната функция на BAFF-R пептид, чрез хомоложна рекомбинация (виж например, Capecchi (1989) Science 244: 1288-1292); или (5) модулатори (т.е. инхибитори, агонисти и антагонисти, включващи допълнителен наподобяващ пептид от изобретението или антитела специфични за пептид от изобретението), които променят взаимодействието между BAFF-R пептида и свързващите се с него партньори.

Заболяванията или нарушенията, които се характеризират с намалени нива (по отношение на лице, не-страдащо от заболяването или нарушението) или биологична активност, могат да се третират с терапевтици, които увеличават (т.е. те са агонисти за) активността. Терапевтиците, които повишават активността, могат да се прилагат по терапевтичен или профилактичен начин. Терапевтиците, които могат да се използват, включват, но не се ограничават само до BAFF-R пептид, или негови аналози, производни, фрагменти или хомолози; или агонист, който увеличава бионаличността.

Увеличените или намалени нива, могат лесно да се детектират, чрез измерване на количеството пептид и/или РНК, чрез получаване на тъканна проба от пациента (например тъкан от биопсия) и чрез анализа in vitro на РНК или белтъчни нива, структура и/или активност на експресираните пептиди (или иРНКи на BAFF-R пептида). Методите, които са добре известни в областта, включват, но не се ограничават само до, имуноанализи (например, чрез Western блот анализ, имунопреципитация, последвана от полиакриламидна гел-електрофореза с натриев додецил сулфат (SDS), имуноцитохимия и т.н.) и/или хибридизационни анализи за да

се детектира експресията на иРНКи (например, Northern анализи, дот блотове, in situ хибридизация и т.н.).

В един вариант, изобретението осигурява метод за предпазване на лице, от заболяване или случай свързан с анормална експресия или активност на BAFF-R, чрез прилагане на лицето на средство, което модулира експресията на BAFF-R или поне на активността на един BAFF-R. Лица, които са с риск от заболяване, което се причинява или допринася за анормалната BAFF-R експресия или активност, могат да се идентифицират, например чрез които и да са или комбинация от диагностични или прогностични анализи, както е описано тук. Прилагането на профилактично средство може да стане преди да се проявят симптомите, характерни за анормалността на BAFF-R, така че заболяването или нарушението се предотвратява или съответно се забавя неговото развитие. В зависимост от типа аномалия на BAFF-R, може да се използва например BAFF-R агонистично или BAFF-R антагонистично средство за лечение на лицето. Подходящото средство може да се определи, на базата на анализи за скриниране, описани тук.

Друг вариант от изобретението, се отнася до методи за модулиране на експресията или активността на BAFF-R за терапевтични цели. Методът за модулиране от изобретението включва контактуване на клетка със средство, което модулира една или повече от активностите на BAFF-R белтъка, свързани с клетката. Средство, което модулира активността на BAFF-R белтъка, може да бъде средство, както е описано тук, като нуклеинова киселина, или белтък, естествено-срещащ се сроден лиганд на BAFF-R белтък, пептид, наподобяващ на BAFF-R пептид или друга малка молекула.

В един вариант, средството стимулира една или повече от BAFF-R белтъчните активности. Примери за такива стимулиращи средства, включват активен BAFF-R белтък и молекула на нуклеинова киселина, кодираща BAFF-R, която е включена в клетката. В друг вариант, средството подтиска една или повече от BAFF-R белтъчните активности. Примери за такива инхибиторни средства, включват анти-сенс молекули BAFF-R нуклеинова киселина и анти-BAFF-R антитела. Тези методи за модулиране могат да се проведат in vitro (например, чрез култивиране на клетка със средството) или съответно in vivo (например, чрез прилагане на средството към лицето).По този начин, настоящето изобретение осигурява методи за лечение на индивид, засегнат от заболяване или нарушение, характеризиращо се с анормална експресия или активност на BAFF-R белтък или на молекула на нуклеинова киселина. В един вариант, методът включва прилагане на средство, (например средство, идентифицирано, чрез анализ за скриниране описан тук) или комбинация от средства, които модулират (например повишаващи или намаляващи) експресията или активността на BAFF-R. В друг вариант методът включва прилагане на BAFF-R белтък или молекула нуклеинова киселина, като терапия за да се компенсира намалената или променена BAFF-R експресия или активност.

В един вариант, изобретението осигурява методи за използване на BAFF-R. В тези методи са включени методи за подтискане на растежа на В-клетки, дендритни клетки индуциращи В-клетъчен растеж и зреене или продукция на имуноглобулин в животно, като се използва BAFF-R полипептид, включващ поне една BAFF свързваща част от BAFF-R. Други варианти включват методи за стимулиране

растежа на В-клетки, дендритни клетки, индуциращи В-клетъчен растеж и зреене или продукция на имуноглобулин в животно, като се използва BAFF-R полипептид (такива като чрез трансфектиране на клетките, които са лишени от BAFF-R с вектори за да се позволи ефективна експресия на BAFF-R или чрез прилагане на антитела, които се свързват с BAFF-R и наподобяват BAFF).

В друг вариант, изобретението осигурява методи за използване на BAFF-R за лечение на автоимунни заболявания, хипертензия, сърдечносъдови нарушения, бъбречни нарушения, В-клетъчни лимфопролиферативни нарушения, имуно-супресивни заболявания, органна трансплантация и HIV. Включени са също така методи за използване на средства за лечение, подтискане или промяна на имунен отговор, включващ сигнален път между BAFF-R и неговия лиганд, и методи за подтискане на възпалението, чрез прилагане на антитяло, специфично за BAFF-R или за негов епитоп.

Методите от настоящето изобретение, се провеждат предимно, чрез прилагане на терапевтично ефективно количество от BAFF-R полипептид, химерна молекула, включваща BAFF-R полипептид, свързан с хетероложна аминокиселинна секвенция, или хомолог на анти-BAFF-R антитялото.

В един вариант, изобретението осигурява фармацевтични състави, включващи BAFF-R полипептид и фармацевтично приемлив ексципиент.

В друг вариант, изобретението осигурява химерни молекули, включващи BAFF-R полипептид, свързан с хетероложен полипептид или аминокиселинна секвенция. Един

пример за такава химерна молекула, включва BAFF-R свързан с Fc област от имуноглобулин или епитопна tag секвенция.

В друг вариант, изобретението осигурява антитяло, което се свързва специфично с BAFF-R полипептид. По избор, антитялото е моноклонално антитяло.

Един вариант от изобретението е метод за лечение на бозайник за болестно състояние, свързано с нежелана клетъчна пролиферация, чрез прилагане към бозайника на терапевтично ефективно количество от състав, включващ BAFF-R антагонист, където BAFF-R антагонистът, включва полипептид, който антагонизира взаимодействието между BAFF-R и неговият сроден рецептор или рецептори, с фармацевтично приемлив реципиент.

В предпочитан вариант, сродният рецептор на BAFF по клетъчната повърхност е BAFF-R.

Методът може да се използва, с който и да е BAFF-R антагонист, който има полипептид, който антагонизира взаимодействието между BAFF и неговия сроден рецептор или рецептори. Примери, на BAFF-R антагонисти, включват но не се ограничават само до разтворим BAFF-R полипептид, разтворими, химерни BAFF-R молекули, включващи но не се ограничават само до BAFF-R-IgG-Fc и хомолози на анти-BAFF-R антитяло.

Методът от изобретението може да се използва при което и да е болестно състояние, свързано с нежелана пролиферация. По-специално, методите от настоящето изобретение, могат да се използват за лечение на туморни клетки, които експресират BAFF и/или BAFF-R.

Примери за тумори, чиято клетъчна пролиферация се модулира от BAFF могат да се проучат чрез измерване in vitro

на нивото на BAFF и/или на BAFF-R информацията, експресирана в туморни тъканни библиотеки. Туморните тъканни библиотеки, в които BAFF и/или BAFF-R информацията се експресира силно, са кандидати. Съответно, може да се проучи кандидатът, като се търсят обществени и частни база данни (т.е. Incyte база данни) например с пълната дължина на човешка BAFF кДНК секвенция.

BAFF-R антагонистите от изобретението, които се използват за лечение на болестни състояния, свързани с нежелана клетъчна пролиферация, по-специално туморна терапия, инхибират предимно растежа на туморната клетка, повече от 10 %, 20 %, 30 % или 40 %, а с още по-голямо предимство повече от 50 %. BAFF-R антагонистите се получават чрез скриниране. Например BAFF-R антагонистите могат да се изберат въз основа на активността на инхибиране на растежа (т.е. по-голяма от 10 %, 20 %, 30 %, 40 % или 50 %) спрямо човешка карциномна линия на дебелото черво HT29 или човешка белодробна карцинома линия A549, които са получени съответно от тумор на дебелото черво и тумор на белия дроб.

Друг вариант от изобретението, осигурява методи за подтискане на растежа на B-клетки и на клетки, различни от B клетки, дендритни клетки, индуциращи B-клетъчен растеж и зреене или продукция на имуноглобулин в животно, като се използват BAFF-R полипептиди, като тези, описани по-горе.

Методът за подтискане растежа на B-клетки и на клетки, различни от B клетки, дендритни клетки, индуциращи B-клетъчен растеж и зреенето или продукцията на имуноглобулин, може да включва също така прилагане на анти-BAFF-R антитяло (поликлонално или моноклонално), което се свързва с BAFF-R и подтиска свързването на BAFF с BAFF-R.

По този начин, прилагането на антитяло, подтиска растежа на В-клетки и на клетки различни от В-клетки, дендритни клетки, индуциращи В-клетъчен растеж и зреенето или продукцията на имуноглобулин. Количеството на антитяло, което е подходящо за използване, може да се екстраполира от in vivo данните, осигурени тук. Известни са различни методи в областта, за екстраполиране на дози от експерименти с животни, включващи например екстраполиране въз основа на телесното тегло или повърхностната площ.

В някои варианти от изобретението, BAFF-R: Fc полипептидите, или анти-BAFF-R антителата, се прилагат в количество от около 1 до 20 mg/kg/доза. Дозите могат да се дават два пъти седмично, един път седмично, един път на всеки две седмици или един път месечно, ако е необходимо. Един лекар би могъл да определи точната доза, чрез определяне на баланса на ефективност спрямо намаляването на който и да е от неблагоприятните ефекти от терапията.

В друг вариант, изобретението осигурява методи за използването на BAFF-R или на анти-BAFF-R антитела, за лечение на автоимунни заболявания, хипертензия, сърдечно съдови нарушения, бъбречна недостатъчност, В-клетъчно лимфо-пролиферативни нарушения, имуносупресивни заболявания, органна трансплантация, възпаление и HIV. Включени са също така методи за използване на средства за лечение, супресиране или промяна на имунния отговор, включващи сигнален път между BAFF-R и неговия лиганд.

Методи за инхибиране на агрегирането на експресиран белтък, включващи BAFF-R и BAFF-R : Fc

Изобретението осигурява също така метод за подтискане или намаляване на агрегацията на експресиран белтък, по-специално на човешки BAFF-R или huBAFF-R: Fc, който проявява тенденция към агрегиране по време на експресия което възпрепятства пречистването на големи количества. В метода от изобретението аминокиселинната секвенция на белтък, който има тенденция да агрегира, когато се експресира в рекомбинантна система се сравнява с аминокиселинната секвенция на хомолог от белтък, който показва по-слаба активност към агрегиране. Двата хомолога, ще имат консервативни домени и не-консервативни аминокиселини между и вероятно разпръснати в тях. Най-общо поне една от не-консервативните аминокиселини от агрегиращия белтък може да бъде заместена с аминокиселина в хомолога, за да се облекчи агрегацията. В някои варианти, не-полярните аминокиселини са заместени. Не-полярни аминокиселини включват глицин, аланин, валин, левцин, изолевцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан и цистеин. В някои варианти, не-полярни аминокиселини са заместени с други не-полярни аминокиселини. Предпочитани не-полярни аминокиселини, за подтискане или намаляване на агрегацията са пролин и аланин. В други варианти, е заместена не-заредена полярна аминокиселина, с неполярна аминокиселина. Не-заредените полярни аминокиселини включват аспаргин, глутамин, серин, треонин и тирозин.

В метода от изобретението, се правят замествания, които позволяват предимно на белтъка да запази биологичната си

активност. Най-общо не-консервативните аминокиселини са податливи на заместване без да се повлиява съществено биологичната активност.

В специфичен пример от метода от изобретението, човешки BAFF-R белтък, може да има аминокиселинни замествания включени в позиции V20, P21, A22 и L27 от SEQ ID NO : 5 (или V41, P42, A43 и L48 от SEQ ID NO : 10) и различни техни комбинации, които до голяма степен облекчават агрегирането на белтъка. Сходни стратегии могат да се използват и за други белтъци, които имат тенденция да агрегират, когато се експресират в рекомбинантни системи. Без да искаме да се придържаме към която и да е по-специална теория, счита се че заместването на не-заредени полярни аминокиселини с не-полярни аминокиселини придава разтворимост на белтъка и намалява агрегирането на не-полярните участъци между белтъците.

Настоящето изобретение няма за цел да ограничи обхвата чрез специфичните варианти, описани тук. В действителност, различни модификации от изобретението, в допълнение към тези описани тук ще станат очевидни за специалистите в областта от предшестващото описание и придружаващите фигури. Тези модификации спадат в обхвата на придружаващите патентни претенции.

ПРИМЕРИ ЗА ИЗПЪЛНЕНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Пример 1

Този пример описва молекулното клониране на BAFF-R нов рецептор за BAFF.

Материали и методи

Прави се праймирана олиго-dT кДНК библиотека от BJAB клетки, човешка В клетъчна линия, която се свързва с човешки BAFF и насочено се клонира в експресионен вектор CH269. CH269 е производен на pCEP4 (Invitrogen), който съдържа CMV промотор, да инициира експресията на клонирана ДНК и съдържа също така oriP от EBV. Това позволява получаване на много копия, чрез автономна репликация на тези плазмиди в клетки, които са стабилно трансформирани с EBNA-1, такива като 293EBNA. BJAB кДНК библиотеката се трансфектира в E. coli DH10B клетки и се посяват в 96 ямкова плака с количество от приблизително 2500 отделни клонове на ямка. От тези количества се получава ДНК, като се използва Qiagen BioRobot 9600. Количествата ДНК се трансфектират, чрез използване на Lipofectamine (Life Technologies) в 293EBNA клетки, засяти върху фибронектин-покрити 6 ямкови плаки. 48 часа след трансфекцията, средата се отстранява и клетките се промиват с буфер за промиване (20 mM HEPES, 0.5 mg/ml говежди серумен албумин и 0.1 % NaN_3). Клетъчните монослоеве се покриват с 100 mg/ml биотинилиран човешки рекомбинантен разтворим myc-BAFF (myc-huBAFF) в свързващ буфер (PBS, 2 % фетален говежди серум, 0.1 % NaN_3) и се инкубират на стайна температура в продължение на 1 час. myc-huBAFF (аминокиселини 136-285) използван в анализа се експресира в Pichia pastoris и се пречиства чрез анионно обменна хроматография, последвана от гел филтрация.

BAFF разтворът се отстранява и клетките се промиват и фиксират чрез инкубиране с 1.8 % формалдехид-0.2 % глутарадлехид в PBS в продължение на 5 минути. Клетките се

промиват отново и след това се инкубират в продължение на 30 минути със стрептавидин, конюгиран с алкална фосфатаза (SAV-AP) (Jackson ImmunoResearch) при разреждане 1:3000 от сток разтвора в буфер за свързване.

След това клетките се промиват и се оцветяват с fast red/нафтол фосфат (Pierce). Клетките, свързващи се с биотин-BAFF/SAV-AP комплекс се идентифицират чрез присъствие на червен преципитат, след наблюдение под микроскоп със слабо увеличение. Вторичното скриниране е свързано с посяване на сток-разтвор от DH10B клетки в глицерол, от BAFF свързаните количества за получаване на единични колонии, инокулирани в култура в количества от 100 и повтаряне на BAFF свързващия анализ, както е описано по-горе. Вторично скриниране на позитивните количества по подобен начин се разделят на единични колонии и се анализират за BAFF свързване при трансфекция на 293EBNA, както е описано по-горе. Определя се ДНК секвенцията на независими BAFF свързани клонове.

Резултати

Един от BAFF свързващите клонове е pJST576. Той има въведен генетичен елемент с големина 1201 базови двойки (bp) който не включва поли-А опашка. Секвенцията на въведения генетичен елемент от pJST576 е показана на Фиг. 1А (SEQ ID NO : 1). BLAST анализи на този клон показват хомология в Genbank базата данни с хромозома 22 BAC клон HS250D10 (номер на достъп Z99716). Цялата секвенция на pJST576 е намерена в този BAC. Хомология е намерена също така с 3' края на човешки EST, AI250289 (IMAGE клон 2000271). EST се получава от човешка фоликулна лимфомна библиотека. EST

AI250289 е получена от Incyte и е определена секвенцията на въведения генетичен елемент (Фиг. 1B) (SEQ ID NO 2). Тази секвенция добавя 15 bp от 5' секвенцията към секвенцията на pJST576, която е съседна на геномната секвенция и 23 bp, която не е. Остатъка от EST секвенцията има перфектна хомология с pJST576. В тези клонове не може да се идентифицира отворена рамка за четене.

Пример 2

В този пример, ние определяме, че JST576 кДНК съдържа интрон и след това установяваме отворена рамка на четене.

Методи

JST576 кДНК секвенцията е анализирана с Програма за предсказване на екзони GENSCAN (Burge, C. & Karlin, S. J. (1997) Mol. Biol. 268: 78-94). Резултатите от тази програма предсказват, че в кДНК присъства интрон. За да се определи дали предсказването е коректно, се провежда PCR анализ на първата кДНК верига от 2 клетъчни линии, експресиращи JST576. РНК се пречиства от приблизително 107 BJAB или IM-9 клетки, като се използва RNeasy kit (Qiagen) съгласно предложения от производителя протокол. Измерва се количеството на РНК и 5 μg се използват за реакциите с първата кДНК верига, чрез използване на Superscript кит за предварителна амплификация (Life Technologies). Използват се както олиго dT така и случайни хексамери, за да се получи продукта на първата верига. Синтезът на първата верига се провежда, съгласно препоръчаният протокол. Като матрица за

PCR се използват три (1 за всяка реакция, 10 ng от JST576 или без ДНК), като се използват олигонуклеотиди фланкиращи предсказания интрон. Олигонуклеотидите, използвани за реакцията са 5' олиго BAF-225
[5'-GCCGAGTGCTTCGACCTGCT-3'] (SEQ ID NO : 33) или BAF-226
[5'-GGTCCGCCACTGCGTGGCCTG-3'] (SEQ ID NO : 34) и 3'олиго BAF-191
[5'-CACCAAGACGGCCGGCCCTGA-3'] (SEQ ID NO : 35).

Всяка реакция съдържа 1 x Pfu буфер (Stratagene), 200 (M dNTPs, 10 % DMSO, 150 ng от всеки олиго и 1.25 единици от Turbo Pfu полимераза (Stratagene). Провежда се реакция 35 цикъла при условия: 94^0 C в продължение на 30 сек., 60^0 C в продължение на 1 минута, и 72^0 C в продължение на 1.5 минути. Десет μl от всяка реакционна смес се нанася върху 1 % агарозен гел. Останалите продукти от BJAB и IM-9 BAF-225/191 реакциите се пречистват, като се използва кит за пречистване High Pure PCR (Roche Molecular Biochemicals) и голямото количество продукт се подлага на ДНК секвениране. В допълнение, се получават PCR продукти, като се използват праймерите BAF- 225 и BAF-191 от останалата В-клетъчна кДНК, субклонират се и отделните клонове се секвенират. Тук се използват 5 μl от останалата В-клетъчна кДНК (Clontech) в PCR реакция с BAF-225 и BAF-191 праймерите, както е обяснено подробно по-горе. След това PCR продуктът се пречиства, като се използва кит за пречистване High Pure PCR и се концентрира. За да се субклонира PCR фрагментът, краищата на фрагмента се фосфорилират и се правят тъпи краища, като се използва кит за лигиране Sure Clone (Amersham Pharmacia Biotech) както се препоръчва. Полученият продукт се клонира в

EcoRV място на pBluescriptII (Stratagene) и се трансформира в E. coli. Отделните колонии се култивират, и се екстрахират малки количества плазмидна ДНК.

Шест независими изолата се секвенират.

Резултати

Зрялата нуклеотидна и аминокиселинна секвенция на JST576, предсказани чрез GENSCAN програмата е показана на Фигура 2A (SEQ ID NO : 3). PCR продуктите от BJAB и IM9 реакциите, обхващащи предсказания интрон, са показани на Фигура 2B и потвърждават съществуването на интрон в JST576 кДНК клон. Предсказаният размер на PCR продукта от JST576 кДНК е приблизително 788 bp за BAF-225/BAF-191 и 767 bp за BAF-226/BAF-191.

PCR продуктите, получени от JST576 матрицата са с приблизително този размер (стартове 10 и 11). PCR продуктите, получени чрез използване на BAF-225/BAF-191 или върху олиго dT праймиран BJAB или IM-9 първа кДНК верига (стартове 2 и 6) са със същия размер и значително по-къси отколкото продукта от JST576 кДНК. Предсказаният размер на този фрагмент без предсказания интрон е 484 bp. Размерът на PCR продуктите е в съответствие с този размер. Същите резултати са получени ако са праймирани BJAB или IM-9 РНК със случайни хексамери (стартове 4 и 8). Реакциите, чрез използване на BAF-226/BAF-191 не се получават върху първите кДНК верижни матрици. Следователно, ясно е, че интронът предсказан, чрез GENSCAN програмата не съществува в JST576 кДНК. Секвенцията на сплайсирания продукт от BJAB и IM-9 РНК се потвърждава, чрез секвениране на голямо количество

PCR продукт и рефлектира в секвенцията, показана на Фигура 2C (SEQ ID NO : 4). Секвенцията е идентична със секвенцията, показана на Фигура 2A (SEQ ID NO : 3), с изключение на отсъствието на аланинов кодон (GCA) в нуклеотид 149 (показан с малки букви). Резултатите от секвенирането на 6 независими клона от RT-PCR реакцията върху останалата B-клетъчна кДНК показват, че се използват и двете сплайсирани акцепторни места. Предпочитано акцепторно място, вероятно се явява продуктът, получен с един аланинов остатък (5/6 клона). Обаче, секвенцията, предсказана от GENSCAN (SEQ ID NO : 3), която съдържа два аланина, се наблюдава в 1/6 клона. Следователно е установена отворена рамка на четене за човешки JST576 и е определен единичен аминокиселинен сплайс вариант. Отворената рамка на четене, предсказва белтък със 184 аминокиселини, показан на Фигура 2D (SEQ ID NO : 5). Аланиновият остатък (A), отбелязан с плътен контур, представлява сплайс варианта. Този белтък се означава като BAFF-R. Получената по пътя на дедукция аминокиселинна секвенция на BAFF-R включва хидрофобна област от остатъци 72-100 (Hopp-Woods алгоритъм) и потенциален трансмембранен сегмент от остатъци 84-102, както са анализирани чрез TMPred алгоритъм. Тази област е последвана от силно заредена аминокиселинна верига, която може да функционира, като стоп сигнал за пренос. В BAFF-R липсва N-крайна сигнална секвенция и той е тип III мембранен белтък, сходен с другите BAFF свързващи белтъци BCMA (Laabi et al. (1992) EMBO J. 11: 3897-3904) и TACI (von Bulow и Bram, (1997) Science 278: 138-141).

