

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) BG

(11) 105674A

(51) Int.Cl.

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ

C12N 15/11 C07K 14/705

ЗА

A61K 38/17 A61K 39/395

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

<p>(21) Заявителски № 105674 (22) Заявено на 05.07.2001 (24) Начало на действие на патента от:</p> <p style="text-align: center;">Приоритетни данни</p> <p>(31) 09/226,533 (32) 07.01.1999 (33) US</p> <p>(41) Публикувана заявка в бюлетин № 3 29.03.2002 (45) Отпечатано на (46) Публикувано в бюлетин № на (56) Информационни източници:</p> <p>(62) Разделена заявка от рег. №</p>	<p>(71) Заявител(и): ZYMOGENETICS, INC. , , 98102 SEATTLE , 1201 EASTLAKE AVENUE EAST WASHINGTON (US) ; (72) Изобретател(и): GROSS , Jane A . , 98125 Seattle WASHINGTON (US) ; XU , Wenfeng . , 98275 Mukilteo WASHINGTON (US) ; MADDEN , Karen L . , 98004 Bellevue WASHINGTON (US) ; YEE , David P . , 44120 Shaker Heights OHIO (US) ; (74) Представител по индустриална собственост: Борислав Цветков Боянов , 1463 София , бул. "Патриарх Евтимий" 82</p> <p>(86) № на PCT заявка: PCT/ US2000 / 000396 , 07.01.2000 (87) № и дата на PCT публикация: WO2000 / 040716 , 13.07.2000</p>
--	--

(54) РАЗТВОРИМ РЕЦЕПТОР BR43X2 И МЕТОДИ ЗА ИЗПОЛЗВАНЕТО МУ

(57) Изобретението се отнася до разтворими, секретирани полипептиди на рецептора за туморно-некротичен фактор, както и до полинуклеотиди, кодиращи полипептидите, и до свързани с тях състави и методи. Полипептидите могат да бъдат използвани за откриване на лиганди, агонисти и антагонисти, както и да се прилагат в методи, модулиращи B клетъчна активация. Изобретението се отнася и до методи за инхибиране на ztnf4 активност при бозайници, включващи прилагането на определено количество съединение, избрано от групата, състояща се от полипептид, съдържащ извънклетъчен домен на BR43x2, TAC1 или BCMA. Изобретението включва и методи за получаване на полипептиди. Полипептидите съдържат едно цистеиново повторение, което е хомолог на други рецептори за туморно-некротичен фактор, такива като трансмембранен активатор и CAML-интегратор (TAC1). 33 претенции

BG 105674 A

РАЗТВОРИМ РЕЦЕПТОР BR43x2 И МЕТОДИ ЗА ИЗПОЛЗВАНЕТО МУ

ОБЛАСТ НА ПРИЛОЖЕНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО И ПРЕДШЕСТВАЩО СЪСТОЯНИЕ НА ТЕХНИКАТА

Клетъчните взаимодействия, които се наблюдават по време на имунния отговор, са регулирани от членове на няколко фамилии на клетъчно повърхностни рецептори, включващи фамилията на туморния некротичен факторен рецептор (TNFR). TNFR фамилията съдържа определен брой интегрални мембранно гликопротеинови рецептори, много от които са свързани с техните съответни лиганди и регулират взаимодействията между различните хематопоеични клетъчни линии (Smith et al., *The TNF Receptor Superfamily of Cellular and Viral Proteins: Activation, Costimulation and Death*, 76:959-62, 1994; Cosman, *Stem Cells* 12:440-55, 1994).

Такъв един рецептор е TACI, трансмембранен активатор и CAML-интерактор (von Bulow and Bram, *Science* 228:138-41, 1997 и PCT публикация на WO 98/39361). TACI е мембранно свързващ рецептор с извънклетъчен домен, съдържащ две цистеинови псевдо повторения, трансмембранен домен и цитоплазмен домен, който взаимодейства с CAML (калциев модулатор и циклофилинов лиганд), неделим мембранен протеин, разположен върху вътреклетъчни везикули, който е ко-стимулатор на NF-AT активация при свръхекспресиране в клетки на Jurkat. TACI е свързан с В клетки и конфигурация от Т клетки. Bulow and Bram посочват, че не е известен лиганд за TACI.

Установено е, че полипептидите съгласно настоящото изобретение, TACI изоформа само с едно цистеиново псевдо повторение (BR43x2), TACI и съответния В клетъчен протеин, BCMA (Gras et al., *Int.Immunol.* 17:1093-106, 1995) се свързват към TNF лиганд, ztnf4, сега известно като неутрокин (PCT публикация, WO98/18921), BlyS (Moore et al., *Science*, 285:260-3, 1999), BAFS (Schneider et al., *J. Exp. Med.* 189&1747-56, 1999) TALL-1 (Shu et al., *J. Leukoc.*

Biol. 65:680-3, 1999) или THANK (Mukhopadhyay et al., J.Biol. Chem. 274:15978-81, 1999). Както BR43x2, TACI, така и BCMA могат да се използват за регулиране в частност на активността на *ztnf4* при активацията на В клетки.

В тази връзка настоящото изобретение предлага лечебни средства за модулиране на активността на *ztnf4* или други BR43x2, TACI или BCMA лиганди, съответните им състави и методи както и други употреби, които ще станат очевидни за специалиста в областта от обясненото тук.

СЪЩНОСТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

В един от аспектите си изобретението се отнася до метод за инхибиране на *ztnf4* активност при бозайници, включващ прилагането на определено количество съединение, избрано от групата, състояща се от: а) полипептид, съдържащ извънклетъчен домен на BR43x2; б) полипептид, съдържащ извънклетъчен домен на TACI; в) полипептид, съдържащ извънклетъчен домен на BCMA; г) полипептид с последователност от SEQ ID NO:10; д) антитяло или фрагмент от антитяло, което се свързва специфично с полипептид от SEQ ID NO:2; е) антитяло или фрагмент от антитяло, което се свързва специфично с полипептид от SEQ ID NO:4; ж) антитяло или фрагмент от антитяло, което се свързва специфично с полипептид от SEQ ID NO:6; з) антитяло или фрагмент от антитяло или фрагмент от антитяло, които се свързват специфично с полипептид от SEQ ID NO:8; и антитяло или фрагмент от антитяло, което се свързва специфично с полипептид от SEQ ID NO:10; к) полипептид с последователност от SEQ ID NO:4; л) аминокиселинни остатъци 1-166 на SEQ ID NO:6; и м) аминокиселинни остатъци 1-150 на SEQ ID NO:8.

В едно от изпълненията съединението е съставено от протеин, съдържащ първа част и втора част, свързани чрез пептидна връзка, като първата част съдържа полипептид, избран от групата, съдържаща :а) полипептид с последователност от SEQ ID NO:8; б) полипептид съдържащ аминокиселинни остатъци 25-58 на SEQ ID NO:2; в) полипептид съдържащ аминокиселинни остатъци 34-66 на SEQ ID NO:6; г) полипептид съдържащ аминокиселинни

остатъци 71-104 на SEQ ID NO:6; д) полипептид съдържащ аминокиселинни остатъци 25-104 на SEQ ID NO:6; е) полипептид съдържащ аминокиселинни остатъци 8-37 на SEQ ID NO:8; ж) полипептид съдържащ аминокиселинни остатъци 41-88 на SEQ ID NO:8; з) полипептид съдържащ аминокиселинни остатъци 8-88 на SEQ ID NO:8; и така наречената втора част съдържа друг полипептид. В друго изпълнение първата част допълнително съдържа полипептид, избран от групата , съдържаща: а) аминокиселинни остатъци 59-120 на SEQ ID NO:2; б) аминокиселинни остатъци 105-166 на SEQ ID NO:6; в) аминокиселинни остатъци 89-150 на SEQ ID NO:8. Според друго изпълнение първата част е избрана от групата съдържаща : а) полипептид съдържащ извънклетъчния домен на BR43x2; б) полипептид съдържащ извънклетъчния домен на TACL; в) полипептид съдържащ извънклетъчния домен на ВСМА.

В съответно изпълнение първата част е избрана от групата съдържаща : а) полипептид с последователност от SEQ ID NO:4; б) аминокиселинни остатъци 1-154 на SEQ ID NO:6; и в) полипептид съдържащ аминокиселинни остатъци 34-66 на SEQ ID NO:6; г) аминокиселинни остатъци 1-48 на SEQ ID NO:8. В друга съотносимо изпълнение втората част е имуноглобулинова тежко верижна константна област.

В друго изпълнение антицялото или фрагмента от антицяло е избрано от групата съдържаща: а) поликлонално антицяло; б) мурин моноклонално антицяло; в) хуманизирано антицяло получено от б) и г) човешко моноклонално антицяло. В съответно изпълнение фрагментът от антицяло е избран от групата, съдържаща F(ab', F(ab), Fab', Fab, Fv, scFv и минимално различаваща се частичка. В друга изпълнение бозайникът е примат.

В друго изпълнение *ztnf4* активността е свързана с В лимфоцити. В друго съответно изпълнение *ztnf4* активността е свързана с активирани В лимфоцити. В едно друго изпълнение *ztnf4* активността е свързана с остатъци В лимфоцити. В друго изпълнение *ztnf4* активността е свързана с продукцията на антицела. В друго изпълнение антицяло продукцията е свързана с

автоимунна болест. В друго изпълнение автоимунната болест е системен еритроматозен лупус, миастения гравис, мултиплетна склероза или ревматоиден артрит. В друго изпълнение *ztnf4* активността е свързана с астма, бронхит или емфизем. В друго изпълнение *ztnf4* активността може да е свързана с краен стадий на бъбречна недостатъчност. В съвсем друго изпълнение *ztnf4* активността е свързана с бъбречно заболяване. В съответното изпълнение бъбречното заболяване може да бъде гломерулонефрит, васкулит, нефрит или пиелонефрит. В едно друго изпълнение бъбречното заболяване е свързано с бъбречна неоплазма, мултиплетен миелом, лимфом, светло верижна невропатия или амилоидоза. В друго изпълнение *ztnf4* активността е свързана с Т клетъчен ефектор. В съответно изпълнение *ztnf4* активността е свързана с регулиращ имунен отговор. В едно друго изпълнение *ztnf4* активността е свързана с имunosупресия. В друго изпълнение имunosупресията е свързана с отхвърляне при трансплантация, множество трансплантационни заболявания или възпаления. В друго изпълнение *ztnf4* активността е свързана с автоимунно заболяване. В съответно изпълнение автоимунното заболяване е инсулинзависим диабетен мелитус или болест на Крон. В друго изпълнение *ztnf4* активността е свързана с възпаление. В съответно изпълнение възпалението е свързано със ставна болка, гълтане, анемия или септичен шок. В друг аспект изобретението се отнася до метод за инхибиране на BR43x2, TAC1 или BCMA рецептор-лигандни прояви, включващи прилагане на определено количество съединение както е описано по-горе. В друго изпълнение BR43x2, TAC1 или BCMA рецептор-лигандната проява е свързана с В лимфоцити. В друго съответно изпълнение BR43x2, TAC1 или BCMA рецептор-лигандната проява е свързана с активирани В лимфоцити. В едно друго изпълнение, BR43x2, TAC1 или BCMA рецептор-лигандната проява е свързана с оставащи В лимфоцити.