Предсказано е, че N-краят е извънклетъчен домен на BAFF-R и съдържа 4 цистеинови мотива в остатъци 19-35, за

разлика от който и да е друг член от семейството на TNF рецепторите. Предсказано е, че С-краят на BAFF-R е вътреклетъчен домен.

Пример 3

Тук ние определяме ДНК секвенцията upstream от предполагаемият инициращ метионин за човешки BAFF-R, включваща стоп-кодон в рамка.

Методи

Направен е Праймер BAF-254 (5'GGGCGCCTACAATCTCAGCTA 3') (SEQ ID NO : 36) за геномната секвенция, присъстваща в BAC HS250d10 (Genbank номер за достъп Z99716), upstream от предполагаемият ATG и е използван в PCR реакция с олиго BAF-236 (5'GGCGGACCAGCAGGTCGAAGCACTC 3') (SEQ ID NO : 37).

Матрицата в реакцията е първата кДНК верига, направена от човешка далачна РНК (Clontech) като се използва PCR кит за предварителна амплификация, както е описано от производителя (Life Technologies). PCR реакцията съдържа 3 μl от реакционната смес на първата верига, 1 x Pfu буфер (Stratagene), 10 % DMSO, 0.2 mM dNTPs, 150 ng от всеки праймер и 1.25 единици Pfu Turbo полимераза (Stratagene). PCR продуктът се пречиства, като се използва кит за пречистване High Pure PCR следвайки инсттрукциите на производителя (Roche Molecular Biochemicals). Краищата на PCR се правят тъпи и се фосфорилират, чрез използване на кит за лигиране на Sure Clone (Amersham Pharmacia

Biotech), клонират се в EcoRV място на pBSK2 (Stratagene) и се трансформират в DH5 клетки.

От получените от лигирането колонии се ектсрахират малки количества плазмидна ДНК, като се използва Wizard система (Promega) и след това се секвенират, като се използва ABI апарат.

Резултати

Секвенцията на PCR продуктът потвърждава, че иРНК съдържа секвенции разположени точно upstream от ATG който се съдържа в геномната секвенция. Тази секвенция е подчертана в секвенцията показана на Фигура 3. Присъствието на ограничен в рамка, разположен upstream стоп кодон и отсъствието на друг метионин, показват че метионинът, намерен в JST576 кДНК е правилният иницииращ метионин.

Пример 4

Този пример описва клонирането на миша BAFF-R кДНК.

Методи

Приблизително един милион фагови плаки се скринират от миша A20 клетъчна линия кДНК библиотека, закупена от Stratagene (La Jolla, CA) както е посочено подробно от производителя. JST576 човешка BAFF-R кДНК се къса с EcoNI и се пуска върху 1 % ниско топящ гел. Съдържащият се фрагмент от 425 bp се изрязва от гела и се претегля. Добавят се

три обема вода и фрагмента от гела се вари в продължение на 5 минути. Фрагментът се бележи с 50 μCi ^{32}P-dCTP (Amersham) в реакционна смес, съдържаща 50 mM Трис pH 8, 5 mM $MgCl_2$, 10 μM β-меркаптоетанол, 200 mM HEPES pH 6.5, 20 (M dNTPs (с изключение на dCTP), 0.27 единици от pd (N) 6 хексануклеотиди (Amersham Pharmacia Biotech) и 1 единица от Klenow ензим (USB) в продължение на една нощ на стайна температура. Около един милион импулса на милилитър от сондата, се инкубират с филтрите в буфер за скриниране на плаките (50 mM Трис, 1 % SDS, 1M NaCl, 0.1 % Натриев Фосфат, 0.2 % PVP, 0.2 % Ficoll, 0.2 % BSA) в продължение на една нощ при 65^0 C. Филтрите се промиват в 2 X SSC и 0.1 % SDS при 50^0 C в продължение на 1.5 часа (3 x 2 литра) и след това се проявяват върху рентгенов филм в продължение на два дена. Идентифицирани са приблизително 36 позитивни плаки. От тях 6 плаки са пречистени. Основните фагови части се освобождават, като се използва in vivo протокол за изрязване на Stratagene. Получените колонии се култивират и ДНК се екстрахира в малки количества (Qiagen). кДНК клоновете се секвенират.

Резултати

Миша BAFF-R консенсусна нуклеотидна секвенция е представена на Фигура 4A (SEQ ID NO : 8) и аминокиселинната секвенция е представена на Фигура 4B (SEQ ID NO : 9). Три от клоновете съдържат 10 аминокиселинни делеции от аминокиселина 119 до 129 във вътреклетъчния домен на миши BAFF-R. Съпоставянето на човешки и миши BAFF-R секвенции показва, че 4 цистеинови

остатъци в извънклетъчния домен са консервативни, така че позицията на инициращия метионин е подобна и С-крайната част на белтъците е силно консервативен (Фигура 4С) с последните 24 остатъка, които са идентични. Секвенциите имат приблизително 56 % идентичност като цяло.

Пример 5

В този пример е описана способността на човешки, рекомбинантен разтворим BAFF, да се свързва с клетки, ко-трансфектирани с pJST576 и GFP репортерен плазмид.

Материали и методи

Репортерният плазмид кодира мембранно свързана GFP молекула и позволява да се идентифицират трансфектираните клетки от не трансфектираните клетки. Клетките 293EBNA са ко-трансфектират с репортерния плазмид и pJST576, като се използва Lipofectamine 2000 (Life Technologies). След 18-20 часа от трансфектирането, клетките се отделят от петритата с 5mM EDTA в PBS и се преброяват. Клетките се измиват два пъти с FACS buffer (PBS, съдържащ 10 % фетален говежди серум, 0.1 % NaN_3) и 2.5 x 10^5 клетки се инкубират в продължение на 1 час върху лед с биотинилиран myc-huBAFF, разреден във FACS буфер, с концентрационен обхват от 8 ng/ml до 5 ug/ml. Клетките се промиват с FACS буфер и се инкубират в продължение на 30 минути със стрептавидин, конюгиран с фикоеритрин (SAV-PE) (Jackson ImmunoResearch), при разреждане 1: 100 от сток разтвора. Клетките се промиват отново с FACS буфер и се ресуспендират в 1 %

параформалдехид във FACS буфер. Клетките се анализират чрез FACS за GFP и PE флуоресценция и данните се форматират в четири квадратен дот плот. Дотовете в двата десни квадрата представляват клетки, експресиращи трансфектирания репортерен GFP. Дотовете в двата горни квадрата представляват клетки, притежаващи свързан биотинилиран myc-huBAFF, като това свързване е проявено чрез SAV-PE. Клетките в горният десен квадрат са трансфектирани клетки, които се свързват с биотинилиран myc-huBAFF.

Резултати

Неоцветени клетки и клетки оцветени само със SAV-PE, показват че приблизително 50 %, са GFP положителни и са ко-трансфектирани с репортерен плазмид (Фигура 5). Когато клетки, ко-трансфектирани с GFP репортер и pJST576 се оцветят с 1 ug/ml биотинилиран myc-huBAFF, почти всички клетки в долния десен квадрат се преместват горе, което показва свързване с BAFF. Сходен резултат се наблюдава, ако плазмид експресиращ huTACI се ко-трансфектира вместо pJST576.

Известно е, че TACI се свързва с BAFF. Клетките се оцветяват с петкратно разреден биотинилиран myc-huBAFF от 5ug/ml до 8ng/ml и тъй като концентрацията на биотинилирания myc-huBAFF намалява, интензитета на изместването намалява.

Пример 6

В този пример е описана способността на човешки рекомбинантен, разтворим BAFF или на миши рекомбинантен

разтворим BAFF да се свързва с клетки, ко-трансфектирани с pJST576 и GFP репортерен плазмид.

Материали и методи

Ко-трансфектирането на 293EBNA се извършва както е описано в Пример 5. 18-20 часа след трасфекцията, клетките се отделят, преброяват се и се оцветяват за FACS анализ, подобно на Пример 5 със следните модификации. Клетките се инкубират в продължение на 1 час върху лед с 5 ug/ml или с миши или с човешки рекомбинантен, разтворим flag-BAFF, последвано след промиване от инкубация в продължение на 30 минути с 5 ug/ml от анти-flag моноклонално антитяло M2 (Sigma Aldrich) и след това се проявяват чрез инкубиране на промитите клетки в продължение на 30 минути с PE конюгирано магарешко анти-мишо IgG (Jackson ImmunoResearch), при разреждане 1: 100 от сток разтвора. Клетките се измиват отново, фиксират се с параформалдехид и се анализират чрез FACS за GFP и PE положителни клетки.

Резултати

Приблизително 50 % от клетките са GFP положителни и следователно са ко-трансфектирани с репортерния плазмид (Фигура 6). Когато клетки, ко-трансфектирани с GFP репортера и pJST576 се оцветят с 5ug/ml или човешки или миши рекомбинантен разтворим flag-BAFF, почти всички клетки в долния десен квадрат се преместват горе. Това показва, че както мишия, така и човешкия BAFF се свързват с трасфектираните pJST576 клетки.

Пример 7

В този пример е описана неспособността на миши рекомбинантен разтворим APRIL да се свързва с клетки, ко-трансфектирани с pJST576 и GFP репортерен плазмид.

Материали и методи

Ко-трансфекцията на 293EBNA се провежда както е описано в Пример 5. 18-20 часа след трасфекцията, клетките се отделят, преброяват се и се оцветяват за FACS анализ, по сходен начин както в Пример 5, със следните модификации. Клетките се инкубират в продължение на 1 час върху лед с 1 ug/ml миши, рекомбинантен разтворим myc-APRIL, последвано след промиването от инкубация в продължение на 30 минути с 5 ug/ml от анти-мишо APRIL моноклонално антитяло, последвано от 30 минутна инкубация на промитите клетки с 5 ug/ml биотинилирано анти-плъше IgG2b (Pharmingen) и накрая проявени чрез инкубиране на промитите клетки в продължение на 30 минути със SAV-PE. Клетките се промиват отново, фиксират се с параформалдехид и се анализират чрез FACS за GFP и PE позитивни клетки.

Резултати

Приблизително 50 % от клетките са GFP положителни и следователно са ко-трансфектирани с репортерния плазмид (Фигура 7). Когато клетките ко-трансфектирани с GFP репортера и pJST576 се оцветят с 1 ug/ml миши myc-APRIL, нито една от клетките в долния десен квадрат не е преместена

горе. Това е противоположно на клетките, ко-трасфектирани с плазмид, експресиращ човешки TACI, вместо pJST576. В тези трансфектирани клетки почти всички са положителни за свързване с миши myc-APRIL. Предварително е показано, че както BAFF, така и APRIL, се свързват и с TACI и с BCMA. Следователно фактът, че APRIL не се свързва с BAFF-R, който се експресира от pJST576 трансфектирани клетки показва, специфичността на BAFF-R за BAFF.

Пример 8

Този пример описва способността на BAFF-R експресиран от pJST576 да ко-имунопреципитира от рекомбинантен разтворим, човешки flag-BAFF.

Материали и методи

Клетките 293EBNA се трасфектират чрез Lipofectamine 2000 с pJST576, само с контролен или с плазмид експресиращ huTACI, като положителна контрола за свързване с BAFF. След инкубация в продължение на 20 часа, средата за трансфекция се аспирира, клетките се промиват с PBS и средата се заменя с ^{35}S белязана среда (9 части DMEM в които липсва метионин и цистеин към 1 част пълна DMEM, снабдена с 10 % диализиран фетален говежди серум, 4 mM глутамин и 100 μCi/ml ^{35}S метионин и цистеин (Translabel, ICN Radiochemicals). Клетките се инкубират в тази среда в продължение на шест часа, след което средата се отстранява. Клетките се промиват с PBS и след това се разтварят с 250 μl буфер за екстракция (1 % Brij 98, 150 mM NaCI, 50 mM Tris pH 7.5). Ко-имунопреципитацията се

провежда чрез инкубиране на 75 μl от белязани с ^{35}S клетъчни екстракти с 5 μg рекомбинантен разтворим човешки flag-BAFF в 1 ml DMEM-10 % фетален говежди серум -0.1 % NaN_3, в продължение на една нощ при 4° C. Добавят се анти-flag моноклоналното антитяло M2, 10 μg и протеин A-Sepharose и инкубацията продължава два часа. Сефарозните зърна се събират чрез центрофугиране, измиват се с FACS буфер и се ресуспендират в натоварващ SDS буфер с бета-меркаптоетанол като редуциращ агент. Пробите се сваряват в продължение на 5 минути, центрофугират се за кратко време, за да се утаят сефарозните зърна и аликвота се пуска за разделяне на SDS-PAGE. Гелът се инкубира с Enlightning (New England Nuclear), изсушава се и се експонира с филм при -80° C.

Резултати

Тази ко-имунопреципитация свързва flag-BAFF със зърната на протеин A Sepharose чрез анти-flag антитяло, M2. То би утаило които и да са белтъци в клетъчния екстракт, които се свързват с flag-BAFF и тези радиоактивно белязани белтъци ще се детектират чрез авторадиография. Тъй като клетките 293EBNA не се свързват с BAFF, празният вектор контрола показва фона, който е типичен за метода (Фигура 8). Когато екстракти от клетки трансфектирани за TACI се ко-имунопреципитират с flag-BAFF, се наблюдава ивица с забележимо молекулно тегло, приблизително от 34 kDa. Това е приблизителното предсказано молекулно тегло за пълната дължина на човешки TACI (31.2 kDa), белтък известен да се свързва с BAFF. Когато екстракти от клетки, трансфектирани с pJST576 се ко-имунопреципитират с flag-BAFF, се наблюдава

ивица със забележимо молекулно тегло от около 12 kDa. Предсказаното молекулно тегло за BAFF-R експресиран от pJST576 е 18.9 kDa. Несъответствието между предсказаните и наблюдаваните молекулни тегла, може да се дължи на анормална електрофоретична подвижност, дължаща се на заряда или конформацията на BAFF-R. Друга възможност е 12 kDa да е протеолитичен фрагмент на BAFF-R.

Пример 9

Този пример описва получаването на разтворими форми на BAFF-R. Олигонуклеотидните праймери, комплементарни на pJST576 могат да се конструират за PCR амплифициране на извънклетъчния BAFF-R домен, в отсъствие на трансмембранни и вътреклетъчни домени. Типично е някои да включва повече от средната част, или аминокиселинната област между лиганд свързващия домен и трансмембранния домен. Може да се варира количеството на средната област, включена за да се оптимизира силата на получения разтворим рецептор. Така, ще се конструира амплифициран фрагмент с подходящи рестриктазни места, за да стане възможно клонирането на различни хетероложни водещи секвенции в 5' края на фрагмента и на различни Ig рекомбинантни химерни вектори в 3' края. Съответно, може да се вмъкне стоп сигнал в 3' края на BAFF-R извънклетъчния домен, за да се направи разтворима форма на рецептора или да се използва друг С-краен рекомбинантен партньор, без да се прибягва до използването на Ig подход за рекомбинантен химер. Също така, може да се създаде един N-краен рекомбинантен белтък, съставен от рекомбинантен участник, съдържащ сигнална секвенция,

следваща след N-края на извънклетъчния домен на BAFF-R. Получените вектори могат да се експресират в повечето системи, използвани в биотехнологията, включващи дрожди, клетки от насекоми, бактерии и клетки на бозайници, като съществуват примери за всички типове експресия. Различни човешки Fc домени могат да се прикрепят, за да се оптимизира или елиминира FcR и комплиментарните взаимодействия ако е желателно. Съответно, мутантни форми на тези Fc домени могат да се използват за да се премахне селективно FcR или комплементарните взаимодействия, или прикрепването на N-свързаните захари с Fc домена, което има известни предимства. Един пример на BAFF-R : Fc рекомбинантна молекула е показан на Фигура 9. Тази молекула съдържа тип I лидерна секвенция от миши Ig-k ген, свързана чрез Aat2 рестриктазно място с BAFF-R извънклетъчния домен (аминокиселинни остатъци 2-71, както е показано на Фигура 2D), който от своя страна е свързан чрез SalI рестриктазно място с Fc домена на човешки IgGl.

Пример 10

В този пример ние показваме експресионния профил на BAFF-R в човешки тъкани и клетъчни линии, чрез използване на Northern блот анализ.

Материали и методи

Различни B и не-B клетъчни линии растат при подходящи условия. Получава се РНК приблизително от 10^7 клетки, като се използва RNeasy кит (Qiagen). Измерва се количеството на РНК и 20 μg от всяка проба се нанася и се анализира върху 1.2 %

формалдехиден гел, както е описано от Sambrook et al. MOLECULAR CLONING : A LABORATORY MANUAL, 1989. Гелът се поставя за блотинг върху найлонова мембрана (BMB) и след това се полимеризира под ултравиолетова светлина (UV). От Clontech се купуват няколко човешки Northern блотове (12 стартова много-тъканна, човешка II и имунна система II). Филтрите се пре-хибридизират при 65° C в ExpressHyb (Clontech) буфер, в продължение на 30 минути и след това се хибридизират със случайно праймиран ^{32}P белязан EcoNI фрагмент от 3' края на JST576 за около 3 часа. Филтрите се измиват на стайна температура в 2 X SSC/0.05 % SDS в продължение на 45 минути и след това при 50° C в 0.1 X SSC/0.1 % SDS, в продължение на 45 минути. Филтрите се поставят в рентгенова плака за 4 дена, като се използват 2 усилващи екрана В допълнение, от Clontech се купуват няколко човешки Northern блотове (12 стартова много-тъканна, човешка II и Имунна система II), хибридизират се с JST576 сондата и се третират както по-горе.

Резултати

Вижда се, че иРНК за BAFF-R се ескпресира предимно в имунните системни органи при това ниво на детекция. Най-високото ниво е в далака и лимфните възли, но иРНК се наблюдава също и в PBLs, тимуса, тънките черва и дебелото черво (Фигури 10 A, B и C). Приблизителният размер на иРНК е 4.5 kb; изглежда че има две иРНК популации в пробите, където генът не се експресира силно. Двете иРНК-и могат да се срещат и в далака и в лимфните възли. Това може да означава, че BAFF-R има алтернативни поли А допълнителни места, или че

РНК се подлага на алтернативен сплайсинг. Когато се изследват голям брой клетъчни линии за присъствие на BAFF-R иРНК, се детектира същата РНК с 4.5 kb. Само В клетъчните линии експресират BAFF-R иРНК (Фигура 11).Не се детектира иРНК в U266, RPMI8226 и Daudi клетъчни линии или в изследваните клетъчни линии, различни от В клетъчната линия.

Пример 11

В този пример ние показваме, че експресията на JST576 е ограничена до клетъчни линии, които се свързват с BAFF.

Материали и методи

Клетъчните линии са закупени от ATCC и се отглеждат при посочените условия. Различни В и не-В клетъчни линии се отглеждат при подходящи условия. Получава се РНК приблизително от 10^7 клетки, като се използва RNeasy кит (Qiagen). Измерва се количеството на РНК и 20 μg от всяка проба се нанася и се анализира върху 1.2 % формалдехиден гел, както е описано от Sambrook et al. MOLECULAR CLONING : A LABORATORY MANUAL, 1989. Гелът се поставя за блотинг върху найлонова мембрана (BMB) и след това полимеризира под ултравиолетова светлина (UV). Филтрите се хибридизират с белязания JST576 фрагмент и след това се промиват, както в Пример 10. Клетките се проверяват за способността им да се свързват с BAFF, като се използва FACS анализ. Събират се приблизително 2.5-5 x 10^5 клетки и се промиват. FLAG-tagged BAFF, разреден в PBS + 5 % FCS and 0.05 % натриев азид (FACS буфер), се инкубира с клетките с концентрационен

обхват (8-0.125 μg/ml), в продължение на 30 минути върху лед. Клетките се измиват с FACS буфер и се инкубират в продължение на 30 минути, върху лед с анти-FLAG моноклоналното антитяло M2 (Sigma) с 5 μg/ml. Клетките се измиват отново с FACS буфер и след това се инкубират с 1: 5000 разреждане на козе анти-мишо IgG PE конюгирано антитяло (Jackson Immuno Research), в продължение на 30 минути върху лед. Клетките се измиват както е посочено по-горе и след това се анализират чрез FACSCalibur flow sorter (Becton-Dickinson), като се използва CellQuest софтуер.

Резултати

Резултатите от експериментите за свързване с BAFF са показани в Таблица 1. Клетъчните линии, които се свързват с BAFF са Ramos, Namalwa, IM-9, NC-37, Raji, BJAB и SKW6.4. Нивото на свързване е показано чрез броя на знака +. Клетъчните линии, които не се свързват с BAFF са U266, RPMI 8226, Daudi, U937, Jurkat, HT29, A549, SW480 и ME260. Способността на клетъчните линии да се свързват с BAFF, корелира с присъствието на BAFF-R иРНК, което е показано на Фигура 11.

Таблица 1

Клетъчна линия	**Тип**	**Свързване с BAFF**
BJAB	Бъркитова лимфома	+++
IM-9	Лимфобласт IgG	+++
NC-37	Лимфобласт EBV+	++

Ramos	Бъркитова лимфома EBV-	++
Raji	Бъркитова лимфома	++
SKW 6.4	Лимфобласт IgM	++
Namalwa	Бъркитова лимфома	+
Daudi	Бъркитова лимфома EBV+	-
U2266	Плазмацитома	-
RPMI 8226	Плазмацитома	-
U937	Моноцит	-
Jurkat	Т клетъчна левкемия	-
HT29	Колоректален аденокарцином	-
A549	Белодробен карцином	-
SW480	Колоректален аденокарцином	-
ME260	Меланома	-

Пример 12

Този пример описва способността на huBAFF-R: huIgGl рекомбинантния белтък, който се експресира и секретира в кондиционирана среда от временно трансфектирани 293EBNA клетки, да ко-имунопреципитира рекомбинантен разтворим биотинилиран myc-huBAFF.

Материали и методи

293EBNA клетки се трансфектират с Lipofectamine 2000 (LifeTechnologies) или с pJST618, който експресира huBAFF-R (aa 2-71): Fc, плазмид експресиращ huBCMA: huIgGl, като

положителна контрола за свързване с BAFF, или с плазмид експресиращ huFN14 : huIgGl, като отрицателна контрола за свързване с BAFF. След 24 часа инкубация се събира кондиционираната среда. Провежда се SDS-PAGE чрез смесване на еднакъв обем от 2 X SDS буфер за разделяне със или без редуциращ агент, с кондиционираната среда и се вари в продължение на 5 минути. След това пробите се разделят на 4 – 20 % SDS полиакриламиден гел. Известни количества от пречистен hBCMA: Fc се анализират в съседните стартове, за да се оцени количеството на hIgGl рекомбинантен белтък в кондиционираната среда.

Пробите се пренасят върху мембрани (Immobillon P, Millipore), чрез western блот в 0. 01 M CAPS pH 11-10 % MeOH буфер. Мембраните се блокират с 5 % обезмаслено сухо мляко (NFDM) в TBST, хибридизират се със сонди, разредени 1: 3000 със козе анти-човешко IgG-HRP (Jackson ImmunoResearch) в продължение на 1 час, промиват се в TBST и се експонират на рентгенови плаки. Ко-имунопреципитациите се провеждат, чрез инкубиране на 200 µl от кондиционираната среда с 200 ng рекомбинантен, разтворим човешки flag-BAFF в 1 ml DMEM-10 % фетален говежди серум - 0.1 % NaN_3 в продължение на една нощ, при 4° С. Добавя се Protein A-Sepharose и инкубацията продължава 2 часа. Чрез центрофугиране се събират сефарозните зърна, промиват се с FACS TBST буфер и се ресуспендират в SDS буфер за нанасяне на пробата, с бета меркаптоетанол, като редуциращ агент.