В друго изпълнение, BR43x2, TAC1 или BCMA рецептор-лигандната е свързана с антитяло продукция. В съответно изпълнение антитяло

продукцията е свързана с автоимунна болест. В съответно изпълнение автоимунната болест е системен еритроматозен лупус, миастения гравис, мултиплетна склероза или ревматоиден артрит. В друго изпълнение BR43x2, TAC1 или BCMA рецептор-лигандната проява е свързана с астма, бронхит или емфизем. В друго изпълнение BR43x2, TAC1 или BCMA рецептор-лигандната проява може да е свързана с краен стадий на бъбречна недостатъчност. В съвсем друго изпълнение BR43x2, TAC1 или BCMA рецептор-лигандната проява е свързана с бъбречно заболяване. В съответното изпълнение бъбречното заболяване може да бъде гломерулонефрит, васкулит, нефрит или пиелонефрит. В още друго изпълнение бъбречното заболяване е свързано с бъбречна неоплазма, мултиплетен миелом, лимфом, светло верижна невропатия или амилоидоза. В друго изпълнение BR43x2, TAC1 или BCMA рецептор-лигандната проява е свързана с T клетъчен ефектор. В съответно изпълнение BR43x2, TAC1 или BCMA рецептор-лигандната проява е свързана с регулиращ имунен отговор. В още по- друго изпълнение активността е свързана с имуносупресия. В друго изпълнение имуносупресията е свързана с отхвърляне при трансплантация, множество трансплантационни заболявания или възпаления. В друго изпълнение активността е свързана с автоимунно заболяване. В съответно изпълнение автоимунното заболяване е инсулинозависим диабетен мелитус или болест на Крон. В друго изпълнение BR43x2, TAC1 или BCMA рецептор-лигандната проява е свързана с възпаление. В съответно изпълнение възпалението е свързано със ставна болка, гълтане, анемия или септичен шок.

В друг аспект изобретението се отнася до изолирана полинуклеотидна молекула, кодираща полипептид от SEQ ID NO:2. Отнася се също до изолирана полинуклеотидна молекула от SEQ ID NO:1. В съответно изпълнение осигурява експресивен вектор, съдържащ следващите действащи свързващи елементи: транскрибиращ промотер; полинуклеотидна молекула както е описано по- горе и транскрибиращ терминатор. В друго изпълнение експресивният вектор допълнително съдържа секреторна рецептор- лигандна

последователност, свързана действащо към полинуклеотидната молекула. Отнася се също и до културална клетка, в която е въведен експресивен вектор, както е описано по-горе, където културалната клетка проявява полипептидното кодиране чрез полинуклеотидният сегмент.

Изобретението освен това се отнася и до метод за получаване на полипептид, включващ: културиране на клетка, в която се вкарва експресивен вектор както е описано по-горе; чрез тази клетка се извършва полипептидното кодиране чрез полинуклеотидна молекула; и възстановяване на експресирания полипептид. Изобретението се отнася и до изолиран полипептид с последователност SEQ ID NO:2. В съответно изпълнение полипептидът е в комбинация с фармацевтично приемлив носител.

КРАТКО ОПИСАНИЕ НА ФИГУРИТЕ

Фигура 1 показва многочислена аминокиселинна последователност намираща се между BR43x2, TAC1 (von Bulow and Bram, *ibid.*)(SEQ ID NO:6), BCMA(Gras et al., *ibid.*)(SEQ ID NO:6) и BR43x1 (SEQ ID NO:7). Отбелязани са цистеиновите псевдо отговори и трансмембранный домен.

Фигура 2 показва диаграмни анализи на разтворим I¹²⁵- ztnf4 свързване към TAC1 и BCMA експресирани чрез стабилни ВНК трансфектанти.

Фигура 3А показва ztnf4 ко-активиращи човешки В лимфоцити да полиферират и секретират имуноглобулини.

Фигура 3В показва степени на IgM и IgG стойности в супернатанти, получени от В клетки, стимулирани с разтворим ztnf4 в присъствие на IL4 или IL4+ IL5 след 9 дни в култура.

Фигура 4 показва човешки периферно кръвни В клетки стимулирани с разтворим ztnf4 или контролен протеин в присъствие на IL4 за 5 дни и вито Пречистен TAC1-Ig, BCMA-Ig и контролен Fc са изследвани за инхибиране на ztnf4 специфична полиферация.

Фигура 5А показва резултати от ztnf4 трансгенни животни, които развиват SLE -характеристики.

Фигура 5B показва лимфен възел, далачни и тимусни клетки от *ztnf4* трансгенни животни белязани с антитела към CD5, CD4 и CD8.

Фигура 5C показва общи IgM, IgG и IgE нива в серум от трансгенни *ztnf4* животни, разпределени от 6 до 23 седмична възраст.

Фигура 5D показва амилоидно отстраняване и изтънен мезангиум на гломерула, идентифицирано в бъбречна секция от *ztnf4* трансгенни животни.

Фигура 5E показва Т ефекторни клетки в *ztnf4* трансгенна мишка.

Фигура 6A и B показват високи *ztnf4* нива в серум, получен от ZNBWFl мишки и MRL/lpr/lpr мишки, които са съпоставими с развитие на SIE.

Фигура 7 показва процента на NZBWFl мишки, които развиват протеинурия по време на курса на изследване.

Фигура 8 показва анти- dsDNA нива по ELISA от *ztnf4* трансгенни мишки и контролния титър в сравнение със серум от ZNBWFl и MRL/lpr/lpr мишки.

Тези и други аспекти на изобретението ще станат ясни след обясненията на следващото подробно описание.