Пробите се варят в продължение на 5 минути, центрофугират се за кратко време, за да се утаят сефарозните зърна и се пуска аликвота на SDS-PAGE. FLAG-huBAFF, 50ng, се анализира, като положителна контрола. Пробите се

прехвърлят върху PVDF мембрани (Immobillon P, Millipore) чрез western блот в 0. 01 M CAPS pH 11/10 % MeOH буфер. Мембраните се блокират с 5 % NFDM-TBST, хибридизират се със сонда от 1 μg/ml анти-FLAG M2-HRP в продължение на 1 час, промиват се в TBST и се експонират върху рентгенов филм.

Резултати

Ко-имунопреципитацията, утаява различни рецептор: Fc рекомбинанти, чрез рекомбинантен партньор, взаимодействащ с protein A Sepharose. Тя утаява също така, всеки един белтък, взаимодействащ с R: IgGl рекомбинантите, такъв като flag-BAFF. Кондиционираните среди от клетки, експресиращи hBCMA: Fc са способни да ко-имунопреципитират flag-BAFF, както се очаква, на western блот се наблюдава ивица, която ко-мигрира с flag-BAFF (Фигура 12). Кондиционираната среда от клетки, експресиращи hFN14 : Fc не ко-имунопреципитира с flag-BAFF. Кондиционираните среди от клетки, експресиращи BAFF-R: Fc са способни да ко-имунопреципитират flag-BAFF. Върху western блот, се наблюдава ивица, която ко-мигрира с flag-BAFF и е със сходен интензитет със тази, ко-имунопреципитирана с тази, ко-имунопреципитирана с huBCMA : huIgGl.

Пример 13

Този пример илюстрира способността на BAFF-R: Fc рекомбинантен белтък, в този случай huBAFF-R (aa2-71): huIgGl, да блокира свързването на huBAFF с BJAB клетки.

Материали и методи

Получава се huBAFF-R (2-71)-huIgGl рекомбинант, дискутиран в пример 9 и се нарича pJST618. Този конструкт е временно трансфектиран в 293EBNA клетки и кондиционираната среда се събира. Рекомбинантният белтък се пречиства, чрез кисело елюиране от protein A Sepharose, последвано от хроматография с гел-филтрация. Биотинилиран myc-huBAFF, 200 ng/ml, се преинкубира или с 50 ul FACS буфер, или с пет-кратни серийни разреждания, вариращи от 5 μg/ml до 200 ng/ml, от пречистен huBAFF-R: Fc в продължение на 30 минути върху лед. След това, BJAB клетките (2.5 x 10^5 клетки) се инкубират с тези разтвори върху лед в продължение на един час. Клетките се промиват с FACS буфер и се оцветяват със SAV-PE. Клетките се анализират, чрез FACS за PE флуоресценция и данните се форматират като припокриващи се хистограми. Съответно, 200 ng/ml биотинилиран-BAFF се пре-инкубира с двукратни серийни разреждания или от hBAFF-R: Fc, hTACI: Fc, или hLTBR: Fc. Клетките се оцветяват за свързване с биотинилиран BAFF, както по-горе.

Резултати

Фигура 13 А показва припокриването на хистограмите начертани за свързването на huBAFF с BJAB в присъствие на различни концентрации от huBAFF-R: Fc. Черната линия, отбелязана с "А" представлява фоновото свързване на SAV-PE, а червената линия, маркирана с "Е" означава клетки, оцветени с биотинилиран myc-huBAFF без пре-инкубация с BAFF-R: Fc.

Преинкубацията на биотинилиран myc-huBAFF с 5 μg /ml от huBAFF-R: Fc води до преместване на хистограмата почти до нивата на фона (крива B). Пре-инкубацията или с 1 μg/ml (крива C) или 200 ng/ml (крива D) huBAFF-R-huIgGl води до приблизително четирикратно намаляване на свързването с биотинилирания myc-huBAFF.

Фигура 13 B показва, че както BAFF-R: Fc, така и TACI: Fc са способни да блокират свързването на BAFF с BJAB клетки. Пре-инкубирането с LTBR: Fc няма BAFF блокиращ ефект.

Пример 14

Този пример описва способността на BAFF-R : IgGl рекомбинантен белтък, да блокира BAFF индуцираната B клетъчната пролиферация.

Материали и методи

За in vitro пролиферативен анализ, миши B клетки се изолират от далаци на C57B16 мишки (8 седмични), като се използва B клетъчна колона за възстановяване (колона (Cellect^{TM} Mouse B Cell Recovery Column : Cedarlane Laboratories Limited, Ontario, Canada.). Пречистените B клетки се анализират, чрез FACS и е намерено, че > 90 % са положителни за B220 оцветяване. B клетките се инкубират в 96-ямкови плаки (10^5 клетки/ямка в 50 ml RPMI снабдена с 10 % FBS) в продължение на 72 часа в присъствие или отсъствие на 2 mg/ml козе анти-човешко m верижно антитяло (Sigma Chemical Co.); контролно hIgG (10 mg/ml) huBAFF-R: Fc (10 mg/ml). Пробите

се нанасят за три повторения и с посочените концентрации от myc-hBAFF. Клетките се бележат допълнително в продължение на 18 часа с [^{3}H] тимидин (1 μCi/ямка) и се събират. Включването на [^{3}H] тимидин се контролира чрез течен сцинтилационен брояч. В този анализ се използва човешки BAFF-R : Fc рекомбинантен белтък, получен, както е описано в Пример 13 и както е дискутирано в Пример 9 е получен от супернатантата на pJST618 трансфектирани 293EBNA клетки. Супернатантата се събира, нанася се върху Protein A колона, елюира се с киселина, неутрализира се и след това се пречиства чрез хроматография с гел-филтрация, за да се получи свободен от агрегат huBAFF-R: Fc белтък. Използваният в анализа BAFF се експресира в Pichia pastoris и се пречиства чрез анионно обменна хроматография, последвана от гел-филтрация.

Резултати

Фигура 14 показва, че BAFF може да ко-ситмулира В клетъчния растеж в присъствие на анти-m антитела (квадратчета) и hIgG (триъгълничета). Само BAFF (ромбчета) не е способен да индуцира В клетъчна пролиферация. Инкубирането с 10 mg/ml от huBAFF-R: Fc (звездички) води до пълно подтискане на BAFF-индуцираната В клетъчната пролиферация.

Пример 15

Материали и методи

Мишки

BALB/c мишки на възраст 6 седмици се получават от Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) и се подържат при ограничени условия в Biogen Animal Facility.

Реагенти и режим на третиране

Рецепторните рекомбинантни белтъци, съдържат човешка IgGl Fc област. Мишките (5/група) получават 200 μg от рекомбинантните белтъци (миши BAFF-R : Fc или човешки BAFF-R : Fc) 2х/седмично в продължение на 4 седмични, ip (интраперитонеално). Контролни мишки получават поликлонален човешки IgG (Panglobulin^{TM}) (HIgG), 200 μg 2х/седмично в продължение на 4 седмици. Три дена след последната доза се събират кръвни проби, чрез орбиталния синус, след това мишките се евтанизират и за анализ се събират далаци, лимфни възли и костен мозък.

Flow цитометричен анализ

По време на убиването, се записват теглата на далаците. Получава се суспензии от единични клетки от далак и кръв след лизиране на червените кръвни клетки в хипотоничен разтвор. Суспензиите от единични клетки се получават също така от ингвинални лимфни възли и костен мозък. Flow цитометрията се провежда, като се използват mAbs насочени срещу B220, IgM, IgD и CD21. Далачни B клетъчни субпопулации са определени като фоликулярни ($B220^{+}$, IgM^{low}, $CD21^{low}$), като клетки от маргиналната зона ($B220^{+}$, IgM^{hi} $CD2l^{hi}$) и ново формирани ($B220^{+}$, IgM^{hi} CD21-). Накратко, ~ 1. 5 x 10^{6} клетки

се инкубират с 10 μg/ml от Fc Block (Pharmingen) в продължение на 10 минути върху лед, за да се блокират Fc рецепторите, последвано от добавяне на флуоресцентно tagg – свързани mAbs и се инкубират върху лед в продължение на 30 минути.

Клетките се промиват 1X и се ресуспендират в 0.5 % параформалдехид. Данните от клетъчната флуоресценция се получават с FACS Calibur flow цитометър (Becton Dickinson, San Jose, CA) и се анализират, като се използва CellQuest софтуер (Becton Dickinson).

Резултати

4 седмици след курса на третиране с миши или човешки BAFF-R: Fc става забележимо намаляване на теглата на далаците от мишки, третирани с миши и човешки BAFF-R: Fc (Фигура 15) в сравнение с контролните мишки, третирани с човешки IgG. Намерено е, че очевидното спадане на далачните клетки, се дължи на редукция на броя на далачните В клетки. Средният брой от тотални $B220^+$ далачни В клетки в мишка и мишки, третирани с човешки BAFF-R : Fc, респективно 1.8×10^6 и 2.6×10^6 клетки, беше значително намален в сравнение с броя на В клетките, в контролни животни, третирани с HIgG, които имат средно 19.8×10^6 клетки (Фигура 16).

Изследването на различни субпопулации от далачни В клетки, фоликулярни, клетки от маргиналната зона и ново формирани, показва, че броят на В клетките във всяка под-група е редуциран в третираните с BAFF R:: Fc мишки (Таблица 2), въпреки че фоликулярните и В клетките от маргиналната зона са най-намалени.

Таблица 2. Третирането с BAFF-R:: Fc води до редукция на далачните В клетъчни субпопулации.

	Далачни В-клетъчни субпопулации (10^6 клетки ± SD)		
	Фоликулярни клетки	**Клетки от маргиналната зона**	**Ново формирани клетки**
Човешки IgG	14.5 ± 2.4	1.1 ± 0.3	1.5 ± 0.2
mBAFF-R:Fc	0.7 ± 0.1	0.06 ± 0.02	0.4 ± 0.1
hBAFF-R:Fc	1.4 ± 0.5	0.05 ± 0.02	0.5 ± 0.2

Мишките получават 200 μg от HIgG, mBAFF-R: Fc или hBAFF-R : Fc в дни 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22 и 25. Мишките се евтанизират на 28 ден и далаците се събират за анализ на В клетъчните подгрупи.

Изследването на процента на $B220^+$ В клетки, съдържащи се в ингвиналните лимфни възли (LN) показва, че средните В клетъчни популации са значително намалени в мишки, третирани с миши и човешки BAFF R:: Fc, респективно 12.3 % ± 1. 4 и 18.6 % ± 1.3, в сравнение с контролно третираните с HIgG мишки, които имат средно от 30.8 % ± 4.1 В клетки (Фигура 17). Сходни резултати са получени, когато се изследват В-клетки от периферна кръв. 42.5 % ± 2.9 от лимфоцитите от мишки, третирани с човешки IgG са В-клетки, докато само 21.2 % ± 6.1 и 8. 3 % ± 4.5 от лимфоцитите са В клетки, от мишки, третирани респективно с миши и човешки BAFF-R:: Fc (Фигура 18).

Въпреки, че ново формираните (не-зрели) В клетъчни и зрелите В-клетъчни популации са намалени в мишки, третирани с BAFF-R:: Fc, В клетъчните прекурсори в костния мозък остават не-засегнати (данните не са показани).

Обсъждане

Тези резултати допускат, че in vivo блокирането на BAFF с разтворим BAFF-R рецепторен рекомбинантен белтък, води до инхибиране на В-клетъчното преживяване и/или съзряване.

Тези резултати допускат също така възможната роля на BAFF-R рекомбинантния белтък, като терапевтичен лекарствен препарат с клинични приложения в В клетъчно-медиираните заболявания. Болестите включват тези, които са по природа автоимунни, такива като системик лупус еритематозус, миастения гравис, автоимунна хемолитична анемия, идиопатична тромбоцитопения пурпура, анти-фосфолипиден синдром, болест на Chagas и болест на Grave, грануломатозис на Wegener, поли-артеритис нодоза и бързи прогресивни гломерулонефрити. Това терапевтично средство има също така приложение при нарушения на плазматичните клетки, такива като мултиплена миелома, макроглобулинемия на Waldenstrom, заболяване свързано с тежката верига, първичен или имуноцит-свързан амилоидозис и моноклонална гамопатия с неопределено значение (MGUS). Онкологичните мишени включват В клетъчни карциноми, левкемии и лимфоми.

Пример 16

В този пример е описано характеризирането на

първоначален панел от миши моноклонални антитела, създадени срещу извънклетъчния домен на BAFF-R. Всички антитела разпознават извънклетъчния домен на BAFF-R и субгрупата на тези антитела има антагонистични свойства в това, че те предотвратяват последващото свързване на BAFF с BAFF-R.

Материали и методи

RBF мишки са имунизирани и подсилени с huBAFF-R: Fc. Спленоцитите от имунна мишка се сливат с миши миеломен щам FL653, производен на щам P3-X63-Ag8. 653 за да се получат хибридоми чрез стандартни технологии.

Кондиционирани среди от хибридомни клонове, секретиращи антитела срещу извънклетъчния домен на huBAFFR се анализират чрез FACS. FACS свързващ анализ се провежда с 293EBNA клетки, ко-трансфектирани с плазмиди експресиращи с плазмиди експресиращи пълната дължина на huBAFF-R или muBAFF-R и GFP, както в Пример 5. Хибридомната кондиционирана среда се разрежда 1: 10 във FACS буфер и се инкубира с трансфектирани клетки 30 минути върху лед. Клетките се промиват с FACS буфер и свързването се осъществява, чрез инкубиране с анти-мишо IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch) разредено 1: 100 в продължение на 30 минути върху лед. Клетките се промиват още веднъж с FACS буфер и се ресуспендират с 1 % параформалдехид във FACS буфер. Клетките се анализират, чрез FACS за GFP и PE флуоресценция и данните се форматират в четири-квадратен дот плот, както е описано в Пример 5. Анализите от блокирането на BAFF се провеждат, чрез инкубиране на 10

ug/ml Протеин А пречистено анти-BAFF-R mAb или контролно антитяло (MOP C21) с BJAB клетки, в продължение на 30 минути върху лед. След промиване, клетките се инкубират с 250 ng/ml биотинилиран huBAFF в продължение на 30 минути върху лед. Клетките се промиват отново и свързването с BAFF се доказва, чрез инкубиране със SAV-PE. Клетките се анализират, чрез FACS за PE флуоресценция и данните се нанасят графично като припокриващи се хистограми.

Резултати

Наблюдава се, че супернатантите от десет клона се свързват с huBAFF-R трансфектирани клетки.

Дот плотовете от FACS данните от четири от десетте анти-BAFF-R супернатанти са показани на Фигура 19A. Ефективността на трансфекцията е приблизително 50 %, като почти всички трансфектирани клетки са изместени в горния десен квадрат след оцветяване със супернатантите. Нито една от тези десет супернатанти не се свързва с 293EBNA клетки, трансфектирани с muBAFFR (данните не са показани). Кондиционираните среди от клоновете, които са положителни за свързване с BAFF-R се анализират за способността им да блокират взаимодействието на BAFF с BAFF-R експресиран по повърхността на BJAB клетките. BJAB клетките експресират BAFFR по своята повърхност и не експресират забележими количества от BCMA или TACI (Thompson et al. (2001) Science Aug 16). Две от десетте хибридоми, клонове 2 и 9, продуцират mAbs, които са способни да блокират взаимодействието на BAFF-R с BAFF. (Клон 2 е депозиран в ATCC на 6 Септември 2001, като "анти-BAFF-R клон # 2.1" (IgGl-капа изотип) и е

означен с ATCC No_____; Клон 9 е депозиран в ATCC на 6 Септември 2001, като "анти-BAFF-R клон # 9.1" (IgGl-капа изотип) и е означен с ATCC No_____). Припокриването на хистограмите на Фигура 19B показва, че пре-инкубацията на 10 μg/ml или от mAb клон 2 (крива (b)) или 9 (крива (c)) измества BAFF свързващата крива, повече от десет пъти вляво, почти до сигнала на контролата, в която липсва BAFF (крива (a)). Най-дясната хистограма (крива (d)) показва изместване, когато контролното mAb MOP C21, анти-BAFF-R не-блокиращо mAbs или когато не се инкубира белтък с клетките, преди свързване с BAFF.

Пример 17

Този пример описва конструирането, секвенцията и белтъчното характеризиране на аминокиселинните заместявания в hBAFF-R (2-71)-Fc, които водят до повишена разтворимост на рекомбинантно експресираната молекула.

Материали и методи

Двойно верижните олигонуклеотидни касети с лепливи краища се използват за да се въведат заместявания в прицелните остатъци, чрез лигиране в едни и същи места в hBAFF-R (2-71): IgGl гена.

Експресионни плазмиди се трансфектират в 293EBNA клетки, като се използва Lipofectamine 2000, както в Пример 5. Агрегацията се определя, чрез анализ в не-редуциращи условия в SDS-PAGE на кондиционирани среди 20 часа след трансфекцията, последвана от western трансфер и детекция с

конюгирано с HRP анти-човешко IgG (1: 100, Jackson ImmunoResearch) и ECL детекция, както в Пример 12.

Провеждат се експерименти за имунопреципитация, като се използват 100 μl от кондиционирани среди 20 часа след трансфекцията в lml от DMEM/10 % FBS/0.2 % NaA3 с 200 ng flag-huBAFF. Пробите се клатят в продължение на 30 минути на 4° C, добавя се 30 ul protein A-Sepharose на епруветка и клатенето продължава допълнително в продължение на още 30 минути. Сефарозните зърна се центрофугират и се промиват 3 пъти с 1 ml студен PBS. Зърната се ресуспендират в 2X SDS редуциращ буфер и се нанасят върху 4-20 % акриламидни гелове. След western трансфер, както е описано преди това, способността да имунопреципитира flag-BAFF се доказва, чрез инкубиране на филтрите с 1 μg/ml конюгирано с HRP анти-flag M2 (Sigma), последвано от ECL детекция.

Резултати

Докато човешкият BAFF-R: Fc силно агрегира, мишият BAFF-R: Fc агрегира съвсем слабо (< 10 %). Анализите за делеция показват, че цялата С-крайна част на BAFF-R групата може да се премахне от A71 до V36 (последен Cys от цистеин богатия домен (CRD) е C35) без да се намалява формирането на агрегати. Това означава, че N-края и CRD областите от hBAFFR са необходими за образуването на агрегати.

Първоначално са получени няколко миши-човешки BAFF-R : Fc химери, в които са заместени различни количество от N-крайната човешка BAFF-R секвенция с хомоложна миша секвенция и се анализират за ефекта върху белтъчната агрегация. Аминокиселинната секвенция за тези и следващите

заместванията в hBAFF-R: Fc са показани на Фигура 20. Тази фигура показва BAFF-R групата, както на "див тип" човешки (Фигура 9), така и на миши BAFF-R: Fc, с номерация, съответстваща на аминокиселинните остатъци от пълната дължина на човешки (Фигура 2d) (SEQ ID NO : 5) или миши BAFF-R (Фигура 4b) (SEQ ID NO : 9). Фигура 20 показва също така hBAFF-R: Fc клонове със заместванията, със заместени остатъци, означени с удебелен контур, с червено и подчертано. Химерите, съдържащи по-малко от първите 21 миши остатъка (Q21) преди преминаване към човешките, изглежда че агрегират по подобен начин на див тип hBAFF-R : Fc; обаче, тези които съдържат поне първите 39 миши остатъци агрегират по забележимо редуциран начин, сходен с mBAFF-R. От допълнителните девет остатъка, различни между тези два химерни BAFF-R: Fc конструкта, четири се различават между мишката и човека. Това означава участие на поне един от човешките остатъци между C19 и L27, област вътрешна до CRD, е необходима за агрегирането.

Конструктите, заместващи човешките остатъци с тези, отговарящи на мишите, само на тези 4 места, или на тяхна подгрупа се приготвят, чрез стандартни техники. Когато са заместени само 4 остатъка V20N P21Q A22T L27P в човешката BAFFR група, този модифициран BAFF-R: Fc не агрегира. hBAFF-R (V20N P21Q A22T L27P): Fc все още са способни да взаимодействат с BAFF, когато се анализират чрез имунопреципитация. V20N L27P заместването, също така редцура агрегацията на hBAFF-R: Fc от приблизително 90 % до около 10 %. Междинни нива на агрегация се наблюдават с P21Q L27P (40 %), L27P (60 %), V20N L27A (60 %) и V20N L27S (60 %). Нито едно от следващите заместванията не намаляват

белтъчната агрегация: V20N P21Q A22T; V20N A22T; V20N P21Q ; V20N; и P21Q.

Пример 18

Този пример описва, че p21-Arc е белтък, свързан с BAFF-R. Методът, който се използва за определяне на такова взаимодействие е имунопреципитация.

Методи

Приготвя се конструкт, съдържащ кДНК, кодираща вътреклетъчния домен на BAFF-R (BAFF R- i. c. d.) с myc tagg свързан с N-края и се субклонира в CH269 плазмид в NheI (5') и XhoI (3') местата. 293E клетките се трансфектират с този конструкт и се лизират 72 часа след това с лизис буфер, съдържащ 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM Na_3V0_4, 50 mM NaF и 1 % Brij 97. Клетъчните лизати се пречистват с table top центрофуга при 10, 000 g в продължение на 5 минути и се имунопреципитират с анти-myc моноклонално антитяло 9E10. Имунопреципитатите се разделят чрез 10-20 % SDS PAGE при редуциращи условия и се прехвърлят чрез блот върху PVDF мембрана. Прехвърлените белтъци се визуализират с 0.2 % Ponceau S разтвор и областите, съответстващи на белтъци, специфично свързани с BAFF-R се изрязват и се подлагат на амино-киселинен секвенционен анализ на N-края. Провежда се търсене в база данни за не-пълен белтък, като се използва PATTERN SEARCH алгоритъм за получаване на данни за N-крайната секвенция.

Резултати

Един от белтъците, свързан специфично с myc-tagged BAFFR цитоплазмения домен има очевидно молекулно тегло 21 kDa. Този белтък се идентифицира ясно като p21-Arc (Actin сходен белтъчен комплекс). P21-Arc е компонент на седем субединичен белтък, наречен Arp2/3 комплекс, за коайто е показано че е включен в полимеризацията на актина (Welch et al. (1997) J. Cell Biol. 138 : 357). Не отдавна е съобщено че актин-свързващ белтък, филамин, е асоцииран с рецептора на тумор-некрозис фактора, свързан с фактор 2 (TRAF2) (Leonardi et al. (2000) J. Biol. Chem. 275: 271). Следователно, идентифицирането на p21- Arc в ко-имунопреципитатите на BAFFR цитоплазмения домен, допуска, че p21-Arc е или директно свързан с BAFFR, или индиректно свързан с BAFFR чрез асоциирането му с TRAF2 и/или друг TRAF белтък, който от своя страна е свързан BAFFR.