ПОДРОБНО ОПИСАНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Преди да се поясни същността на изобретението, може би е полезно да се представят дефинициите на определени термини, използвани по-нататък:

Афинитетен таг: използва се за означаване на полипептиден сегмент, който може да се прикрепя към втори полипептид, за да осигури пречистване или откриване на втори полипептид или да осигури места за прикрепяне на втория полипептид към субстрата. По принцип всеки пептид или протеин, който е използваем за антитяло или друг специфично свързващ агент, може да се използва като афинитетен таг. Афинитетни тагове включват полихистидинов тракт, протеин А (Nilsson et al., EMBO J. 4:1075, 1985; Nilsson et al., Methods Enzymol. 198:3, 1991) глутатион S трансфераза (Smith and Johnson, Gene 67:31, 1988), Glu-Glu афинитетен таг (Grussenmeyer et al., Proc.Natl.Acad. SCIUSA 82:7952-4,1985), субстанция Р, Flag™ пептид (Hopp et al., Biotechnology 6:1204-10, 1988), стрептавидин свързващ пептид или друг

антигенен епитоп или свързващ домен. Най-общо е описано при Ford et al., Protein expression and Purification 2:95-107,1991. DNAs кодиращи афинитетни тагове са достъпни от търговските снабдители (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

Алелов вариант: Всяка от две или повече алтернативни форми на ген, снабдяваща едно и също хромозомно място. Алелов вариант се появява спонтанно чрез мутация и може да резултира във фенотипен полиморфизъм в популациите. Генните мутации могат да бъдат незабележими (например без промяна в кодирането на полипептидите) или могат да кодират полипептиди с променлива аминокиселинна последователност. Терминът "алелов вариант" също се използва за означаване на протеин, кодиран чрез алелов вариант на ген. Също включен е същият протеин от същите видове, който се различава от описаната аминокиселинна последователност по отношение на алеловия вариант. Алеловият вариант се отнася до природно случващите се различия между индивидите при генното кодиране на даден протеин.

Амино-терминал и карбокси-терминал: използват се за означаване на позиции в полипептиди и протеини. Когато контекстът позволява, тези термини се използват в описание на частни последователности или части на полипептид или протеин за означаване на близостта или съответната позиция. Например, известна последователност поставя карбоксилен терминал към описана последователност в протеин, разположена близо до карбоксилния терминал на описаната последователност, но не обезателно върху карбоксилния терминал на целия протеин.

Двойка комплемент/ антикомплемнт: Определени неидентични общности, които формират не-ковалентно свързване, стабилна двойка при определени условия. Например, биотин и авивин (или стрептавидин) са прототипични членове на комплемент/анти-комплемнт двойка. Други примерни комплемент/антикомплемнт двойки включват рецептор/лиганд двойка, антитяло/антиген (или хаптен или епитоп) двойка, чувствителна/нечувствителна полинуклеотидна двойка и други. Когато е

желателна последователностната дисоциация на комплемент/алтикомплементната двойка, то двойката комплемент/алтикомплемент за предпочитане има свързваща активност $< 10^{-9}M$.

Допирен: Означава полинуклеотид, който има близко напрежение на идентична или комплементарна последователност към друг полинуклеотид. Допирни напрежения са такива, които частично покриват дадено напрежение на полинуклеотидна последователност, както в тяхната цялост или по отношение на частично напрежение на полинуклеотидите. Например, представители на допирен към полинуклеотидна последователност са 5'ATGGCTTAGCTT-3' са 5'-TAGCTTgagtct-3' 3'-gtcgacTACCGA-5'.

Комплементи или полинуклеотидни молекули: Означава полинуклеотидни молекули с комплементарна основна последователност и обратна ориентация в сравнение с описаната последователност. Например, последователността 5'ATGCACGGG 3' е комплементарна на 5'CCCGTGCAT 3'.

Дегенеративна нуклеотидна последователност или дегенеративна последователност: означава последователност на нуклеотиди, която включва един или повече дегенеративни кодона (в сравнение с описаната полинуклеотидна молекула, която кодира полипептида.). Дегенеративните кодони съдържат различни тройки нуклеотиди, но кодират един и същ аминокиселинен остатък (например GAU и GAC тройки всяка кодира Asp).

Експресионен вектор: за описанието се предлага DNA молекула, линейна или кръгова, която съдържа сегмент, който кодира полипептид, полезно действащо свързан към допълнителни сегменти. Такива допълнителни сегменти могат да включват промотер и терминаторна последователност и по избор един или повече оригинала или копия, един или повече избрани маркери, усилвател, полиаденилативен сигнал и други. Експресивните вектори са общо произхождащи от плазмид или вирусна DNA или могат да съдържат елементи от двете.

Изоформа: Отнася се до различни форми на протеин, който може да бъде получен от различни гени или от същия ген чрез редуващо се

разрастване. В някои случаи изоформите се различават по тяхната транспортна активност, време на експресия при развитие, тъканно разпределение, локализация в клетката или комбинация от тези свойства.

Изолирани полинуклеотиди: Означава, че полинуклеотидът е отместен от неговата естествена генетична среда и той е свободен от други извънредни или нежелани кодиращи последователности и е във форма, подходяща за използване в най-общо конструирани протеинови системи. Такива изолирани молекули са такива, които са отделени от тяхната природна среда и включват cDNA и геномни клона. Изолираните DNA молекули съгласно настоящото изобретение са освободени от други гени, с които те обикновено се свързват, но могат да включват природно срещащи се 5' и 3' неизяснени региони, такива като промотери и терминатори. Идентификацията на свързаните региони е очевидна за всеки от специалистите в областта на техника (например Dylan and Titan, Nature 316:774-78,1985).

Изолиран полипептид или протеин: това е полипептид или протеин, който е намерен при условие, различно от неговата околна среда, такива като кръв и животинска тъкан. В препоръчителна форма, изолираният полипептид е по същество освободен от други полипептиди, в частност други полипептиди от животински органи. Препоръчително е да се осигуряват пречистени във висока степен полипептиди, т.е. повече от 95 % чистота, още по-добре повече от 99% чистота. Когато се използва в контекст терминът "изолиран", той не включва присъствие на същия полипептид в алтернативна физическа форма, като димер или по желание гликозилирана или производна форма.

Действащо свързан: Както е приложен към нуклеотидните сегменти, терминът "действащо свързан" показва, че сегментите са аранжирани така, че те функционират в съгласие с тяхната желана цел, например транскрипцията започва в промотера и преминава през кодиращите сегменти до терминатора.

Ортолог: Означава полипептид или протеин, получен от един вид, който е функционално копие на полипептид или протеин от различен вид. Различията в последователностите между ортологове са резултат от видовете.

Полинуклеотид: означава единичен или двоен нишковиден полимер или дезоксирибонуклеотидна или рибонуклеотидна база от 5' до 3' окончания. Полинуклеотидите включват RNA и DNA и могат да бъдат изолирани от природни ресурси, синтезирани *in vitro* или получени от комбинация от природни и синтетични молекули. Размерите на полинуклеотиди са показани като основни двойки (отбелязани като "bp"), нуклеотиди ("nt") или килобази ("kb"). Където позволява контекстът, последните два термина могат да бъдат описани, като единично-нишковидни или двойно нишковидни полинуклеотиди. Когато терминът се прилага към двойно нишковидни молекули, той се използва да покаже свръх дължина и ще бъде разбран като еквивалентен на термина "основни двойки". Той се приема от специалист в тази областта на техниката като двете нишки на двойно-нишковиден полинуклеотид могат да се различават слабо по дължина и краищата им могат да се колебаят в резултат на ензимно разцепление; така всички нуклеотиди в двойно-нишковидна полинуклеотидна молекула могат да не бъдат по двойки. Такива не групирани по двойки краища най-общо няма да надхвърлят 20 nt дължина.

Полипептид: Това е полимер от аминокиселинни остатъци, присъединен чрез пептидна връзка, който е получен или природно или синтетично. Полипептиди с по-малко от около 10 аминокиселинни остатъка най-общо са означени като пептиди.

Промотор: Означава част от ген, съдържащ DNA последователности, които се използват за свързване на RNA полимеразата и начало на транскрипция. Промоторните последователности са най-общо, но не винаги, установени в 5' некодирани региони на гени.

Протеин: е макромолекула, съдържаща една или повече полипептидни вериги. Протеин може да съдържа също непептидни компоненти, такива като карбохидратни групи. Карбохидрати и други не-пептидни заместители могат да се добавят към протеин чрез клетката, от която протеинът е получен и ще варира от вида клетка. Протеините се определят от техните основни

аминокиселинни структури; заместители като карбохидратни групи са най-общо не-специфицирани, но понякога могат да присъстват.

Рецептор: Клетъчно свързан протеин или полипептидно подразделение на такъв протеин, който се свързва към биоактивна молекула ("лиганд") и предизвиква ефект на лиганд върху клетката. Свързване на лиганд към рецептор предизвиква промяна в рецептора (в някои случаи рецептор мултимеризация, например свързване на идентични или различни рецепторни подразделения), който предизвиква взаимодействия между ефекторни домен(и) на рецептора и друга(и) молекула(и) в клетката. Тези взаимодействия обратно водят до изменения в метаболизма на клетката. Метаболитните явления, които са свързани с рецептор-лигандни взаимодействия, включват генна транскрипция, фосфорилация, дефосфорилация, клетъчна пролиферация, повишаване на цикличната АМР продукция, мобилизация на клетъчния калций, мобилизация на мембранните липиди, клетъчна адхезия, хидролиза на инозитол липиди и хидролиза на фосфолипиди. BR43x2 има характеристики на TNF рецептори, както са разисквани по-подробно тук.

Секреторна сигнална последователност: DNA последователност, която кодира полипептид("секреторен пепетид"), който като компонент на обширен полипептид, води обширния полипептид през секреторен проход на клетка, в която е синтезиран. Обширният полипептид е най-общо разцепен до отделяне на секреторен пептид по време на преминаване през секреторния проход.

Разтворим рецептор: Рецепторен полипептид, който не е свързан към клетъчна мембрана. Разтворими рецептори са най-общо лиганд-свързващи рецепторни полипептиди, които губят трансмембранни и цитоплазмени домени. Разтворими рецептори могат да съдържат допълнителни аминокиселинни остатъци, като афинитетни тагове, които осигуряват пречистването на полипептидите или осигуряват метата за прикрепване на полипептидите към субстрата. Много клетъчно-повърхностни рецептори имат природен произход, разтворими копия, които са получени чрез протеолиза или преместени от алтернативно съединени mRNA. Рецепторните полипептиди са

по същество освободени от трансмембранны и вътреклетъчни полипептидни сегменти, когато те губят специфични части от тези сегменти, за да осигурят мембранни приспособления или съответно сигнална трансдукция.

Молекулните тегла и дължини на полимери, определени чрез импресивни аналитични методи (гел електрофореза), имат приблизителни стойности. Когато такава стойност се представя като "около" X или "приблизително" X, трябва да се разбира, че точната стойност на X е $\pm 10\%$.

Всички споменати препратки са включени изцяло в същността.

Настоящото изобретение се базира в частност на откриването на 1192 вр DNA последователност (SEQ ID NO:1) и съответстващата полипептидна последователност (SEQ ID NO:2), която е изоформа на рецептор TAC1. Изоформата е описана като BR43x2. Разтворима форма BR43x2 е разкрита като последователност SEQ ID NO:4, полипептидно кодиране на разтворим рецептор в SEQ ID NO:3. Както е описано по-подробно тук, BR43x2 рецептор-кодиращи полинуклеотид и полипептиди съгласно настоящото изобретение, отначало са идентифицирани чрез сигнален търсещ клонинг чрез RPMI 1788 библиотека от човешки материал и N- или C- краен FLAG-таг, биотин или FITC-белязан туморен некрозен фактор-лиганд ztnf4, сега известен като неврокинин α (WIPO WO98/18921), Blys (Moore et al.), BASF (Schneider et al.) TALL-1 (Shu et al.,) или THANK (Mukhopadhyay et al.,). Положителните места се определят чрез лигандно свързване, прекъсвано до единични клонове, изолиран cDNA и включен в последователност. При сравнение на BR43x2 извадена аминокиселинна последователност (както е представена в SEQ ID NO:2) с известни туморно некротни факторни рецептори показват, че BR43x2 е изоформа на TAC1 с единичен, лошо съхранен цистеинов псевдо-отговор.