От гореспоменатото в детайли описание на специфичните варианти от изобретението, става ясно че е описано нещо уникално. Въпреки че отделните варианти са описани тук в детайли, това е направено например само с илюстративна цел и няма за цел да ограничава в това отношение обхвата на приложените патентни претенции, които следват. По-специално от изобретението се очаква различните замествания, промени и модификации да могат да се направят съгласно изобретението, без да без да се отклоняват от духа и обхвата на изобретението, както е определено от Претенциите.

ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Изолирана нуклеинова киселина, включваща секвенция кодираща полипептид, най-малко 50 % идентичен с полипетид, включващ аминокиселинната секвенция на SEQ ID NO : 5.

2. Нуклеинова киселина, съгласно Претенция 1, където споменатата нуклеинова киселина, кодира полипептид най-малко 90 % идентичен със SEQ ID NO : 5.

3. Нуклеинова киселина, съгласно Претенция 1, където споменатият кодиран полипептид свързва BAFF.

4. Нуклеиновата киселина, съгласно Претенция 1, където споменатата нуклеинова киселина е ДНК.

5. Нуклеинова киселина, съгласно Претенция 1, където споменатата нуклеинова киселина е РНК.

6. Нуклеинова киселина, съгласно Претенция 1, където споменатата нуклеинова киселина е кДНК молекула.

7. Изолирана нуклеинова киселина, включваща нуклеотидна секвенция, комплиментарна най малко на част от SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 3, SEQ ID NO : 4 или SEQ ID NO : 6.

8. Вектор, включващ нуклеиновата киселина, съгласно Претенции 1 или 2.

9. Клетка, включваща векторът, съгласно Претенция 8.

10. Фармацевтичен състав, характеризиращ се с това че включва, нуклеиновата киселина, съгласно Претенция 1 и фармацевтично приемлив носител.

11. Чист по същество полипептид, кодиран от нуклеиновата киселина, съгласно Претенции 1 или 2.

12. Фармацевтичен състав, характеризиращ се с това, че включва полипептида съгласно Претенция 11 и фармацевтично приемлив носител.

13. Антитяло, което се свързва специфично с полипептида, съгласно претенция 12.

14. Антитяло, което се свързва с епитоп от полипептид, съгласно Претенция 12.

15. Кит, включващ антитяло, което се свързва с полипептид, съгласно Претенция 12 и по избор с антитяло отрицателна контрола.

16. Фармацевтичен състав, характеризиращ се с това, че включва антитялото съгласно Претенция 13 и фармацевтично приемлив носител

17. Метод за получаване на BAFF-R полипептид, характеризиращ се с това, че методът включва:

осигуряване на клетката, съгласно Претенция 9;

култивиране на споменатата клетка, при условия достатъчни за да се експресира споменатия BAFF-R полипептид; и

възстановяване на споменатия BAFF-R полипептид, като по този начин се продуцира споменатият BAFF-R полипептид.

18. Методът съгласно Претенция 17, характеризиращ се с това, че споменатата клетка е прокариотна клетка.

19. Методът съгласно Претенция 17, характеризиращ се с това, че спомената клетка е еукариотна клетка.

20. Използване на BAFF-R полипептид, получен съгласно Претенция 17 за диагностициране на В-клетъчно медиирано болестно състояние в лице, включващо:

осигуряване на белтъчна проба от споменатото лице;

измерване на количеството на BAFF-R полипетида в спомената проба от лицето; и

сравняване на количеството на BAFF-R полипептида в споменатата белтъчна проба от лицето с количеството на BAFF-R полипептида в контролна белтъчна проба, където промяната в количеството на BAFF-R полипептида, в споменатата белтъчна проба от лицето, по отношение на количеството на BAFF-R полипептида в споменатата контролна белтъчна проба показва, че лицето има В-клетъчно медиирано болестно състояние.

21. Използването на BAFF-R полипептида, съгласно Претенция 20, където споменатото В-клетъчно медиирано болестно състояние е автоимунно нарушение.

22. Използването на BAFF-R полипептид, съгласно Претенция 20, където споменатото В-клетъчно медиирано болестно състояние е рак.

23. Използване на BAFF-R полипептид, за диагностициране на В-клетъчно медиирано болестно състояние в лице, включващо:

осигуряване на проба от нуклеинова киселина от споменатото лице;

измерване на количеството на BAFF-R нуклеинова киселина в споменатата проба нуклеинова киселина от лицето; и

сравняване на количеството на BAFF-R проба нуклеинова киселина в споменатата нуклеинова киселина от лицето с количеството на BAFF-R нуклеинова киселина в контролна проба, където промяната в количеството на BAFF-R нуклеинова киселина в споменатата проба, по отношение на количеството на BAFF-R в споменатата контролна проба, показва, че лицето страда от В-клетъчно медиирано болестно състояние.

24. Използване на BAFF-R полипептид, съгласно Претенция 23, където измерената BAFF-R нуклеинова киселина е BAFF-R РНК.

25. Използване на BAFF-R полипептид, съгласно Претенция 23, където измерената BAFF-R нуклеинова киселина е BAFF-R ДНК.

26. Използване на BAFF-R полипептид, съгласно Претенция 23, където BAFF-R нуклеиновата киселина се измерва, като се използва нуклеиновата киселина съгласно Претенция 1.

27. Използване на BAFF-R полипептид, съгласно Претенция 23, където BAFF-R нуклеиновата киселина се измерва, като се използва една или повече нуклеинови киселини, които амплифицират нуклеиновата киселина съгласно Претенция 1.

28. Използване на BAFF-R полипептид, за диагностициране на В-клетъчно медиирано болестно състояние в лице, включващо:

осигуряване на проба от нуклеинова киселина от споменатото лице;

идентифициране най-малко на част от нуклеотидната секвенция на BAFF-R нуклеинова киселина в спомената проба нуклеинова киселина от лицето; и

сравняване на BAFF-R нуклеотидна секвенция от спомената проба на лицето с BAFF-R нуклеотидна секвенция от контролна проба, където промяна в BAFF-R нуклеотидната секвенция в спомената проба, по отношение на BAFF-R нуклеотидната секвенция в спомената контролна проба показва, че лицето има В-клетъчно медиирано болестно състояние.

29. Използване на нуклеиновите киселини съгласно Претенция 1, за получаване на лекарствен препарат за лечение или предпазване или забавяне на автоимунно или туморогенно болестно състояние, като използването включва прилагане на лицето, нуждаещо се от такова лечение или предпазване или забавяне, на нуклеиновата киселина съгласно Претенция 1, в количество достатъчно да лекува, предпазва или забавя автоимунно или туморогенно болестно състояние в споменатото лице.

30. Използване на полипептида съгласно Претенция 12, за получаване на лекарствен препарат за лечение или предпазване, или забавяне на автоимунно или туморогенно болестно състояние, включващо прилагане на лицето нуждаещо се от такова лечение или предпазване или забавяне, на полипептида съгласно Претенция 12, в количество достатъчно да лекува, предпазва или забавя автоимунно или туморогенно болестно състояние в споменатото лице.

31. Използване на антитялото съгласно Претенция 16, за получаване на лекарствен препарат, за лечение или предпазване или забавяне на автоимунно или туморогенно болестно състояние, включващо прилагане на лицето нуждаещо се от такова лечение или предпазване или забавяне на антитялото, съгласно Претенция 16, в количество достатъчно да лекува, предпазва или забавя автоимунното или туморогенно болестно състояние в споменатото лице.

32. Метод за идентифициране на съединение, което се свързва с BAFF-R белтък, характеризиращ се с това, че включва:

а) контактуване на BAFF-R белтък със съединение; и

б) определяне дали споменатото съединение се свързва с BAFF-R белтък .

33. Метод съгласно Претенция 32, характеризиращ се с това, че свързването на споменатото съединение с BAFF-R белтък се определя чрез анализ за белтъчно свързване.

34. Съединение, идентифицирано, чрез метода съгласно Претенция 32.

35. Метод за идентифициране на съединение, което се свързва с нуклеинова киселина, кодираща BAFF-R белтък, характеризиращ се с това, че включва етапите на:

а) контактуване на спомената нуклеинова киселина, кодираща BAFF-R белтък със съединение; и

б) определяне дали споменатото съединение се свързва със спомената молекула нуклеинова киселина.

36. Съединение, идентифицирано чрез метода съгласно Претенция 35.

37. Метод за идентифициране на съединение, което модулира активността на BAFF-R белтък, характеризиращ се с това, че включва етапите на:

а) контактуване на BAFF-R белтък със съединение; и

б) определяне дали активността на BAFF-R белтъка е модулирана.

38. Съединение, идентифицирано чрез метода съгласно Претенция 37.

39. Метод за намаляване на агрегацията на рекомбинантно експресиран белтък, характеризиращ се с това, че включва:

а) идентифициране на участъци от консервативни аминокиселини между хомолози на прицелен белтък, които агрегират като рекомбинантно експресиран белтък;

б) заместване поне на една не-консервативна аминокиселина в споменатия прицелен белтък, за да се образува мутантен прицелен белтък;

където споменатият мутантен прицелен белтък показва намалена агрегация, когато се експресира по рекомбинантен път.

40. Методът съгласно Претенция 39, характеризиращ се с това, че споменатата не-консервативна аминокиселина е не полярна аминокиселина.

41. Методът съгласно Претенция 39, характеризиращ се с това, че споменатата не полярна аминокиселина е заменена с незаредена полярна аминокиселина.

42. Методът съгласно Претенция 39, характеризиращ се с това, че споменатата не полярна аминокиселина е заменена с аминокиселина, избрана от групата, съставена от пролин, серин, или аланин.

43. Методът съгласно Претенция 39, характеризиращ се с това, че споменатата не полярна аминокиселина е заменена с пролин.

44. Изолирана молекула нуклеинова киселина кодираща поне част от BAFF-R белтък, включващ аминокиселинна секвенция, избрана от групата, съставена от SEQ ID NO : 13; SEQ ID NO : 15; SEQ ID NO : 16 ; SEQ ID NO : 17 ; SEQ ID NO : 18; SEQ ID NO : 19 ; SEQ ID NO : 20; SEQ ID NO : 21; SEQ ID NO : 22; SEQ ID NO : 23; SEQ ID NO : 24; SEQ ID NO : 25; SEQ ID NO : 26; SEQ ID NO : 27; SEQ ID NO : 28; SEQ ID NO : 29; SEQ ID NO : 30; SEQ ID NO : 31 ; и SEQ ID NO : 32.

45. Изолираната молекула нуклеинова киселина съгласно Претенция 44, където споменатата нуклеинова киселина кодира споменатият BAFF-R белтък, като част от химерен белтък.

46. Изолираната молекула нуклеинова киселина съгласно Претенция 45, където споменатият химерен белтък включва имуноглобулинова константна област.

47. Изолирана молекула нуклеинова киселина, кодираща BAFF-R белтък, включващ аминокиселинна секвенция от SEQ ID NO : 14.

48. Изолираната молекула нуклеинова киселина съгласно Претенция 47, където спомената нуклеинова киселина кодира споменатият BAFF-R белтък, като част от химерен белтък.

49. Изолираната нуклеинова киселина съгласно Претенция 48, където споменатият химерен белтък включва имуноглобулинова константна област.

50. Изолиран полипептид, включващ аминокиселинна секвенция, избрана от групата, съставена от SEQ ID NO : 13; SEQ ID NO : 15; SEQ ID N0 : 16; SEQ ID N0 : 17; SEQ ID NO : 18 ; SEQ ID NO : 19 ; SEQ ID NO : 20; SEQ ID NO : 21 ; SEQ ID NO : 22; SEQ ID N0 : 23; SEQ ID NO : 24; SEQ ID NO : 25; SEQ ID N0 : 26; SEQ ID NO : 27 ; SEQ ID N0 : 28; SEQ ID NO : 29; SEQ ID NO : 30; SEQ ID NO : 31 ; и SEQ ID NO : 32.

51. Изолираният полипептид съгласно Претенция 50, където споменатият полипептид е химерен белтък.

52. Изолираният полипептид съгласно Претенция 51, където споменатият химерен белтък включва имуноглобулинова константна област.

53.Изолиран миши BAFF-R полипептид, включващ аминокиселинна секвенция ат SEQ ID NO : 14.

54. Изолираният полипептид съгласно Претенция 53, където споменатият полипептид е химерен белтък.

55. Изолираният полипептид съгласно Претенция 54, където споменатият химерен белтък включва имуноглобулинова константна област.

Фигура 1А

Секвенция на JST576 кДНК клон

```
1     GCACCATGAG GCGAGGGCCC CGGAGCCTGC GGGGCAGGGA CGCGCCAGCC
51    CCCACGCCCT GCGTCCCGGC CGAGTGCTTC GACCTGCTGG TCCGCCACTG
101   CGTGGCCTGC GGGCTCCTGC GCACGCCGCG GCCGAAACCG GGTAAGGGGG
151   ACCCACGGGG CGCGCGGCGC CGGCAGCTGC GGGGAGAACG GGGCCCCGAT
201   CGCCAGGGCG CAGGCAGAGC CCCGACCCCC GGGGGCGCCG AGGGCTGAAA
251   GGACCCTGTG GGCAGGGCCT GGAGGGGCCC GCGATCACCG CGTGGCCCTC
301   ACCGCCGCCT CTCTCCCTCC CCTTGTCCAC CGCCCCCCGG CTGTCCCTCC
351   CCTCCCCGGC CAGCCTCGCC CCCCTCCGCC CCTCCCCGTC CCCGCTCCTC
401   CCTCCCCTCG GCCCCCTGGC CTCCCTCCCT GTCCCCTCCC GAAGCAGCCG
451   GGGCCAGCAG CCCTGCGCCC AGGACGGCGC TGCAGCCGCA GGAGTCGGTG
501   GGCGCGGGGG CCGGCGAGGC GGCGCTGCCC CTGCCCGGGC TGCTCTTTGG
551   CGCCCCCGCG CTGCTGGGCC TGGCACTGGT CCTGGCGCTG GTCCTGGTGG
601   GTCTGGTGAG CTGGAGGCGG CGACAGCGGC GGCTTCGCGG CGCGTCCTCC
651   GCAGAGGCCC CCGACGGAGA CAAGGACGCC CCAGAGCCCC TGGACAAGGT
701   CATCATTCTG TCTCCGGGAA TCTCTGATGC CACAGCTCCT GCCTGGCCTC
751   CTCCTGGGGA AGACCCAGGA ACCACCCCAC CTGGCCACAG TGTCCCTGTG
801   CCAGCCACAG AGCTGGGCTC CACTGAACTG GTGACCACCA AGACGGCCGG
851   CCCTGAGCAA CAATAGCAGG GAGCCGGCAG GAGGTGGCCC CTGCCCTCCC
901   TCTGGACCCC CAGCCAGGGG CTTGGAAATC AAATTCAGCT CTTCACTCCA
951   GCATGCACAT GCCCTCTTTC TGGGACCAGG CTAACCCTGC AGAAGCACAG
1001  ACACTACAGA CCACAGCATT CAGCCCCCAT GGAGTTTGGT GTGCTTGCCT
1051  TTGGCTTCAG ACCTCACCAT CTTTGACAGC CCTTGAAGGT GGTAGCCCAG
1101  CTCCTGTTCC TGTGCCTTCA AAAGGCTGGG GCACTATGAG TAAAAGACCG
1151  CTTTTAAAAT GGGGAAGGCA CCATTAAGCC AAAATGAATC TGAAAAAAGA
1201  C
```

Фигура 1B

Секвенция на EST AI250289

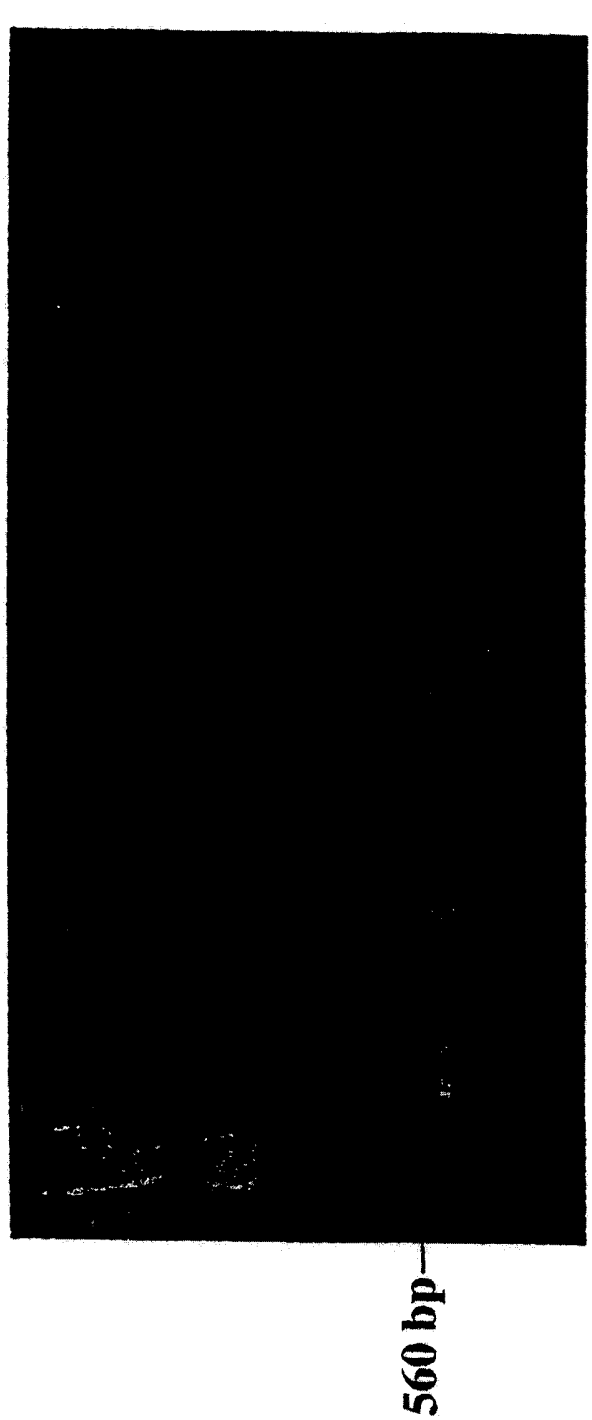
```
1     GTCGACCCAC GCGTCCGCCC ACGCGTCCGG TGCGGCGGCG TCGGCACCAT
51    GAGGCGAGGG CCCCGGAGCC TGCGGGGCAG GGACGCGCCA GCCCCCACGC
101   CCTGCGTCCC GGCCGAGTGC TTCGACCTGC TGGTCCGCCA CTGCGTGGCC
151   TGCGGGCTCC TGCGCACGCC GCGGCCGAAA CCGGGTAAGG GGGACCCACG
201   GGGCGCGCGG CGCCGGCAGC TGCGGGGAGA ACGGGGCCCC GATCGCCAGG
251   GCGCAGGCAG AGCCCCGACC CCCGGGGGCG CCGAGGGCTG AAAGGACCCT
301   GTGGGCAGGG CCTGGAGGGG CCCGCGATCA CCGCGTGGCC CTCACCGCCG
351   CCTCTCTCCC TCCCCTTGTC CACCGCCCCC CGGCTGTCCC TCCCCTCCCC
401   GGCCAGCCTC GCCCCCCTCC GCCCCTCCCC GTCCCCGCTC CTCCCTCCCC
451   TCGGCCCCCT GGCCTCCCTC CCTGTCCCCT CCCGAAGCAG CCGGGGCCAG
501   CAGCCCTGCG CCCAGGACGG CGCTGCAGCC GCAGGAGTCG GTGGGCGCGG
551   GGGCCGGCGA GGCGGCGCTG CCCCTGCCCG GGCTGCTCTT TGGCGCCCCC
601   GCGCTGCTGG GCCTGGCACT GGTCCTGGCG CTGGTCCTGG TGGGTCTGGT
651   GAGCTGGAGG CGGCGACAGC GGCGGCTTCG CGGCGCGTCC TCCGCAGAGG
701   CCCCCGACGG AGACAAGGAC GCCCCAGAGC CCCTGGACAA GGTCATCATT
751   CTGTCTCCGG GAATCTCTGA TGCCACAGCT CCTGCCTGGC CTCCTCCTGG
801   GGAAGACCCA GGAACCACCC CACCTGGCCA CAGTGTCCCT GTGCCAGCCA
851   CAGAGCTGGG CTCCACTGAA CTGGTGACCA CCAAGACGGC CGGCCCTGAG
901   CAACAATAGC AGGGAGCCGG CAGGAGGTGG CCCCTGCCCT CCCTCTGGAC
951   CCCCAGCCAG GGGCTTGGAA ATCAAATTCA GCTCTTCACT CC
```

Фигура 2A

Секвенция на JST576 предсказана от GENSCAN

```
1     GGCGCGCCGC ACCATGAGGC GAGGGCCCCG GAGCCTGCGG GGCAGGGACG
51    CGCCAGCCCC CACGCCCTGC GTCCCGGCCG AGTGCTTCGA CCTGCTGGTC
101   CGCCACTGCG TGGCCTGCGG GCTCCTGCGC ACGCCGCGGC CGAAACCGGC
151   AGCCGGGGCC AGCAGCCCTG CGCCCAGGAC GGCGCTGCAG CCGCAGGAGT
201   CGGTGGGCGC GGGGGCCGGC GAGGCGGCGC TGCCCCTGCC CGGGCTGCTC
251   TTTGGCGCCC CCGCGCTGCT GGGCCTGGCA CTGGTCCTGG CGCTGGTCCT
301   GGTGGGTCTG GTGAGCTGGA GGCGGCGACA GCGGCGGCTT CGCGGCGCGT
351   CCTCCGCAGA GGCCCCCGAC GGAGACAAGG ACGCCCCAGA GCCCCTGGAC
401   AAGGTCATCA TTCTGTCTCC GGGAATCTCT GATGCCACAG CTCCTGCCTG
451   GCCTCCTCCT GGGGAAGACC CAGGAACCAC CCCACCTGGC CACAGTGTCC
501   CTGTGCCAGC CACAGAGCTG GGCTCCACTG AACTGGTGAC CACCAAGACG
551   GCCGGCCCTG AGCAACAATA GCAGGGAGCC GGCAGGAGGT GGCCCCTGCC
601   CTCCCTCTGG ACCCCCAGCC AGGGGCTTGG AAATCAAATT CAGCTCTTCA
651   CTCCAGCATG CACATGCCCT CTTTCTGGGA CCAGGCTAAC CCTGCAGAAG
701   CACAGACACT ACAGACCACA GCATTCAGCC CCCATGGAGT TTGGTGTGCT
751   TGCCTTTGGC TTCAGACCTC ACCATCTTTG ACAGCCCTTG AAGGTGGTAG
801   CCCAGCTCCT GTTCCTGTGC CTTCAAAAGG CTGGGGCACT ATGAGTAAAA
851   GACCGCTTTT AAAATGGGGA AGGCACCATT AAGCCAAAAT GAATCTGAAA
901   AAAGAC
```

Фигура 2B



Фигура 2C

JST576 секвенция без интрона

```
1    GGCGCGCCGC ACCATGAGGC GAGGGCCCCG GAGCCTGCGG GGCAGGGACG
51   CGCCAGCCCC CACGCCCTGC GTCCCGGCCG AGTGCTTCGA CCTGCTGGTC
101  CGCCACTGCG TGGCCTGCGG GCTCCTGCGC ACGCCGCGGC CGAAACCGGC
151  CGGGGCCAGC AGCCCTGCGC CCAGGACGGC GCTGCAGCCG CAGGAGTCGG
201  TGGGCGCGGG GGCCGGCGAG GCGGCGCTGC CCCTGCCCGG GCTGCTCTTT
251  GGCGCCCCCG CGCTGCTGGG CCTGGCACTG GTCCTGGCGC TGGTCCTGGT
301  GGGTCTGGTG AGCTGGAGGC GGCGACAGCG GCGGCTTCGC GGCGCGTCCT
351  CCGCAGAGGC CCCCGACGGA GACAAGGACG CCCCAGAGCC CCTGGACAAG
401  GTCATCATTC TGTCTCCGGG AATCTCTGAT GCCACAGCTC CTGCCTGGCC
451  TCCTCCTGGG GAAGACCCAG GAACCACCCC ACCTGGCCAC AGTGTCCCTG
501  TGCCAGCCAC AGAGCTGGGC TCCACTGAAC TGGTGACCAC CAAGACGGCC
551  GGCCCTGAGC AACAATAGCA GGGAGCCGGC AGGAGGTGGC CCCTGCCCTC
601  CCTCTGGACC CCCAGCCAGG GGCTTGGAAA TCAAATTCAG CTCTTCACTC
651  CAGCATGCAC ATGCCCTCTT TCTGGGACCA GGCTAACCCT GCAGAAGCAC
701  AGACACTACA GACCACAGCA TTCAGCCCCC ATGGAGTTTG GTGTGCTTGC
751  CTTTGGCTTC AGACCTCACC ATCTTTGACA GCCCTTGAAG GTGGTAGCCC
801  AGCTCCTGTT CCTGTGCCTT CAAAAGGCTG GGGCACTATG AGTAAAAGAC
851  CGCTTTTAAA ATGGGGAAGG CACCATTAAG CCAAAATGAA TCTGAAAAAA
901  GAC
```

ФИГУРА 2D

Аминокиселинна секвенция на човешки BAFF-R

M R R G P R S L R G R D A P A P T P

C V P A E C F D L L V R H C V A C G

L L R T P R P K P A G A A S S P A P

R T A L Q P Q E S V G A G A G E A A

L P L P G L L F G A P A L L G L A L

V L A L V L V G L V S W R R R Q R R

L R G A S S A E A P D G D K D A P E

P L D K V I I L S P G I S D A T A P

A W P P P G E D P G T T P P G H S V

P V P A T E L G S T E L V T T K T A

G P E Q Q •

Фигура 3

```
GGGCGCCTAC AATCTCAGCT ACTCGGGAGG CTGAGGCAGA GAATTGTTTG AACCCGGGAG
                                                    *   T  R  E

GCAGAGCTTG CAGTGAGCCG AGATAGCGCC ATTGCACTCC AGCCTGGGCG ACAGAGCGAG
 A  E  L   A  V  S  R   D  S  A   I  A  L   Q  P  G  R   Q  S  E

ACTCCGTCTC AAAAAAAAAA AAAGAAAAGA AAGGGGGGCC CCAGGCGAGC TCGGTCCCAC
 T  P  S   Q  K  K  K   K  K  R   K  G  G   P  R  R  A   R  S  H

CCAGCAGGCG GGGGCGGGGC AGGGCAGAGT GCTCCCCCCG CCCCCCGCTT CCTCCCCGAG
 P  A  G   G  G  G  A   G  Q  S   A  P  P   A  P  R  F   L  P  E

GGCCCCGGAG CCCAGCTCAG CCTCAGTCCC CGCAGCTTGT GCGGCGGCGT CGGCACCATG
 G  P  G   A  Q  L  S   L  S  P   R  S  L   C  G  G  V   G  T  M

AGGCGAGGGC CCCGGAGCCT GCGGGGCAGG GACGCGCCAG CCCCCACGCC CTGCGTCCCG
 R  R  G   P  R  S  L   R  G  R   D  A  P   A  P  T  P   C  V  P

GCCGAGTGCT TCGACCTGCT GGTCCGCCAC TGCGTGGCCT GCGGGCTCCT GCGCACGCCG
 A  E  C   F  D  L  L   V  R  H   C  V  A   C  G  L  L   R  T  P

CGGCCGAAAC CGGCCGGGGC CAGCAGCCCT GCGCCCAGGA CGGCGCTGCA GCCGCAGGAG
 R  P  K   P  A  G  A   S  S  P   A  P  R   T  A  L  Q   P  Q  E

TCGGTGGGCG CGGGGGCCGG CGAGGCGGCG CTGCCCCTGC CCGGGCTGCT CTTTGGCGCC
 S  V  G   A  G  A  G   E  A  A   L  P  L   P  G  L  L   F  G  A

CCCGCGCTGC TGGGCCTGGC ACTGGTCCTG GCGCTGGTCC TGGTGGGTCT GGTGAGCTGG
 P  A  L   L  G  L  A   L  V  L   A  L  V   L  V  G  L   V  S  W

AGGCGGCGAC AGCGGCGGCT TCGCGGCGCG TCCTCCGCAG AGGCCCCCGA CGGAGACAAG
 R  R  R   Q  R  R  L   R  G  A   S  S  A   E  A  P  D   G  D  K

GACGCCCCAG AGCCCCTGGA CAAGGTCATC ATTCTGTCTC CGGGAATCTC TGATGCCACA
 D  A  P   E  P  L  D   K  V  I   I  L  S   P  G  I  S   D  A  T

GCTCCTGCCT GGCCTCCTCC TGGGGAAGAC CCAGGAACCA CCCCACCTGG CCACAGTGTC
 A  P  A   W  P  P  P   G  E  D   P  G  T   T  P  P  G   H  S  V

CCTGTGCCAG CCACAGAGCT GGGCTCCACT GAACTGGTGA CCACCAAGAC GGCCGGCCCT
 P  V  P   A  T  E  L   G  S  T   E  L  V   T  T  K  T   A  G  P

GAGCAACAAT AGCAGGGAGC CGGCAGGAGG TGGCCCCTGC CCTCCCTCTG GACCCCCAGC
 E  Q  Q   *

CAGGGGCTTG GAAATCAAAT TCAGCTCTTC ACTCCAGCAT GCACATGCCC TCTTTCTGGG
ACCAGGCTAA CCCTGCAGAA GCACAGACAC TACAGACCAC AGCATTCAGC CCCCATGGAG
TTTGGTGTGC TTGCCTTTGG CTTCAGACCT CACCATCTTT GACAGCCCTT GAAGGTGGTA
GCCCAGCTCC TGTTCCTGTG CCTTCAAAAG GCTGGGGCAC TATGAGTAAA AGACCGCTTT
TAAAATGGGG AAGGCACCAT TAAGCCAAAA TGAATCTGAA AAAAGAC
```

Фигура 4А

Секвенция на миши BAFF-R

```
1     GAATTCGGCA CGAGCCCAGA CTCGGAACTG TCCCAGCTGC ATGAGGCGGC
51    GACATGGGCG CCAGGAGACT CCGGGTCCGA AGCCAGAGGA GCCGGGACAG
101   CTCGGTGCCC ACCCAGTGCA ATCAGACCGA GTGCTTCGAC CCTCTGGTGA
151   GAAACTGCGT GTCCTGTGAG CTCTTCCACA CGCCGGACAC TGGACATACA
201   AGCAGCCTGG AGCCTGGGAC AGCTCTGCAG CCTCAGGAGG GCTCCGCGCT
251   GAGACCCGAC GTGGCGCTGC TCGTCGGTGC CCCCGCACTC CTGGGACTGA
301   TACTGGCGCT GACCCTGGTG GGTCTAGTGA GTCTGGTGAG CTGGAGGTGG
351   CGTCAACAGC TCAGGACGGC CTCCCCAGAC ACTTCAGAAG GAGTCCAGCA
401   AGAGTCCCTG GAAAATGTCT TTGTACCCTC CTCAGAAACC CCTCATGCCT
451   CAGCTCCTAC CTGGCCTCCG CTCAAAGAAG ATGCAGACAG CGCCCTGCCA
501   CGCCACAGCG TCCCGGTGCC CGCCACAGAA CTGGGCTCCA CCGAGCTGGT
551   GACCACCAAG ACAGCTGGCC CAGAGCAATA GCAGCAGTGG AGGCTGGAAC
601   CCAGGGATCT CTACTGGGCT TGTGGACTTC ACCCAACAGC TTGGGAAAGA
651   ACTTGGCCCT TCAGTGACGG AGTCCTTTGC CTGGGGGGCG AACCCGGCAG
701   AACCAGACAC TACAGGCCAC ATGAGATTGC TTTTGTGTTA GCTCTTGACT
751   TGAGAACGTT CCATTTCTGA GATGGTTTTT AAGCCTGTGT GCCTTCAGAT
801   GGTTGGATAG ACTTGAGGGT TGCATATTTA ATCTCTGTAG TGAGTCGGAG
851   ACTGGAAACT TAATCTCGTT CTAAAAATTT TGGATTACTG GGCTGGAGGT
901   ATGGCTCAGC AGTTCGGTTT GTGTGCTGTT CTAGCCGAGG ACTCCAGTTG
951   TTCAGCTTCC CGGAACTCAG ATCTGGCAGC TTAAGACCAC CTGTCACTCC
1001  AGCCCCTGGA ACATCCTTGC CTCCAAAGGC ACCAGCACTC ATTTGCTCTA
1051  GAGCACACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACACACAT
1101  ATGCATGCAT GCACACTTAA AAATGTCAAA ATTAGCGGCT GGAGAAATTC
1151  ATGGTCAACA GCGCTTACTG TGATTCCAGA GGATGAGAGT TTGATTCCCA
1201  GAATGCACTG CGGGTGGCTC ATTACTGAGC ATAACTTTTG CTTCAGGGGA
1251  CCTGATGCCT CTGGACTTCA TGGGCATCTG TATTCACGTG CACATCCTAC
1301  ACACACACAC ACACACACAC ACAGACATAC ACACACACAC ACTCTTTTAC
1351  AAATGATAAA ATATAAGATA GGCATGGTGG TACACACCTT TAATCCCAAC
1401  ATTGGGGAAG CAAAGGCAGG CAGGTAACTG AGTTGGAGGC CATCCTGGTC
1451  TACATAGCAA GTTCCAGGCT AACCAGAGCT AAATGGTGAG ACCAAGTCTC
1501  AAAATAATAC TCCCCCCCCA AAAAAAAAAA ACTTTTAAAT TTTGATTTTT
1551  TTCTTTTATT ATTATTTTTT ATATTAATTT CATGGTGTTT AGAAGTGGTA
1601  TACTTAGATG GTGACTAAGA GGAGGTAAAG CCATCAGGAC TGAGCCCCTA
1651  ACATACAAGG AGAAAGCAGA GACAATGAAC ACGCCCCTCT CCTGCTGTGT
1701  GCCAGCTCTG GACCACCAGC CAGAGGGCAA TCATCAGATG TGGGCCCTAG
1751  AACCTTCAGA GCCGAAAGCT AAATCAATCT CATTTCTTTG TAAAGCTATT
1801  TAGCCTTAGG TGTTTTGTTA CGGTGATATA AAATGGACTA ACACAGGCAC
1851  TATGAGTAAG AAGCTTTTCT TTGAGCTGGG AAAGGTACTG TTAAACCAAA
1901  ATTAATCTGA ATAAAAAAAG GCTAAGGGGA AGACACTTAA AAA
```

Фигура 4B

Аминокиселинна секвенция на миши BAFF-R

MGARRLRVRSQRSRDSSVPTQCNQTECFDPLVRNCVSCEL

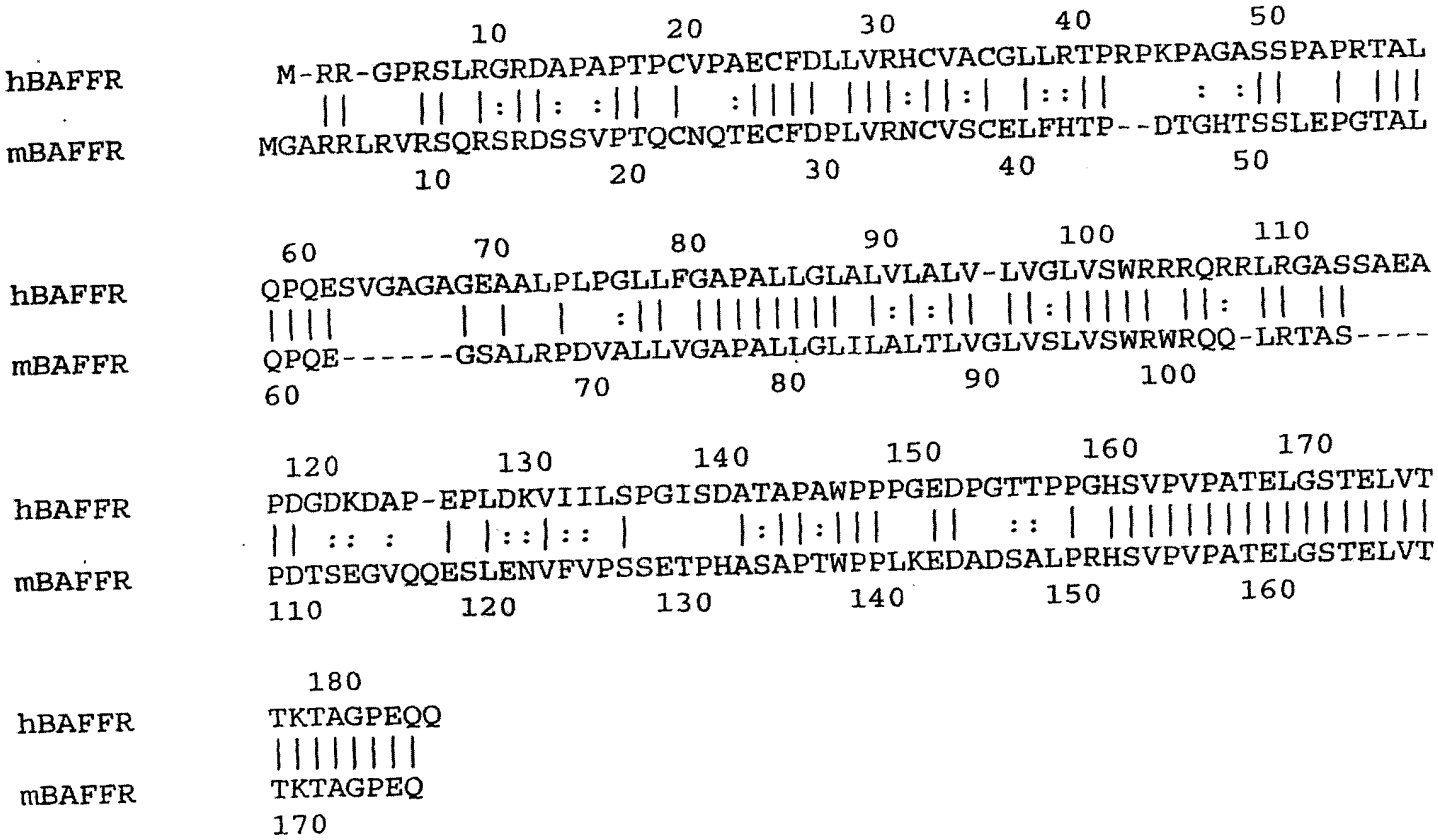
FHTPDTGHTSSLEPGTALQPQEGSALRPD VALLVGAPALLG

LILALTLVG LVSLVSW RWRQQLRTASPDTSEGVQQESLEN

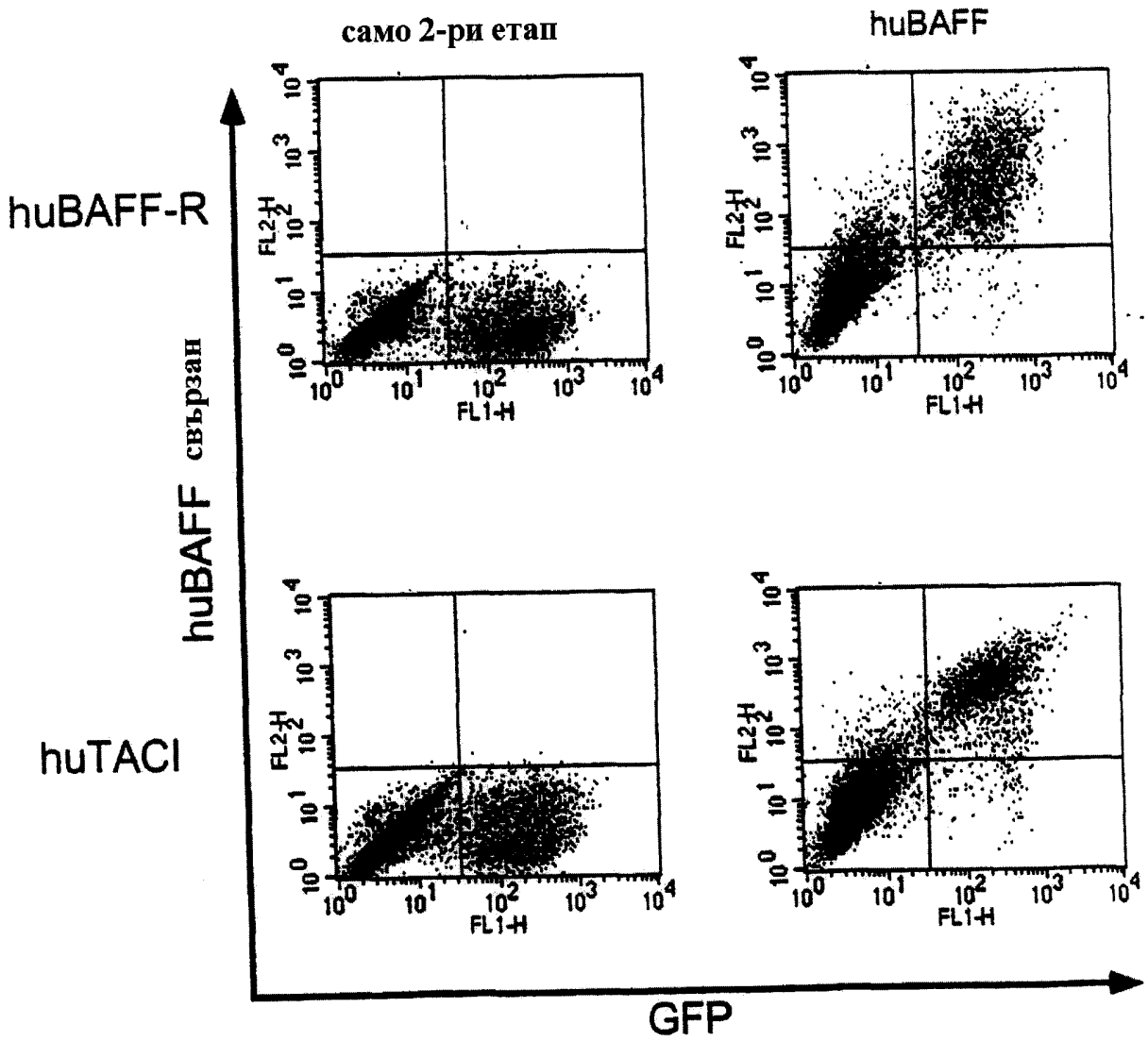
VFVPSSETPHASAPTWPPLKEDADSALPRHSVPVPATELGS

TELVTTKTAGPEQ

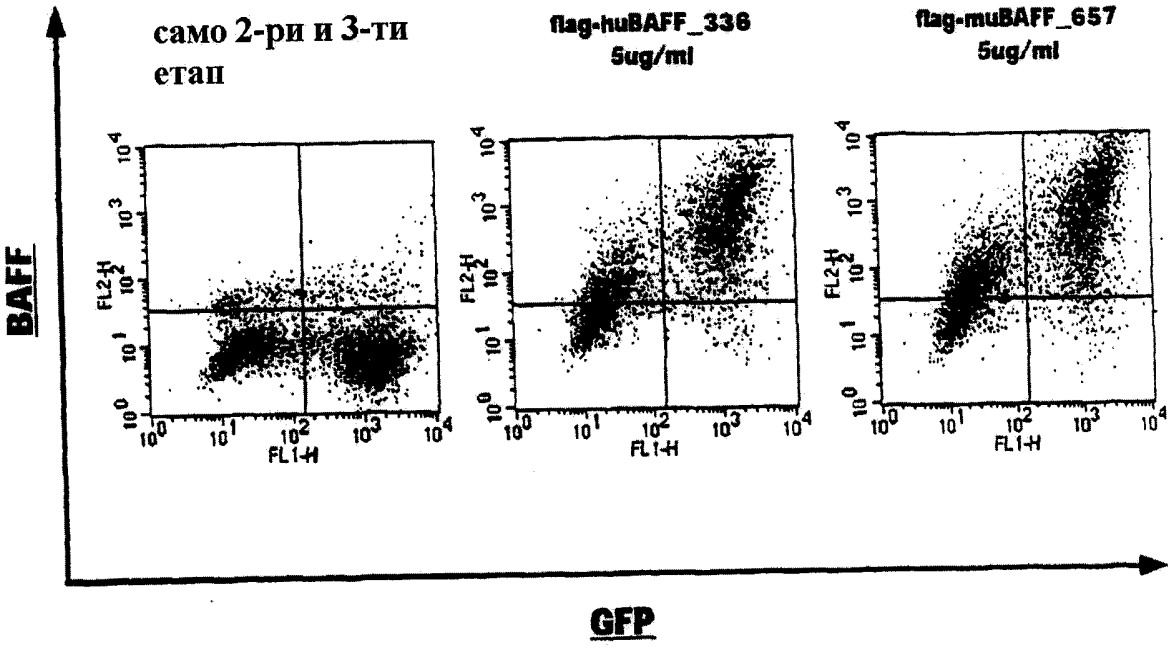
ФИГУРА 4С


10 20 30 40 50
hBAFFR M-RR-GPRSLRGRDAPAPTPCVPAECFDLLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTAL
mBAFFR MGARRLRVRSQRSRDSSVPTQCNQTECFDPLVRNCVSCELFHTP--DTGHTSSLEPGTAL
10 20 30 40 50
60 70 80 90 100 110
hBAFFR QPQESVGAGAGEAALPLPGLLFGAPALLGLALVLALV-LVGLVSWRRRQRRLRGASSAEA
mBAFFR QPQE------GSALRPDVALLVGAPALLGLILALTLVGLVSLVSWRWRQQ-LRTAS----
60 70 80 90 100
120 130 140 150 160 170
hBAFFR PDGDKDAP-EPLDKVIILSPGISDATAPAWPPPGEDPGTTPPGHSVPVPATELGSTELVT
mBAFFR PDTSEGVQQESLENVFVPSSETPHASAPTWPPLKEDADSALPRHSVPVPATELGSTELVT
110 120 130 140 150 160
180
hBAFFR TKTAGPEQQ
mBAFFR TKTAGPEQ
170