Структурно TNF рецепторната фамилия се характеризира с извънклетъчна част, съставена от няколко модула, наречени исторически "цистеинови псевдо-повторения". Прототипичен TNFR фамилен член има четири от тези псевдо-повторения, всяко с около 29-43 остатъка дължина,

точно един след друг. Типично псевдо- повторение има 6 цистеинови остатъка. Те са наречени псевдо-повторения, въпреки че изглежда, че произлизат от общ наследствен модул, те не се повтарят точно: псевдо повторения #1, #2, #3 и #4 имат характеристични последователностни признаци, които ги различават един от друг. Кристалната структура на р55 TNF рецептор показва, че всяко псевдо- повторение кореспондира с един съгващ се домен и затова всички четири псевдо- повторения се включват в същата терциерна структура, държаща ги заедно вътрешно чрез дисулфидни връзки.

TAC1 съдържа две цистеинови псевдо- повторения (Bulow and Bram,...), като първото е запазено в структура с други членове на TNF рецепторната фамилия, второто повторение е по-малко съхранено. BR43x2 изоформата съгласно настоящото изобретение губи първото TAC1 цистеинов псевдо-повторение, оставяйки само второто, по- слабо съхранено повторение.

Анализът на последователността на разцепената аминокиселинна последователност на BR43x2, както е представена в SEQ ID NO:2, показва присъствие на развит протеин с външноклетъчен домен (остатъци 1-120 от SEQ ID NO:2), който съдържа едно цистеиново псевдо- повторение (остатъци 25-58 от SEQ ID NO:2), трансмембранен домен (остатъци 121-133 от SEQ ID NO:2) и цитоплазмен домен (остатъци 134-247 от SEQ ID NO:2). Цистеиновото псевдо- повторение на BR43x2 има съхранени цистеинови остатъка (остатъци 25, 40, 43, 47, 54, и 58 на SEQ ID NO:2), съхранен аспартатно киселинен остатък (остатък 34 на SEQ ID NO:2) и два съхранени левцинови остатъка (остатъци 36 и 37 на SEQ ID NO:2) и разделя 46% от идентичността си с първото цистеиново псевдо- повторение на TAC1 (SEQ ID NO:6) и 35% от идентичността си с цистеиново псевдо-повторение на BCMA (SEQ ID NO:8) (Фигура 1). Цистеиново псевдо- повторение може да бъде представено по следния начин:

CX[QEK][QEKNRDHS][QE]X{0-2}[YFW][YFW]DXLLX{2}C[IMLV]XCX{3}
CX{6-8}CX{2}[YF]C (SEQ ID NO:10),

Където С представлява аминокиселинен остатък на цистеин, Q - глутамин, E - глутаминова киселина, K - лизин, N - аспарагин, R- аргинин, D - аспартанова киселина, H- хистидин, S- серин, Y- тирозин, F--фенилаланин, W- триптофан, L-левцин, I-изолевцин, V-валин и X- представлява всеки природно явяващ се аминокиселинен остатък, вариант на тази позиция. Номерът в скоби {} показва аминокиселинните остатъци на тази позиция.

Настоящото изобретение също представя разтворими полипептиди на 32 до 40 аминокиселинни остатъка в дължина както е представено с SEQ ID NO:10.

Разтворимият BR43x2 рецептор, както е представен чрез остатъци 1-120 на SEQ ID NO:4, съдържа едно цистеиново псевдо- повторение (остатъци 2-58 на SEQ ID NO:4) и губи транс мембранен и цитоплазмен домени на BR43x2, както е описан в SEQ ID NO:2.

Специалист в областта ще разпознае, че тези граници на домени са приблизителни и се базират на постановки с известни протеини и предположение на протеинни нагъвания. Тези свойства показват, че рецепторът, кодиран чрез DNA последователности на SEQ ID №1 и №3, е член на TNF рецепторната фамилия.

Северен блот и дот-блот анализ на тъканно пренасяне на mRNA, съответстващи на нуклеотидни проби към BR43x2, които се предполага, че откриват BR43x2 експресия, показват експресия при далак, лимфен възел, CD19+ клетки, отслабени в смес лимфоцитна реакция клетки, Daudi и Raji клетки. Използвайки обратна транскриптаза PCR BR43x2 се открива само в В клетки и не се откриват в активирани Т клетки, както е съобщено за TAC1 (Vulow и Bram). Чрез използване на BR43x2 проба, която се покрива 100% със съответната TAC1 последователност, TAC1 и BR43x2 се откриват в далак, лимфен възел и тънките черва, стомах, слюнна жлеза, апендикс, бели дробове, костен мозък, ембрионален далак, CD19⁺ клетки, и Raji клетки .

Използвайки Южен блот анализ, ВСМА се открива в тънки черва, далак, стомах, дебело черво, апендикс, лимфен възел, трахея и тестис. ВСМА също се

открива в аденолимфом, не- Хочкинов лимфом и паротиден тумор, открит точно в CD 8⁺, CD19⁺, MLR клетки, Daudi, Raji и Hut 78 клетки.

Северен блот анализ се извършва също чрез муринов ztnf4(SEQ ID NO:19) и подобни човешки TACL, BCMA и BR43x2, като се открива муринова ztnf4 експресия преимуществено в далак и тимус. Муринов ztnf4 се проявява в бял дроб и конкретна експресия е открита в кожа и сърце.

Настоящото изобретение се отнася също до полинуклеотидни молекули, включващи DNA и RNA молекули, които кодират BR43x2 полипептиди разкрити тук. Специалистите в областта лесно ще различат, че по отношение на дегенерацията на генетичния код е възможна значителна вариация в последователността между тези полинуклеотидни молекули. SEQ ID NO:11 е дегенеративна DNA последователност, която обхваща всички DNA, които кодират разтворимия BR43x2 полипептид на SEQ ID NO:4. Подобно SEQ ID NO:12 е дегенеративна DNA последователност, която обхваща всички DNA, които кодират BR43x2 полипептид на SEQ ID NO:2. Специалистите в областта ще разпознаят, че дегенеративната последователност на SEQ ID NO:12 също осигурява всички RNA последователности, кодиращи SEQ ID NO:4 чрез заместване на U за T. По този начин BR43x2 полипептид-кодиращи полинуклеотиди, съдържащи нуклеотид от 1 до 360 на SEQ ID NO:11, нуклеотид от 1 до 741 на SEQ ID NO:12 и техните RNA еквиваленти са предвидени в настоящото изобретение. Таблица 1 представя еднобуквени кодове, използвани в SEQ ID NO:11 и 12 за означаване на дегенеративни нуклеотидни позиции. "Решенията" са нуклеотиди, означени чрез еднобуквен код. "Комплемент" означава кода за допълнителни нуклеотиди. Например кодът Y означава също C или T, а неговият комплемент R означава A или G, A като допълнителен на T и G като допълнителен на C.

ТАБЛИЦА 1

Нуклеотид	Решение	Комплемент	Решение
A	A	T	T
C	C	G	G
G	G	C	C
T	T	A	A
R	A G	Y	C T
Y	C T	R	A G
M	A C	K	G T
K	G T	M	A C
S	C G	S	C G
W	A T	W	A T
H	A C T	D	A G T
B	C G T	V	A C G
V	A C G	B	C G T
D	A G T	H	A C T
N	A C G T	N	A C G T

Дегенеративните кодони, използвани в SEQ ID NO:11 и 12, обхващащи всички възможни кодони за дадена аминокиселина, са представени в Таблица 2.

ТАБЛИЦА 2

Амино киселина	Еднобуквен код	Кодони	Дегенеративен кодон
Cys	C	TGC TGT	TGY
Ser	S	AGC AGT TCA TCC TCG TCT	WSN
Thr	T	ACA ACC ACG ACT	CAN
Pro	P	CCA CCC CCG CCT	CCN
Ala	A	GCA GCC GCG GCT	GCN
Gly	G	GGA GGC GGG GGT	GGN
Asn	N	AAC AAT	AAV
Asp	D	GAC GAT	GAY
Glu	E	GAA GAG	GAR
Gln	Q	CAA CAG	CAR
His	H	CAC CAT	CAY
Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGT	MGN
Lys	K	AAA AAG	AAR
Met	M	ATG	ATG
Ile	I	ATA ATC ATT	ATH
Leu	L	CTA CTC CTG CTT TTA TTG	YTN
Val	V	GTA GTC GTG GTT	GTN
Phe	F	TTC TTT	TTY
Tyr	Y	TAC TAT	TAY
Trp	W	TGG	TGG
Ter	-	TAA TAG TGA	TRR
Asn Asp	B		RAY
Glu Gln	Z		SAR
Any	X		NNN

Един специалист в областта на техниката ще забележи, че има някои неясноти при определение на дегенеративен кодон, съответно на всички възможни кодони, кодиращи всяка аминокиселина. Например, дегенеративният кодон за серин (WSN) може при някои условия да кодира аргинин (ARG), а дегенеративният кодон за аргинин (MRG) може при някои условия да кодира серин (AGY). Подобна зависимост съществува между кодони, кодиращи фенилаланин и левцин. По този начин, някои полинуклеотиди, обхванати от дегенеративна последователност, могат да кодират различни аминокиселинни последователности, но един специалист в

областта може лесно да идентифицира такива вариантни последователности чрез отпратка към аминокиселинната последователност на SEQ ID NO2 и 4. Вариантни последователности могат лесно да се изследват за функционалност както е описано тук.

Един специалист в областта на техниката ще прецени също, че различните видове могат да проявяват "преференциална употреба на кодона". Най-общо, виж Grantham et al., *Nuc. Acid. Res.* 8:1893-912, 1980; Haas et al., *Curr. Biol.* 6:315-24, 1996; Wain-Hobson, et al., *Gene* 13:355-64, 1981; Grosjen and Fiers, *Gene* 18:199-209, 1982; Holm, *Nuc. Acids Res.* 14:3075-87, 1986; Ikemura, *J.Mol. Biol.* 158:573-97, 1982. Както е използвано тук, термините "преференциална употреба на кодони" или "преференциални кодони" са термини в областта, отнасящи се до протеинови транслационни кодони, които много често се използват в клетките на известни видове, като благоприятен един или няколко представители на възможни кодони, кодиращи всяка аминокиселина (Таблица 2). Например, аминокиселинен треонин (Thr) може да бъде кодиран от АСА, АСС, АСГ или АСТ, но в клетки на бозайник АСС е най-общо използван кодон; при други видове, например инсектицидни клетки, мая, вируси или бактерии, могат да са преференциални различни Thr кодони. Преференциални кодони отделни видове могат да бъдат представени в полинуклеотидите съгласно настоящото изобретение чрез голям брой методи, известни в областта. Представяне на преференциална кодонова последователност в рекомбинантна DNA, например може да предизвика продукция на протеин чрез извършване на протеинова транслация по-резултатна в частичен клетъчен тип или вид. Освен това дегенеративните кодонови последователности, разкрити в SEQ ID NO:11 и 12, служат като образец за оптимизираща експресия на полинуклеотиди в различни клетъчни типове и видове, най-общо използвани в нивото на техника и разкрити тук. Последователности, съдържащи преференциални кодони, могат да бъдат изпитвани и оптимизирани за експресия в различни видове и изпитвани за функционалност, както е разкрито тук.

Стабилно съхранени аминокиселини в цистеин псевдо-повторение на BR42x2 могат да бъдат използвани като средство за идентификация на нови фамилни членове. Например, обратна транскрипционно-полимеразна верижна реакция (RT-PCR) може да бъде използвана за да увеличи последователности, кодиращи извънклетъчен лиганд- свързващ домен, описан по-горе, от RNA получена от вид от тъканен източник или клетъчни линии. В частност за такава цел се използват високо дегенеративни образци, получени от BR42x2 последователности.