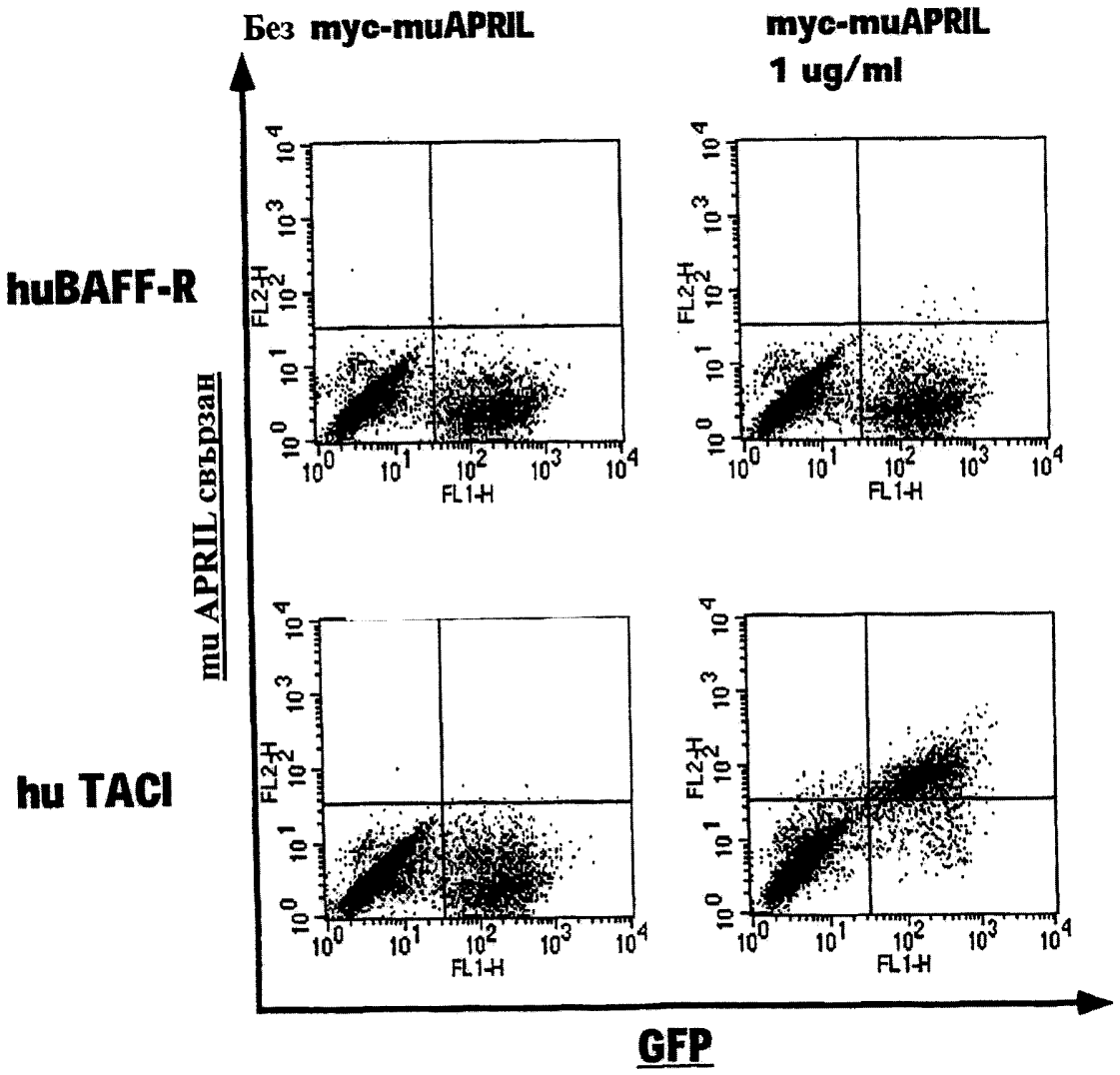
Фигура 5:


само 2-ри етап
huBAFF
huBAFF-R
huTACI
huBAFF свързан
GFP
FL2-H
FL1-H

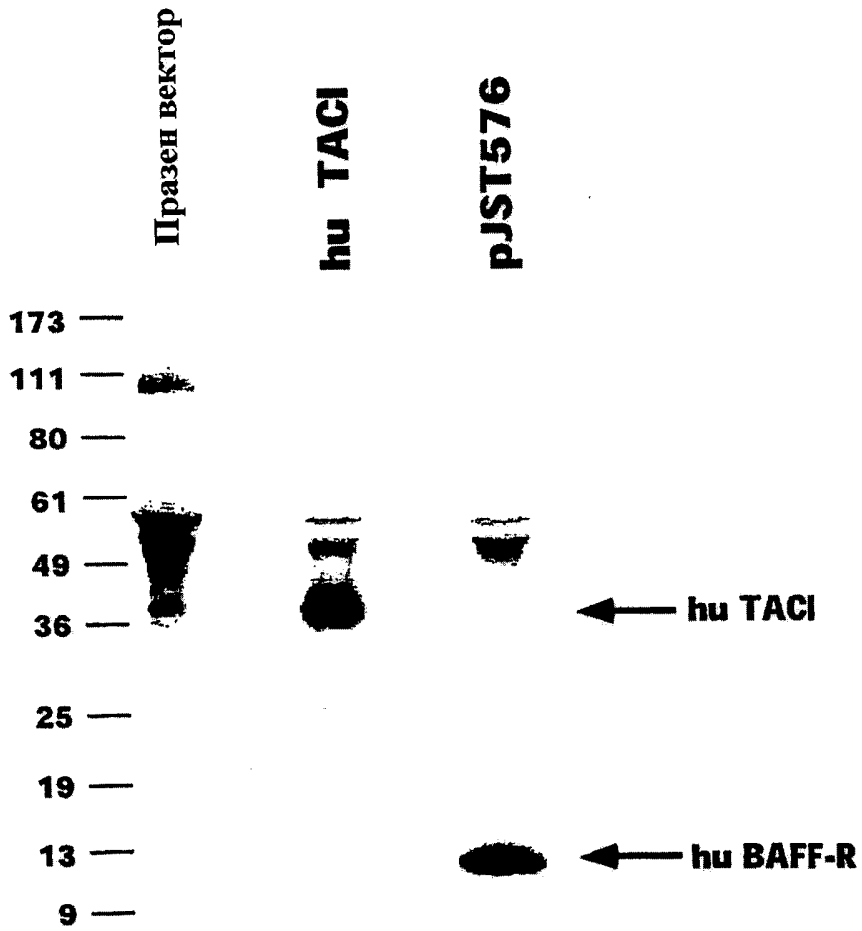
Фигура 6:


само 2-ри и 3-ти етап
flag-huBAFF_336 5ug/ml
flag-muBAFF_657 5ug/ml
BAFF
GFP
FL2-H
FL1-H

Фигура 7:


Без myc-muAPRIL
myc-muAPRIL
1 ug/ml
huBAFF-R
hu TACI
mu APRIL свързан
GFP
FL1-H
FL2-H

Фигура 8:


Празен вектор
hu TACI
pJST576
173
111
80
61
49
36
25
19
13
9
hu TACI
hu BAFF-R

ФИГУРА 9

```
   1 ATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGT
     M  E  T  D  T  L  L  L  W  V  L  L  L  W  V  P  G  S  T  G

  61 GACGTCAGGCGAGGGCCCCGGAGCCTGCGGGGCAGGGACGCGCCAGCCCCCACGCCCTGC
     D  V  R  R  G  P  R  S  L  R  G  R  D  A  P  A  P  T  P  C

 121 GTCCCGGCCGAGTGCTTCGACCTGCTGGTCCGCCACTGCGTGGCCTGCGGGCTCCTGCGC
     V  P  A  E  C  F  D  L  L  V  R  H  C  V  A  C  G  L  L  R

 181 ACGCCGCGGCCGAAACCGGCCGGGGCCAGCAGCCCTGCGCCCAGGACGGCGCTGCAGCCG
     T  P  R  P  K  P  A  G  A  S  S  P  A  P  R  T  A  L  Q  P

 241 CAGGAGTCGGTGGGCGCGGGGGCCGGCGAGGCGGCGGTCGACAAAACTCACACATGCCCA
     Q  E  S  V  G  A  G  A  G  E  A  A  V  D  K  T  H  T  C  P

 301 CCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCC
     P  C  P  A  P  E  L  L  G  G  P  S  V  F  L  F  P  P  K  P

 361 AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
     K  D  T  L  M  I  S  R  T  P  E  V  T  C  V  V  V  D  V  S

 421 CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
     H  E  D  P  E  V  K  F  N  W  Y  V  D  G  V  E  V  H  N  A

 481 AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC
     K  T  K  P  R  E  E  Q  Y  N  S  T  Y  R  V  V  S  V  L  T

 541 GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC
     V  L  H  Q  D  W  L  N  G  K  E  Y  K  C  K  V  S  N  K  A

 601 CTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG
     L  P  A  P  I  E  K  T  I  S  K  A  K  G  Q  P  R  E  P  Q

 661 GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGC
     V  Y  T  L  P  P  S  R  D  E  L  T  K  N  Q  V  S  L  T  C

 721 CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG
     L  V  K  G  F  Y  P  S  D  I  A  V  E  W  E  S  N  G  Q  P

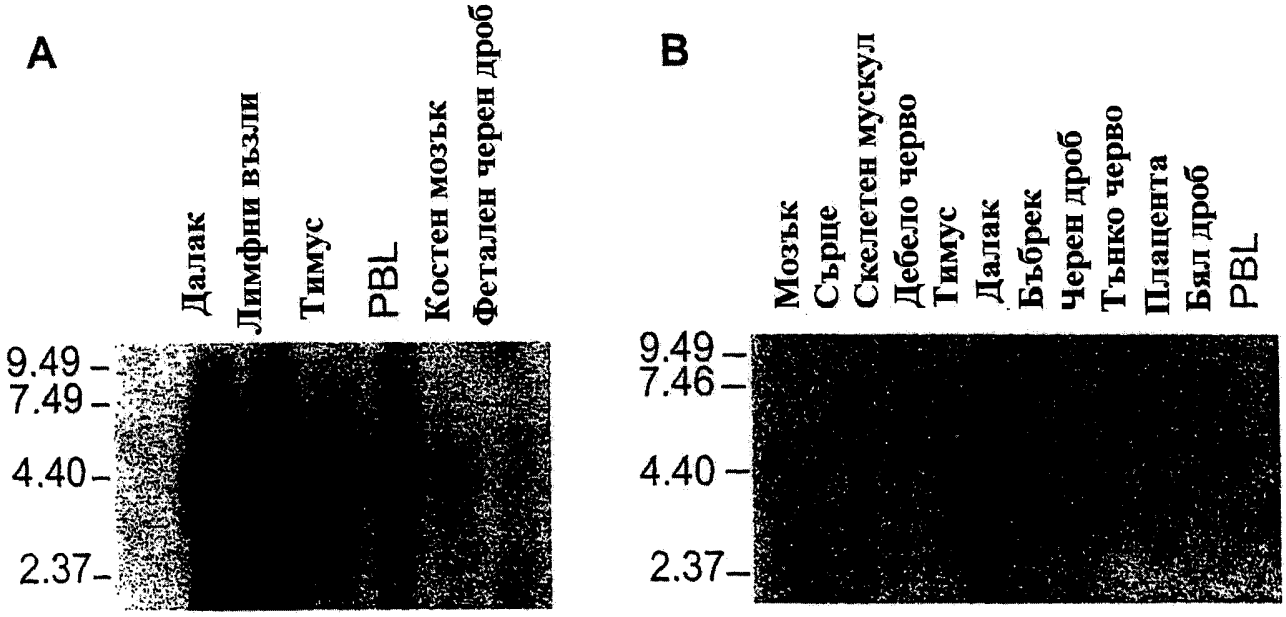
 781 GAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTAC
     E  N  N  Y  K  T  T  P  P  V  L  D  S  D  G  S  F  F  L  Y

 841 AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG
     S  K  L  T  V  D  K  S  R  W  Q  Q  G  N  V  F  S  C  S  V

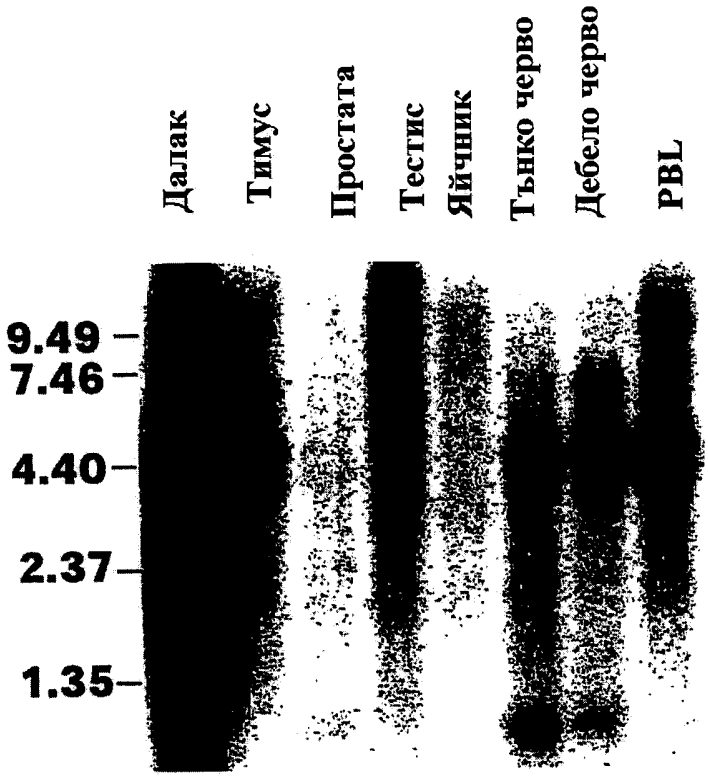
 901 ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAAA
     M  H  E  A  L  H  N  H  Y  T  Q  K  S  L  S  L  S  P  G  K

 961 TGA
     •
```

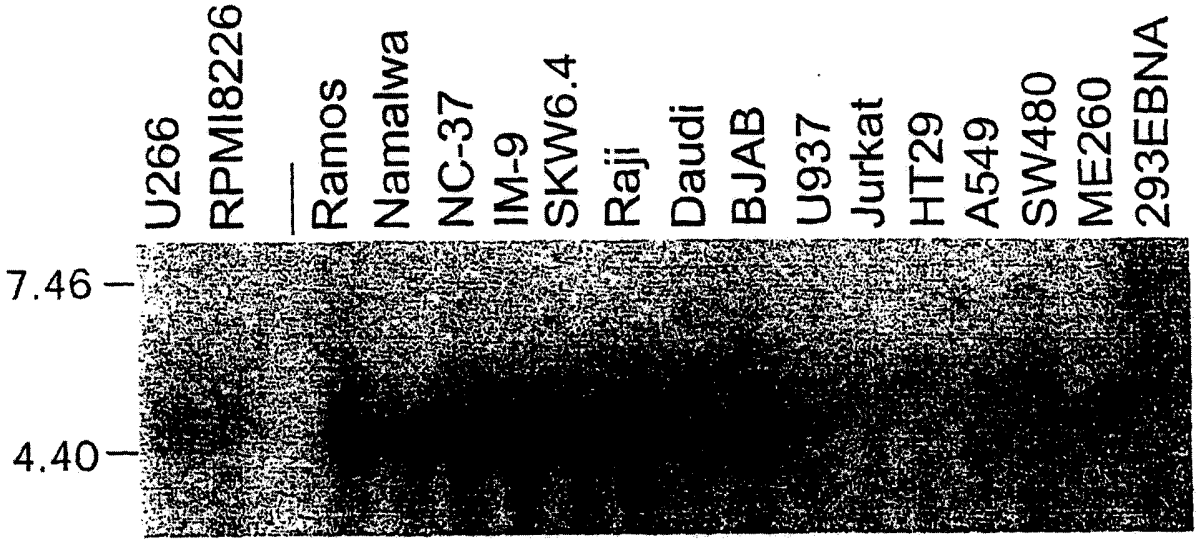
Фигура 10:


A
Далак
Лимфни възли
Тимус
PBL
Костен мозък
Фетален черен дроб
9.49
7.49
4.40
2.37
B
Мозък
Сърце
Скелетен мускул
Дебело черво
Тимус
Далак
Бъбрек
Черен дроб
Тънко черво
Плацента
Бял дроб
PBL
9.49
7.46
4.40
2.37

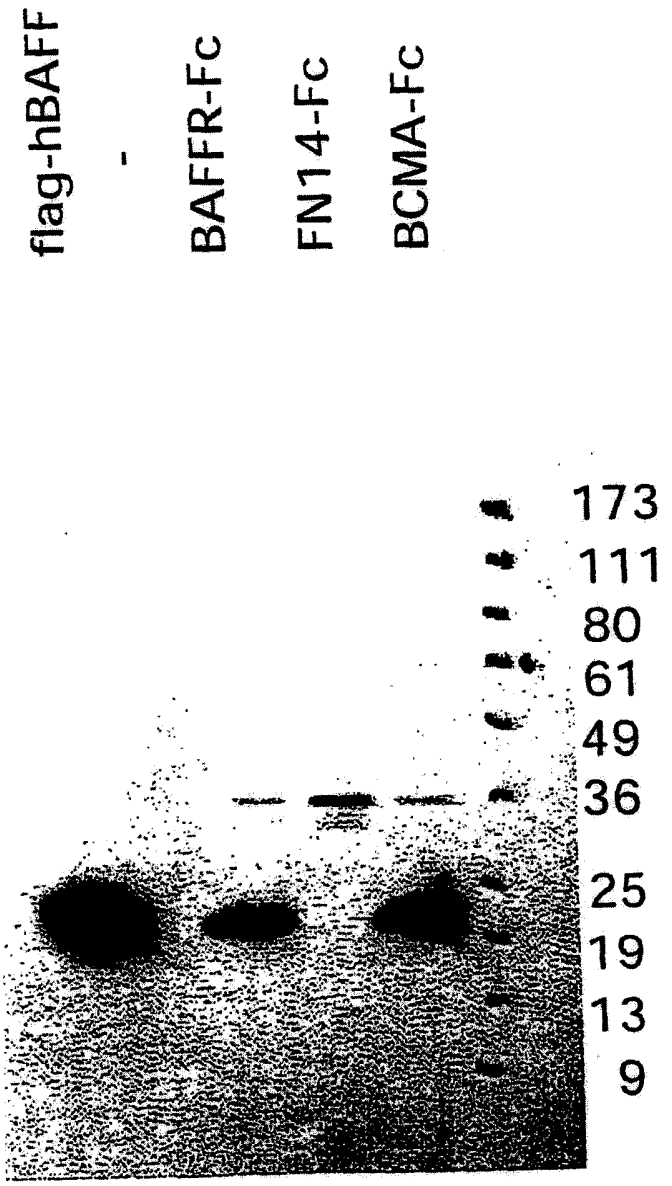
Фигура 10 С


Далак
Тимус
Простата
Тестис
Яйчник
Тънко черво
Дебело черво
PBL
9.49
7.46
4.40
2.37
1.35

Фигура 11:

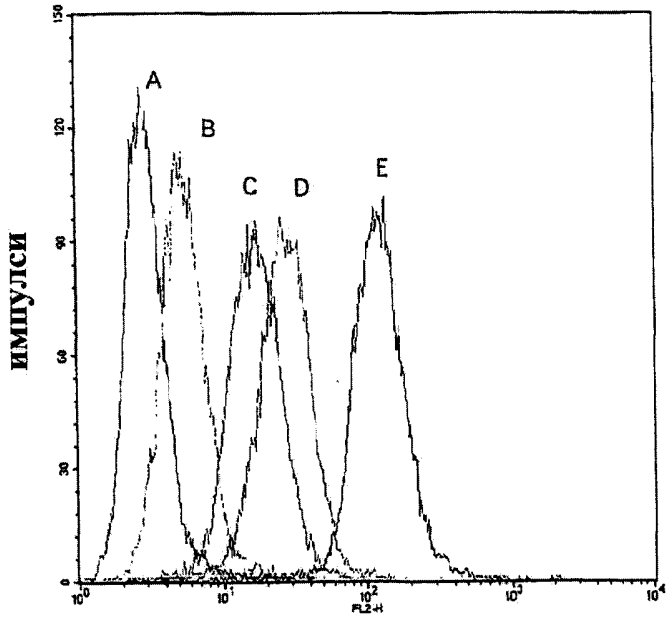

U266
RPMI8226
—
Ramos
Namalwa
NC-37
IM-9
SKW6.4
Raji
Daudi
BJAB
U937
Jurkat
HT29
A549
SW480
ME260
293EBNA
7.46
4.40

Фигура 12:

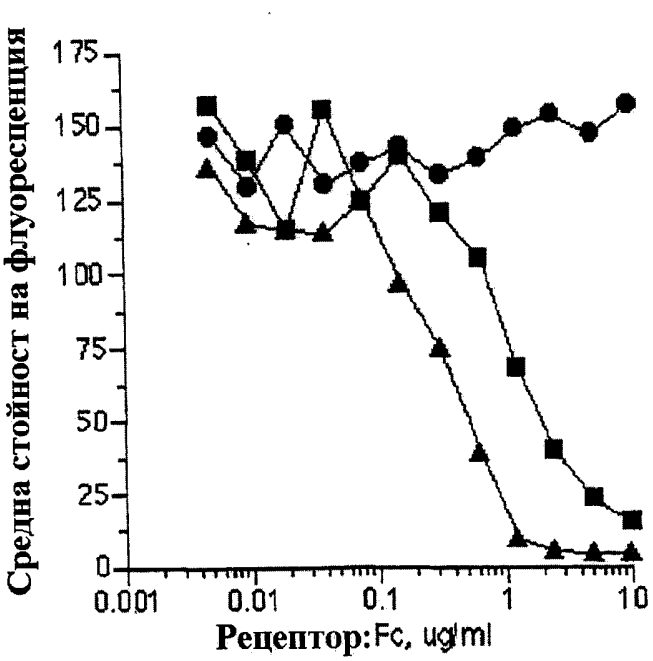


Фигура 13:

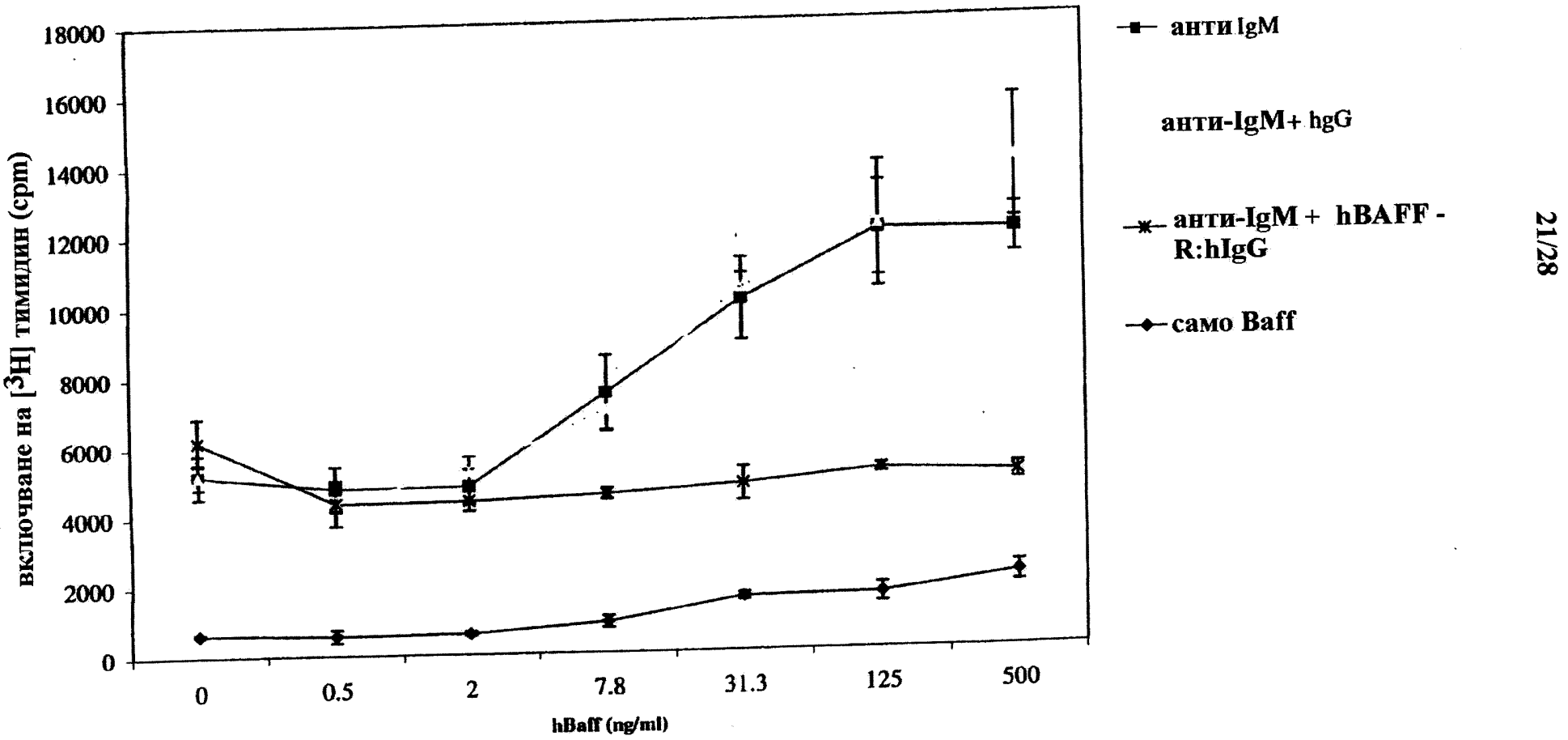
A


импулси
A
B
C
D
E
FL2-H

B

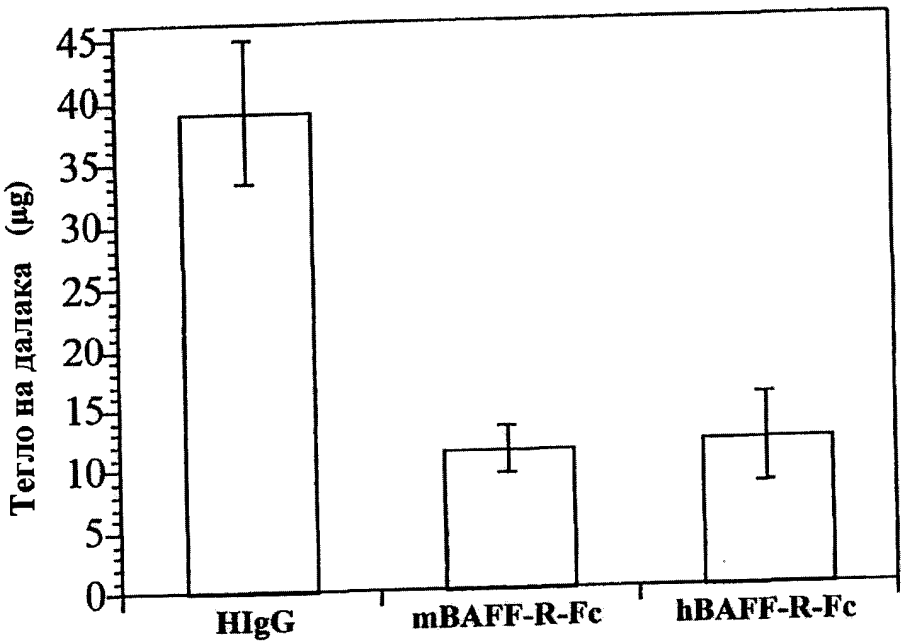

Средна стойност на флуоресценция
175
150
125
100
75
50
25
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Рецептор:Fc, ug/ml

Фигура 14


18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
включване на [3H] тимидин (cpm)
0
0.5
2
7.8
31.3
125
500
hBaff (ng/ml)
анти IgM
анти-IgM+ hgG
анти-IgM + hBAFF - R:hIgG
само Baff

Фигура 15.

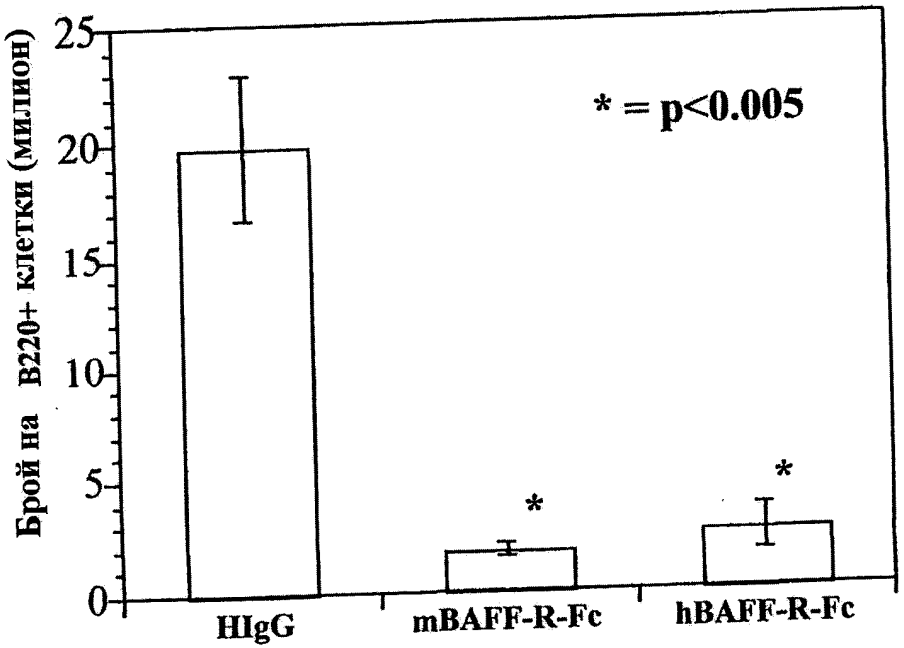
BAFF-R-Fc третирането води до редукция в теглото на далака



Мишките получават 200 µg **от** HIgG, mBAFF-R-Fc **или** hBAFF-R-Fc **на дни** 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22 **и** 25. **Мишките се евтанизират на ден 28, далаците се събират и се записват теглата им.**

Фигура 16

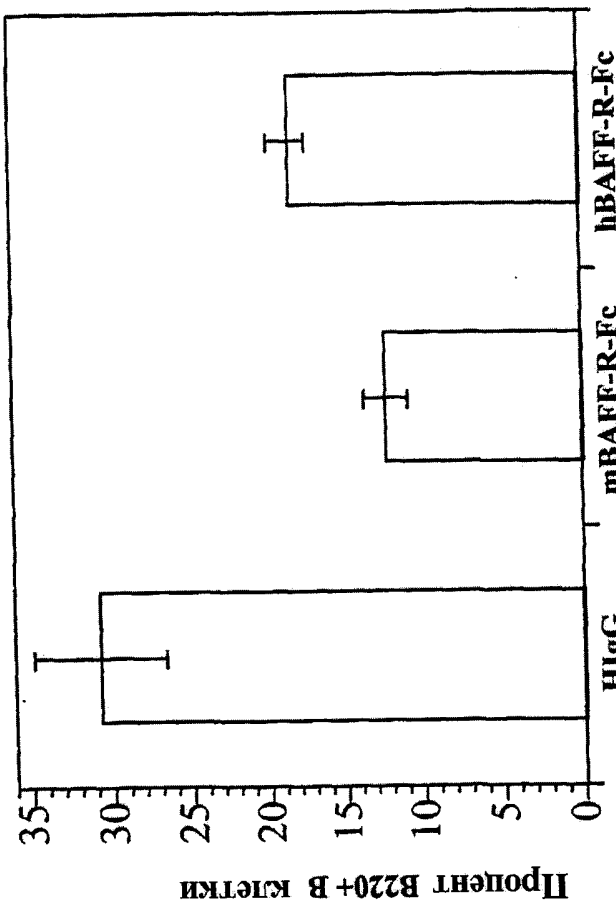
Третирането с човешки и миши BAFF-R-Fc редуцира броя на далачни B220+ B клетки



Мишките получават 200 μg **от** HIgG, mBAFF-R-Fc **или** hBAFF-R-Fc **на дни** 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22 **и** 25. **Мишките се евтанизират на ден 28 и далаците се събират за анализ на броя на B клетките**

Фигура 17.

BAFF-R-Fc третирането редуцира процента на B220+ B клетки в лимфните възли

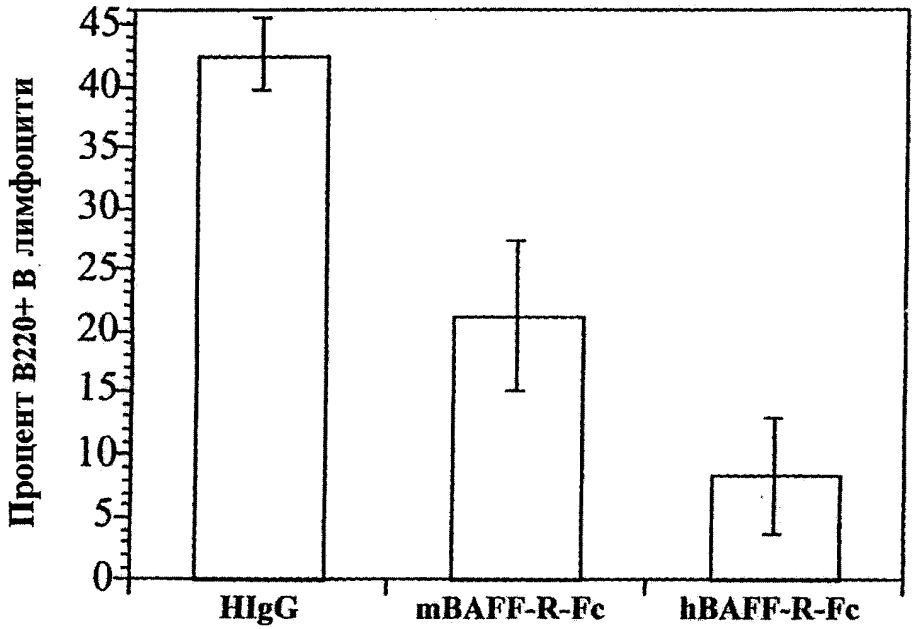


Мишките получават 200 μg **от** HIgG, mBAFF-R-Fc **или** hBAFF-R-Fc **на дни** 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22 **и** 25.

Мишките се евтанизират на ден 28, LNs се събират и се анализират за B220+ **B клетки.**

Фигура 18.

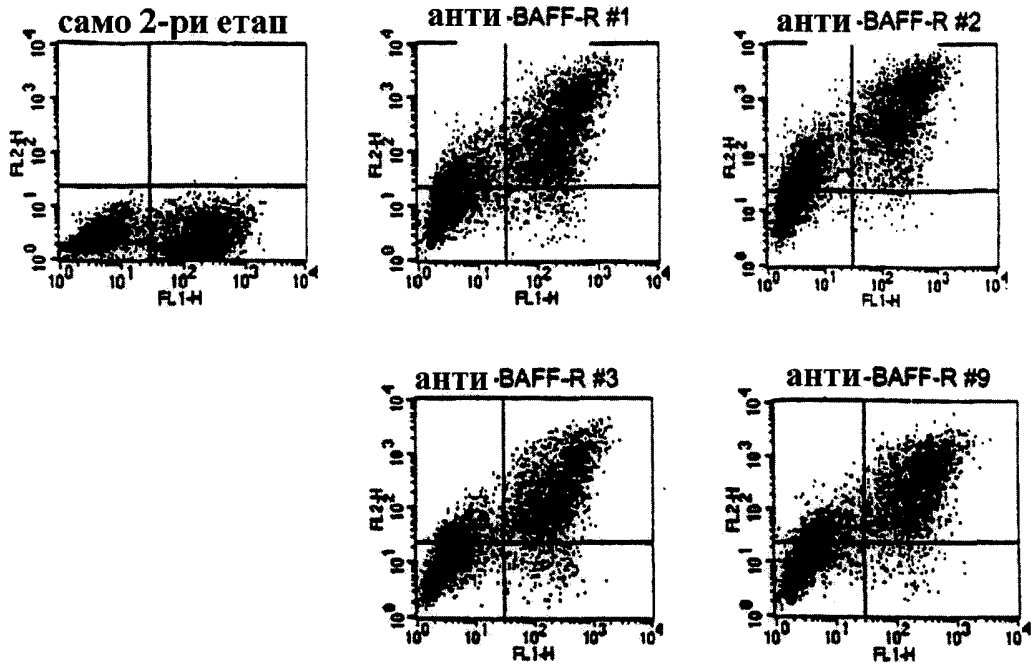
BAFF-R-Fc третирането води до редукция на B220+ B лимфоцитите в периферната кръв



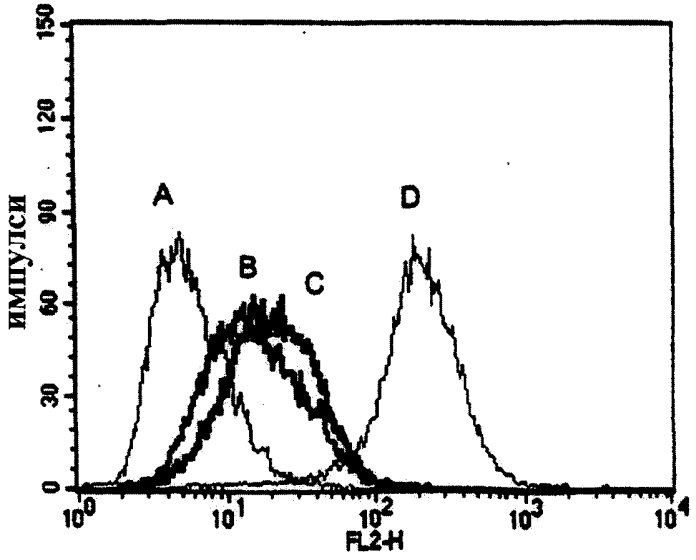
Мишките получават 200 µg **от** HIgG, mBAFF-R-Fc **или** hBAFF-R-Fc **на дни** 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22 **и** 25. **Периферна кръв се взима преди убиването на ден 28 и се определя процента на** B220+ **лимфоцитите.**

Фигура 19

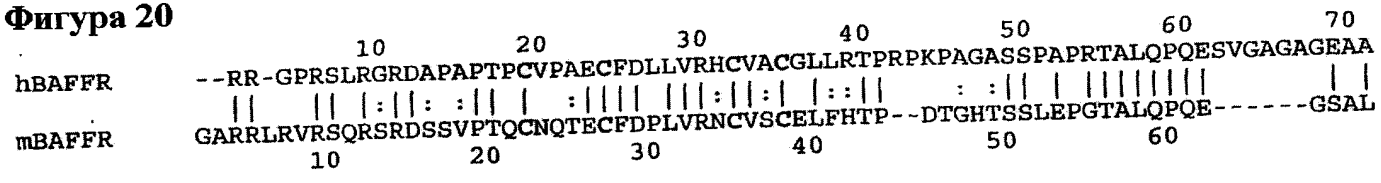
A


само 2-ри етап
анти -BAFF-R #1
анти -BAFF-R #2
анти -BAFF-R #3
анти-BAFF-R #9
FL2-H
FL1-H

B

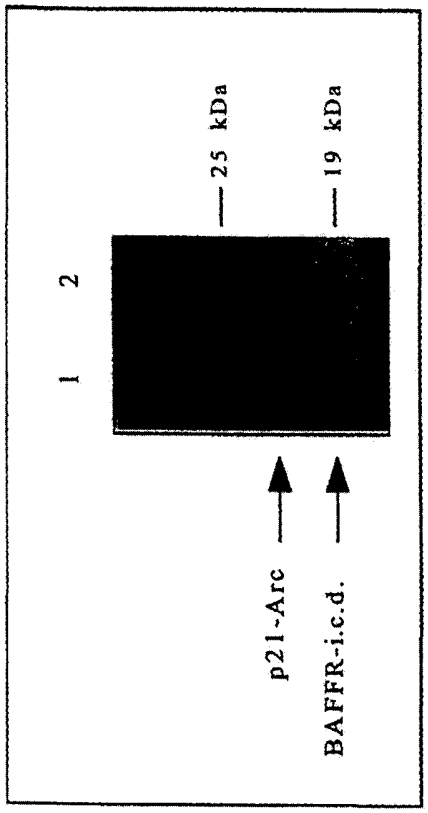

импулси
A
B
C
D
FL2-H

Фигура 20



		% Агрегиране
JST659	GARRLRVRSQRSRDSPAPTPCVPAECFDLLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA	90
JST660	GARRLRVRSQRSRDSSVPTQCVPAECFDLLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA	90
JST661	GARRLRVRSQRSRDSSVPTQCNQTECFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA	10
JST662	GARRLRVRSQRSRDSSVPTQCNQTECFDPLVRNCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA	10
JST663	--RR-GPRSLRGRDAPAPTPCNQTECFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA	10
JST673	--RR-GPRSLRGRDAPAPTPCNPTECFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA	10
JST674	--RR-GPRSLRGRDAPAPTPCNQAECFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA	10
JST675	--RR-GPRSLRGRDAPAPTPCNPAECFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA	10
JST672	--RR-GPRSLRGRDAPAPTPCVQTECFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA	35
JST676	--RR-GPRSLRGRDAPAPTPCVQAECFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA	35
JST671	--RR-GPRSLRGRDAPAPTPCVPAECFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA	60
JST677	--RR-GPRSLRGRDAPAPTPCNPAECFDSLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA	60
JST678	--RR-GPRSLRGRDAPAPTPCNPAECFDALVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA	60
JST664	--RR-GPRSLRGRDAPAPTPCNQTECFDLLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA	90
JST668	--RR-GPRSLRGRDAPAPTPCNPTECFDLLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA	90
JST665	--RR-GPRSLRGRDAPAPTPCNQAECFDLLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA	90
JST666	--RR-GPRSLRGRDAPAPTPCVQAECFDLLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA	90
JST667	--RR-GPRSLRGRDAPAPTPCNPAECFDLLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA	90

Фигура 21



СПИСЪК НА СЕКВЕНЦИИТЕ

<110> Biogen, Inc.
Thompson, Jeffrey S
Ambrose, Christine M

<120> **НУКЛЕИНОВИ КИСЕЛИНИ ЗА РЕЦЕПТОРИ И ПОЛИПЕПТИДИ**

<130> BIOG-0086

<150> 60/233,152
<151> 2000-09-18

<150> 60/234,140
<151> 2000-09-21

<150> 60/268,499
<151> 2001-02-13

<150> 60/312,185
<151> 2001-08-14

<160> 37

<170> PatentIn version 3.1

<210>
<211> 1201
<212> **ДНК**
<213> Homo sapiens

<400> 1
gcaccatgag gcgagggccc cggagcctgc ggggcaggga cgcgccagcc cccacgccct 60

gcgtcccggc cgagtgcttc gacctgctgg tccgccactg cgtggcctgc gggctcctgc 120

gcacgccgcg gccgaaaccg ggtaaggggg acccacgggg cgcgcggcgc cggcagctgc 180

ggggagaacg gggccccgat cgccagggcg caggcagagc cccgaccccc gggggcgccg 240

agggctgaaa ggaccctgtg ggcagggcct ggaggggccc gcgatcaccg cgtggccctc 300

accgccgcct ctctccctcc ccttgtccac cgccccccgg ctgtccctcc cctccccggc 360

cagcctcgcc cccctccgcc cctccccgtc cccgctcctc cctcccctcg gccccctggc 420

ctccctccct gtcccctccc gaagcagccg gggccagcag ccctgcgccc aggacggcgc 480

tgcagccgca ggagtcggtg ggcgcggggg ccggcgaggc ggcgctgccc ctgcccgggc 540

tgctctttgg cgcccccgcg ctgctgggcc tggcactggt cctggcgctg gtcctggtgg 600

gtctggtgag ctggaggcgg cgacagcggc ggcttcgcgg cgcgtcctcc gcagaggccc 660

ccgacggaga caaggacgcc ccagagcccc tggacaaggt catcattctg tctccgggaa 720

tctctgatgc cacagctcct gcctggcctc ctcctgggga agacccagga accaccccac 780

ctggccacag tgtccctgtg ccagccacag agctgggctc cactgaactg gtgaccacca 840

agacggccgg ccctgagcaa caatagcagg gagccggcag gaggtggccc ctgccctccc 900

tctggacccc cagccagggg cttggaaatc aaattcagct cttcactcca gcatgcacat 960

gccctctttc tgggaccagg ctaaccctgc agaagcacag acactacaga ccacagcatt 1020

cagcccccat ggagtttggt gtgcttgcct ttggcttcag acctcaccat ctttgacagc 1080

ccttgaaggt ggtagcccag ctcctgttcc tgtgccttca aaaggctggg gcactatgag 1140

taaaagaccg cttttaaaat ggggaaggca ccattaagcc aaaatgaatc tgaaaaaaga 1200

c 1201

<210> 2
<211> 992
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 2
gtcgacccac gcgtccgccc acgcgtccgg tgcggcggcg tcggcaccat gaggcgaggg 60

ccccggagcc tgcggggcag ggacgcgcca gcccccacgc cctgcgtccc ggccgagtgc 120

ttcgacctgc tggtccgcca ctgcgtggcc tgcgggctcc tgcgcacgcc gcggccgaaa 180

ccgggtaagg gggacccacg gggcgcgcgg cgccggcagc tgcggggaga acggggcccc 240

gatcgccagg gcgcaggcag agccccgacc cccgggggcg ccgagggctg aaaggaccct 300

gtgggcaggg cctggagggg cccgcgatca ccgcgtggcc ctcaccgccg cctctctccc 360

tccccttgtc caccgccccc cggctgtccc tcccctcccc ggccagcctc gccccccctcc 420

gcccctcccc gtccccgctc ctcccctcccc tcggcccccc ggcctcccctc cctgtccccc 480

cccgaagcag ccggggccag cagccctgcg cccaggacgg cgctgcagcc gcaggagtcg 540

gtgggcgcgg gggccggcga ggcggcgctg cccctgcccg ggctgctctt tggcgccccc 600

gcgctgctgg gcctggcact ggtcctggcg ctggtcctgg tgggtctggt gagctggagg 660

cggcgacagc ggcggcttcg cggcgcgtcc tccgcagagg cccccgacgg agacaaggac 720

gccccagagc ccctggacaa ggtcatcatt ctgtctccgg gaatctctga tgccacagct 780

cctgcctggc ctcctcctgg ggaagaccca ggaaccaccc cacctggcca cagtgtccct 840

gtgccagcca cagagctggg ctccactgaa ctggtgacca ccaagacggc cggccctgag 900

caacaatagc agggagccgg caggaggtgg cccctgccct ccctctggac ccccagccag 960

gggcttggaa atcaaattca gctcttcact cc 992

<210> 3
<211> 906
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 3
ggcgcgccgc accatgaggc gagggccccg gagcctgcgg ggcagggacg cgccagcccc 60

cacgccctgc gtcccggccg agtgcttcga cctgctggtc cgccactgcg tggcctgcgg 120

gctcctgcgc acgccgcggc cgaaaccggc agccggggcc agcagccctg cgcccaggac 180

ggcgctgcag ccgcaggagt cggtgggcgc gggggccggc gaggcggcgc tgcccctgcc 240

cgggctgctc tttggcgccc ccgcgctgct gggcctggca ctggtcctgg cgctggtcct 300

ggtgggtctg gtgagctgga ggcggcgaca gcggcggctt cgcggcgcgt cctccgcaga 360

ggcccccgac ggagacaagg acgccccaga gcccctggac aaggtcatca ttctgtctcc 420

gggaatctct gatgccacag ctcctgcctg gcctcctcct ggggaagacc caggaaccac 480

cccacctggc cacagtgtcc ctgtgccagc cacagagctg ggctccactg aactggtgac 540

caccaagacg gccggccctg agcaacaata gcagggagcc ggcaggaggt ggcccctgcc 600

ctccctctgg acccccagcc aggggcttgg aaatcaaatt cagctcttca ctccagcatg 660

cacatgccct ctttctggga ccaggctaac cctgcagaag cacagacact acagaccaca 720

gcattcagcc cccatggagt ttggtgtgct tgcctttggc ttcagacctc accatctttg 780

acagcccttg aaggtggtag cccagctcct gttcctgtgc cttcaaaagg ctggggcact 840

atgagtaaaa gaccgctttt aaaatgggga aggcaccatt aagccaaaat gaatctgaaa 900

aaagac 906

<210> 4
<211> 903

<212> **ДНК**
<213> Homo sapiens

<400> 4
ggcgcgccgc accatgaggc gagggccccg gagcctgcgg ggcagggacg cgccagcccc 60

cacgccctgc gtcccggccg agtgcttcga cctgctggtc cgccactgcg tggcctgcgg 120

gctcctgcgc acgccgcggc cgaaaccggc cggggccagc agccctgcgc ccaggacggc 180

gctgcagccg caggagtcgg tgggcgcggg ggccggcgag gcggcgctgc ccctgcccgg 240

gctgctcttt ggcgcccccg cgctgctggg cctggcactg gtcctggcgc tggtcctggt 300

gggtctggtg agctggaggc ggcgacagcg gcggcttcgc ggcgcgtcct ccgcagaggc 360

ccccgacgga gacaaggacg ccccagagcc cctggacaag gtcatcattc tgtctccggg 420

aatctctgat gccacagctc ctgcctggcc tcctcctggg gaagacccag gaaccacccc 480

acctggccac agtgtccctg tgccagccac agagctgggc tccactgaac tggtgaccac 540

caagacggcc ggccctgagc aacaatagca gggagccggc aggaggtggc ccctgccctc 600

cctctggacc cccagccagg ggcttggaaa tcaaattcag ctcttcactc cagcatgcac 660

atgccctctt tctgggacca ggctaaccct gcagaagcac agacactaca gaccacagca 720

ttcagccccc atggagtttg gtgtgcttgc ctttggcttc agacctcacc atctttgaca 780

gcccttgaag gtggtagccc agctcctgtt cctgtgcctt caaaaggctg gggcactatg 840

agtaaaagac cgcttttaaa atggggaagg caccattaag ccaaaatgaa tctgaaaaaa 900

gac 903

<210> 5
<211> 185
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro
1 5 10 15

Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys
20 25 30

Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala
35 40 45

Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val
50 55 60

Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Leu Pro Leu Pro Gly Leu Leu Phe
65 70 75 80

Gly Ala Pro Ala Leu Leu Gly Leu Ala Leu Val Leu Ala Leu Val Leu
85 90 95

Val Gly Leu Val Ser Trp Arg Arg Arg Gln Arg Arg Leu Arg Gly Ala
100 105 110

Ser Ser Ala Glu Ala Pro Asp Gly Asp Lys Asp Ala Pro Glu Pro Leu
115 120 125

Asp Lys Val Ile Ile Leu Ser Pro Gly Ile Ser Asp Ala Thr Ala Pro
130 135 140

Ala Trp Pro Pro Pro Gly Glu Asp Pro Gly Thr Thr Pro Pro Gly His
145 150 155 160

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

Thr Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln Gln
180 185

<210> 6
<211> 1187
<212> **ДНК**
<213> Homo sapiens

<400> 6
gggcgcctac aatctcagct actcgggagg ctgaggcaga gaattgtttg aacccgggag 60

gcagagcttg cagtgagccg agatagcgcc attgcactcc agcctgggcg acagagcgag 120

actccgtctc aaaaaaaaaa aaagaaaaga aaggggggcc ccaggcgagc tcggtcccac 180

ccagcaggcg ggggcggggc agggcagagt gctccccccg ccccccgctt cctccccgag 240

ggccccggag cccagctcag cctcagtccc cgcagcttgt gcggcggcgt cggcaccatg 300

aggcgagggc cccggagcct gcggggcagg gacgcgccag cccccacgcc ctgcgtcccg 360

gccgagtgct tcgacctgct ggtccgccac tgcgtggcct gcgggctcct gcgcacgccg 420

cggccgaaac cggccggggc cagcagccct gcgcccagga cggcgctgca gccgcaggag 480

tcggtgggcg cgggggccgg cgaggcggcg ctgcccctgc ccgggctgct ctttggcgcc 540

cccgcgctgc tgggcctggc actggtcctg gcgctggtcc tggtgggtct ggtgagctgg 600

aggcggcgac agcggcggct tcgcggcgcg tcctccgcag aggcccccga cggagacaag 660

gacgccccag agcccctgga caaggtcatc attctgtctc cgggaatctc tgatgccaca 720

gctcctgcct ggcctcctcc tggggaagac ccaggaacca ccccacctgg ccacagtgtc 780

cctgtgccag ccacagagct gggctccact gaactggtga ccaccaagac ggccggccct 840

gagcaacaat agcagggagc cggcaggagg tggcccctgc cctccctctg gacccccagc 900

caggggcttg gaaatcaaat tcagctcttc actccagcat gcacatgccc tctttctggg 960

accaggctaa ccctgcagaa gcacagacac tacagaccac agcattcagc ccccatggag 1020

tttggtgtgc ttgcctttgg cttcagacct caccatcttt gacagccctt gaaggtggta 1080

gcccagctcc tgttcctgtg ccttcaaaag gctggggcac tatgagtaaa agaccgcttt 1140

taaaatgggg aaggcaccat taagccaaaa tgaatctgaa aaaagac 1187

<210> 7
<211> 266
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Thr Arg Glu Ala Glu Leu Ala Val Ser Arg Asp Ser Ala Ile Ala Leu
1 5 10 15

Gln Pro Gly Arg Gln Ser Glu Thr Pro Ser Gln Lys Lys Lys Lys Lys
20 25 30

Arg Lys Gly Gly Pro Arg Arg Ala Arg Ser His Pro Ala Gly Gly Gly
35 40 45

Gly Ala Gly Gln Ser Ala Pro Pro Ala Pro Arg Phe Leu Pro Glu Gly
50 55 60

Pro Gly Ala Gln Leu Ser Leu Ser Pro Arg Ser Leu Cys Gly Gly Val

65 70 75 80

Gly Thr Met Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro
85 90 95

Ala Pro Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg
100 105 110

His Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala
115 120 125

Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser
130 135 140

Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Leu Pro Leu Pro Gly Leu Leu
145 150 155 160

Phe Gly Ala Pro Ala Leu Leu Gly Leu Ala Leu Val Leu Ala Leu Val
165 170 175

Leu Val Gly Leu Val Ser Trp Arg Arg Arg Gln Arg Arg Leu Arg Gly
180 185 190

Ala Ser Ser Ala Glu Ala Pro Asp Gly Asp Lys Asp Ala Pro Glu Pro
195 200 205

Leu Asp Lys Val Ile Ile Leu Ser Pro Gly Ile Ser Asp Ala Thr Ala
210 215 220

Pro Ala Trp Pro Pro Pro Gly Glu Asp Pro Gly Thr Thr Pro Pro Gly
225 230 235 240

His Ser Val Pro Val Pro Ala Thr Glu Leu Gly Ser Thr Glu Leu Val
245 250 255

Thr Thr Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln Gln
260 265

<210> 8
<211> 1943
<212> **ДНК**
<213> Mus musculus

<400> 8
gaattcggca cgagcccaga ctcggaactg tcccagctgc atgaggcggc gacatgggcg 60

ccaggagact ccgggtccga agccagagga gccgggacag ctcggtgccc acccagtgca 120

atcagaccga gtgcttcgac cctctggtga gaaactgcgt gtcctgtgag ctcttccaca 180

cgccggacac tggacataca agcagcctgg agcctgggac agctctgcag cctcaggagg 240

gctccgcgct gagacccgac gtggcgctgc tcgtcggtgc ccccgcactc ctgggactga 300

tactggcgct gaccctggtg ggtctagtga gtctggtgag ctggaggtgg cgtcaacagc 360

tcaggacggc ctccccagac acttcagaag gagtccagca agagtccctg gaaaatgtct 420

ttgtaccctc ctcagaaacc cctcatgcct cagctcctac ctggcctccg ctcaaagaag 480

atgcagacag cgccctgcca cgccacagcg tcccggtgcc cgccacagaa ctgggctcca 540

ccgagctggt gaccaccaag acagctggcc cagagcaata gcagcagtgg aggctggaac 600

ccagggatct ctactgggct tgtggacttc acccaacagc ttgggaaaga acttggccct 660

tcagtgacgg agtcctttgc ctgggggggcg aacccggcag aaccagacac tacaggccac 720

atgagattgc ttttgtgtta gctcttgact tgagaacgtt ccatttctga gatggttttt 780

aagcctgtgt gccttcagat ggttggatag acttgagggt tgcatattta atctctgtag 840

tgagtcggag actggaaact taatctcgtt ctaaaaattt tggattactg ggctggaggt 900

atggctcagc agttcggttt gtgtgctgtt ctagccgagg actccagttg ttcagcttcc 960

cggaactcag atctggcagc ttaagaccac ctgtcactcc agcccctgga acatccttgc 1020

ctccaaaggc accagcactc atttgctcta gagcacacac acacacacac acacacacac 1080

acacacacac acacacacat atgcatgcat gcacacttaa aaatgtcaaa attagcggct 1140

ggagaaattc atggtcaaca gcgcttactg tgattccaga ggatgagagt ttgattccca 1200

gaatgcactg cgggtggctc attactgagc ataacttttg cttcagggga cctgatgcct 1260

ctggacttca tgggcatctg tattcacgtg cacatcctac acacacacac acacacacac 1320

acagacatac acacacacac actcttttac aaatgataaa atataagata ggcatggtgg 1380

tacacacctt taatcccaac attggggaag caaaggcagg caggtaactg agttggaggc 1440

catcctggtc tacatagcaa gttccaggct aaccagagct aaatggtgag accaagtctc 1500

aaaataatac tccccccccа aaaaaaaaaa acttttaaat tttgattttt ttcttttatt 1560

attatttttt atattaattt catggtgttt agaagtggta tacttagatg gtgactaaga 1620

ggaggtaaag ccatcaggac tgagccccta acatacaagg agaaagcaga gacaatgaac 1680

acgcccctct cctgctgtgt gccagctctg gaccaccagc cagagggcaa tcatcagatg 1740

tgggccctag aaccttcaga gccgaaagct aaatcaatct catttctttg taaagctatt 1800

tagccttagg tgttttgtta cggtgatata aaatggacta acacaggcac tatgagtaag 1860

aagcttttct ttgagctggg aaaggtactg ttaaaccaaa attaatctga ataaaaaaag 1920

gctaagggga agacacttaa aaa 1943

<210> 9
<211> 175
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 9

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

Ser Val Pro Thr Gln Cys Asn Gln Thr Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val
            20                  25                  30

Arg Asn Cys Val Ser Cys Glu Leu Phe His Thr Pro Asp Thr Gly His
        35                  40                  45

Thr Ser Ser Leu Glu Pro Gly Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Gly Ser
    50                  55                  60

Ala Leu Arg Pro Asp Val Ala Leu Leu Val Gly Ala Pro Ala Leu Leu
65                  70                  75                  80

Gly Leu Ile Leu Ala Leu Thr Leu Val Gly Leu Val Ser Leu Val Ser
                85                  90                  95

Trp Arg Trp Arg Gln Gln Leu Arg Thr Ala Ser Pro Asp Thr Ser Glu
            100                 105                 110

Gly Val Gln Gln Glu Ser Leu Glu Asn Val Phe Val Pro Ser Ser Glu
        115                 120                 125

Thr Pro His Ala Ser Ala Pro Thr Trp Pro Pro Leu Lys Glu Asp Ala
    130                 135                 140

Asp Ser Ala Leu Pro Arg His Ser Val Pro Val Pro Ala Thr Glu Leu
145                 150                 155                 160

Gly Ser Thr Glu Leu Val Thr Thr Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln
                165                 170                 175
```

<210> 10
<211> 184
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

```
Met Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro
1               5                   10                  15

Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys
            20                  25                  30

Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala
        35                  40                  45
```

```
Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly
    50                  55                  60

Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Leu Pro Leu Pro Gly Leu Leu Phe Gly
65                  70                  75                  80

Ala Pro Ala Leu Leu Gly Leu Ala Leu Val Leu Ala Leu Val Leu Val
                85                  90                  95

Gly Leu Val Ser Trp Arg Arg Arg Gln Arg Arg Leu Arg Gly Ala Ser
            100                 105                 110

Ser Ala Glu Ala Pro Asp Gly Asp Lys Asp Ala Pro Glu Pro Leu Asp
        115                 120                 125

Lys Val Ile Ile Leu Ser Pro Gly Ile Ser Asp Ala Thr Ala Pro Ala
    130                 135                 140

Trp Pro Pro Pro Gly Glu Asp Pro Gly Thr Thr Pro Pro Gly His Ser
145                 150                 155                 160

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

Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln Gln
            180
```

<210> 11
<211> 963
<212> **ДНК**
<213> Homo sapiens

<220>
<221> **сиг_пептид**
<222> (1)..(63)
<223> **кодира сигнален пептид**

<220>
<221> misc_**характеристика**
<222> (64)..(66)
<223> **въвежда рестриктазно място**

<220>
<221> misc_**характеристика**
<222> (67)..(276)
<223> **кодира извънклетъчна област на** BAFF-R

<220>
<221> misc_**характеристика**
<222> (277)..(279)

<223> **въвежда рестриктазно място**

<220>
<221> misc_**характеристика**
<222> (280)..(960)
<223> **кодира човешки** IgG1 Fc

<400> 11
atggagacag acacactcct gttatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60

gacgtcaggc gagggccccg gagcctgcgg ggcagggacg cgccagcccc cacgccctgc 120

gtcccggccg agtgcttcga cctgctggtc cgccactgcg tggcctgcgg gctcctgcgc 180

acgccgcggc cgaaaccggc cggggccagc agccctgcgc ccaggacggc gctgcagccg 240

caggagtcgg tgggcgcggg ggccggcgag gcggcggtcg acaaaactca cacatgccca 300

ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc 360

aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc 420

cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 480

aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 540

gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 600

ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 660

gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 720

ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 780

gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ttggactccg acggctcctt cttcctctac 840

agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 900

atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tcccgggaaa 960

tga 963

<210> 12
<211> 320
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> **СИГНАЛ**
<222> (1)..(21)
<223> **сигнална последователност**

<220>
<221> MISC_ ХАРАКТЕРИСТИКА
<222> (22)..(22)
<223> **кодирана от област въвеждаща рестриктазно място**

<220>
<221> **ПЕПТИД**

<222> (23)..(92)
<223> BAFF-R **извънклетъчен домен**

<220>
<221> MISC_ХАРАКТЕРИСТИКА
<222> (93)..(93)
<223> **кодирана от област въвеждаща рестриктазно място**

<220>
<221> **ПЕПТИД**
<222> (94)..(320)
<223> **Човешки** IgG1 Fc

<400> 12

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Val Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg
20 25 30

Asp Ala Pro Ala Pro Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu
35 40 45

Leu Val Arg His Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro
50 55 60

Lys Pro Ala Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro
65 70 75 80

Gln Glu Ser Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Val Asp Lys Thr
85 90 95

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
100 105 110

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
115 120 125

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
130 135 140

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
145 150 155 160

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
165 170 175

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
180 185 190

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
195 200 205

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
210 215 220

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
225 230 235 240

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
245 250 255

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
260 265 270

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
275 280 285

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
290 295 300

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
305 310 315 320

<210> 13
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
1 5 10 15

Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys Val
20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
35 40 45

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

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 14
<211> 65
<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Gly Ala Arg Arg Leu Arg Val Arg Ser Gln Arg Ser Arg Asp Ser Ser
1 5 10 15

Val Pro Thr Gln Cys Asn Gln Thr Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg
20 25 30

Asn Cys Val Ser Cys Glu Leu Phe His Thr Pro Asp Thr Gly His Thr
35 40 45

Ser Ser Leu Glu Pro Gly Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Gly Ser Ala
50 55 60

Leu
65

<210> 15
<211> 73
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (1)..(1)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (2)..(2)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (5)..(5)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (6)..(6)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (7)..(7)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (10)..(10)
<223> **заместване**

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (12)..(12)
<223> заместване

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (15)..(15)
<223> заместване

<400> 15

Gly Ala Arg Arg Leu Arg Val Arg Ser Gln Arg Ser Arg Asp Ser Pro
1 5 10 15

Ala Pro Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg
20 25 30

His Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala
35 40 45

Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser
50 55 60

Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 16
<211> 73
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (1)..(1)
<223> заместване

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (2)..(2)
<223> заместване

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (10)..(10)
<223> заместване

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (12)..(12)
<223> заместване

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (15)..(15)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (16)..(16)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (17)..(17)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (20)..(20)
<223> **заместване**

<400> 16

Gly Ala Arg Arg Leu Arg Val Arg Ser Gln Arg Ser Arg Asp Ser Ser
1 5 10 15

Val Pro Thr Gln Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg
20 25 30

His Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala
35 40 45

Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser
50 55 60

Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 17
<211> 73
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (1)..(1)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (2)..(2)
<223> **заместване**

<220>

<221> **ВАРИАНТ**
<222> (5)..(5)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (6)..(6)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (7)..(7)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (10)..(10)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (12)..(12)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (15)..(15)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (16)..(16)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (17)..(17)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (20)..(20)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (22)..(22)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (23)..(23)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (24)..(24)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (29)..(29)
<223> **заместване**

<400> 17

Gly Ala Arg Arg Leu Arg Val Arg Ser Gln Arg Ser Arg Asp Ser Ser
1 5 10 15

Val Pro Thr Gln Cys Asn Gln Thr Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg
20 25 30

His Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala
35 40 45

Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser
50 55 60

Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 18
<211> 73
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (1)..(1)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (2)..(2)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (5)..(5)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (6)..(6)
<223> **заместване**

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (7)..(7)
<223> заместване

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (10)..(10)
<223> заместване

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (12)..(12)
<223> заместване

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (15)..(15)
<223> заместване

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (16)..(16)
<223> заместване

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (17)..(17)
<223> заместване

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (20)..(20)
<223> заместване

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (22)..(22)
<223> заместване

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (23)..(23)
<223> заместване

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (24)..(24)
<223> заместване

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (29)..(29)
<223> заместване

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (33)..(33)
<223> **заместване**

<400> 18

Gly Ala Arg Arg Leu Arg Val Arg Ser Gln Arg Ser Arg Asp Ser Ser
1 5 10 15

Val Pro Thr Gln Cys Asn Gln Thr Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg
20 25 30

Asn Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala
35 40 45

Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser
50 55 60

Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 19
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (22)..(22)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (23)..(23)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (24)..(24)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (29)..(29)
<223> **заместване**

<400> 19

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
1 5 10 15

Pro Cys Asn Gln Thr Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg His Cys Val
20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
35 40 45

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

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 20
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (22)..(22)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (24)..(24)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (29)..(29)
<223> **заместване**

<400> 20

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
1 5 10 15

Pro Cys Asn Pro Thr Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg His Cys Val
20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
35 40 45

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

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 21
<211> 70

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (22)..(22)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (23)..(23)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (29)..(29)
<223> **заместване**

<400> 21

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
1 5 10 15

Pro Cys Asn Gln Ala Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg His Cys Val
20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
35 40 45

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

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 22
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (22)..(22)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (29)..(29)
<223> **заместване**

<400> 22

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
1 5 10 15

Pro Cys Asn Pro Ala Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg His Cys Val
20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
35 40 45

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

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 23
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (23)..(23)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (24)..(24)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (29)..(29)
<223> **заместване**

<400> 23

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
1 5 10 15

Pro Cys Val Gln Thr Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg His Cys Val
20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
35 40 45

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

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 24

<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (23)..(23)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (29)..(29)
<223> **заместване**

<400> 24

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
1 5 10 15

Pro Cys Val Gln Ala Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg His Cys Val
20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
35 40 45

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

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 25
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (29)..(29)
<223> **заместване**

<400> 25

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
1 5 10 15

Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg His Cys Val
20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
35 40 45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala

50 55 60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 26
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (22)..(22)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (29)..(29)
<223> **заместване**

<400> 26

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
1 5 10 15

Pro Cys Asn Pro Ala Glu Cys Phe Asp Ser Leu Val Arg His Cys Val
20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
35 40 45

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

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 27
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (22)..(22)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (29)..(29)
<223> **заместване**

<400> 27

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
1 5 10 15

Pro Cys Asn Pro Ala Glu Cys Phe Asp Ala Leu Val Arg His Cys Val
20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
35 40 45

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

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 28
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (22)..(22)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (23)..(23)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (24)..(24)
<223> **заместване**

<400> 28

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
1 5 10 15

Pro Cys Asn Gln Thr Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys Val
20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
35 40 45

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

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 29
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (22)..(22)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (24)..(24)
<223> **заместване**

<400> 29

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
1 5 10 15

Pro Cys Asn Pro Thr Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys Val
20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
35 40 45

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

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 30
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (22)..(22)
<223> **заместване**

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (23)..(23)
<223> **заместване**

<400> 30

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
1 5 10 15

Pro Cys Asn Gln Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys Val
20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
35 40 45

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

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 31
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (23)..(23)
<223> **заместване**

<400> 31

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
1 5 10 15

Pro Cys Val Gln Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys Val
20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
35 40 45

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

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 32
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> **ВАРИАНТ**
<222> (22)..(22)
<223> **заместване**

<400> 32

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
1 5 10 15

Pro Cys Asn Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys Val
20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
35 40 45

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

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 33
<211> 21
<212> **ДНК**
<213> **Изкуствена секвенция**

<220>
<223> **Олигонуклеотиден праймер**

<400> 33
ggccgagtgc ttcgacctgc t 21

<210> 34
<211> 21
<212> **ДНК**
<213> **Изкуствена секвенция**

<220>
<223> **Олигонуклеотиден праймер**

<400> 34
ggtccgccac tgcgtggcct g 21

<210> 35
<211> 21
<212> **ДНК**
<213> **Изкуствена секвенция**

<220>
<223> **Олигонуклеотиден праймер**

<400> 35
caccaagacg gccggccctg a 21

<210> 36
<211> 21
<212> **ДНК**
<213> **Изкуствена секвенция**

<220>
<223> **Олигонуклеотиден праймер**

<400> 36
gggcgcctac aatctcagct a 21

<210> 37
<211> 25
<212> **ДНК**
<213> **Изкуствена секвенция**

<220>
<223> **Олигонуклеотиден праймер**

<400> 37
ggcggaccag caggtcgaag cactc 25