В предпочитани изпълнения съгласно изобретението изолирани полинуклеотиди ще хибридизират до подобни региони на SEQ ID NO:3 или до комплементарна последователност при строги условия. Най-общо строги условия са температура с около 5° C по-ниска от крайната точка на топене (T_m) за специфичната последователност при дефинирани йонна сила и pH. T_m е температурата (при дефинирана йонна сила и pH), при която 50% от целевата последователност хибридизира до перфектно чифтосана проба. Типични строги условия са тези, при които солевата концентрация е до около 0.03 M при pH 7 и температурата е поне около 60 °C.

Както е споменато по-горе, изолираните полинуклеотиди съгласно настоящото изобретение включват DNA и RNA. Методи за изолиране на DNA и RNA са добре известни в областта на техниката. Най-общо е препоръчително да се изолира RNA от RPMI 1788 клетки, PBMNC, почиващи или активирани трансфектни В клетки или тъкан от сливица, обаче DNA също може да бъде получена чрез използване на RNA от други тъкани или изолирана като геномна DNA. Цяла RNA може да бъде получена чрез използване на гуанидинова HCl екстракция, след което чрез изолиране чрез центрофугиране в CsCl градиент (Chirgwin et al., *Biochemistry* 18:52-94, 1979). Поли (A)⁺ RNA се получава от цяла RNA по метод на Avin и Leder (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:1408-12, 1972). Комплементарна DNA се получава от поли (A)⁺ RNA чрез

познати методи. Полинуклеотиди, кодиращи BR43x2 полипептиди, след това са идентифицирани и изолирани, например от хибридизация или PRC.

За специалиста в областта е ясно, че последователностите, разкрити в SEQ ID NO:1 и 3, представят единичен алел на човешки ген и, че се очаква да се случи алелов вариант и обратно срастване. Алелови варианти на DNA последователности показват в SEQ ID NO:1 и 3, включващи онези съдържащи тихи мутации и онези, в които мутации се проявяват в аминокиселинни последователности промени, са в обхвата на настоящото изобретение, тъй като са протеини, които са алелови варианти на SEQ ID NO:2 и 4. Алелови варианти и срастнали варианти на тези последователности могат да бъдат клонирани чрез проби на cDNA или геномни библиотеки от различни индивиди или тъкани съгласно стандартни процедури, известни в областта на техниката.

Настоящото изобретение се отнася също до изолирани BR43x2 полипептиди, които са специфични хомолози на полипептиди с SEQ ID NO:2 и 4 и техни видове ортологове. Терминът "специфични хомолози" е използван тук, за да определи полипептиди с 50%, за предпочитане 60 % и още по-добре поне 80% идентичност на последователността към последователностите, показани в SEQ ID NO:2 и 4 или техни ортологове. Такива полипептиди ще бъдат по-предпочитани, ако са поне 90% идентични и най-предпочитани при над 95% и повече идентични с SEQ ID NO:2 или нейни ортологове. Процентната идентичност на последователността е определена чрез конвенционални методи. Например Alschul et al., Bull. Math. Bio. 48: 603-66, 1986 и Henikooff, Proc. Natl. Acad. USA 89:10915-9, 1992. Накратко две аминокиселинни последователности са изравнени, за да оптимизират резултатите, използвайки интервал отварящо изискване от 10, интервал изтеглящо изискване от 1 и "blosum 62" резултатна матрица на Henikoff и Henikoff, както е показано в таблица 3 (аминокиселини са белязани чрез стандартни еднобуквени кодове). Процентната идентификация след това е изчислена като:

Общ брой на идентични резултати _____ x100

[дължина на най- дългата последователност плюс
броя на интервали, включени в най- дългата последователност,
за да изравни двете последователности.

ТАБЛИЦА 3

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4																			
R	-1	5																		
N	-2	0	6																	
D	-2	-2	1	6																
C	0	-3	-3	-3	9															
Q	-1	1	0	0	-3	5														
E	-1	0	0	2	-4	2	5													
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4										
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5							
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6						
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7					
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4				
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5			
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11		
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

Идентичността на последователността на полинуклеотидните молекули е определена по подобни методи чрез използване на съотношение, описано по-горе.

Специфично хомоложни протеини и полипептиди представляват един или повече отнети или добавени аминокиселинни заместители. Тези промени са предпочитани за малък организъм, който е с консервативни аминокиселинни заместители (например Таблица 4) и други заместители, които не предизвикват значителни дразнения или активност на протеин или полипептид; малки отнемания, типично на един до около 30 аминокиселини; и аминокиселинни или карбокси-терминални удължения, като аминокиселинния терминален

метионинов остатък, малък свързан пептид или до около 20-25 остатъка или афинитетен таг. Полипептиди, съдържащи афинитетни тагове, могат допълнително да съдържат протеолитично разцепващо място между BR43x2 полипептид и афинитетен таг. За предпочитане такива места включват тромбин-разцепващи места и фактор Ха-разцепващи места.

ТАБЛИЦА 4

Консервативни аминокиселинни заместители

Основни:	аргинин
	лизин
	хистидин
Киселинни:	глутамова киселина
	аспартова киселина
Поларни:	глутамин
	аспарагин
Хидрофобни:	левцин
	изолевцин
	валин
Ароматни:	фенилаланин
	триптофан
	тирозин
Малки:	глицин
	аланин
	серин
	треонин
	метионин

В допълнение на 20 стандартни аминокиселини, нестандартни аминокиселини (като 4-хидроксипролин, 6-N-метил лизин, 2-амино изобутирова киселина, изовалин и α-метил серин) могат да бъдат заместители за аминокиселини.

киселинни остатъци на BR43x2 полипептиди съгласно настоящото изобретение. Ограничен брой не-консервативни аминокиселини, аминокиселини, които не са кодирани чрез генетичен код и неприродни аминокиселини могат да бъдат заместители за BR43x2 полипептидни аминокиселинни остатъци. Протеините съгласно настоящото изобретение могат също да съдържат не-природно явяващи се аминокиселинни остатъци.

Не-природно явяващи се аминокиселинни остатъци включват, без това да се счита като ограничение, транс-3-метилпролин, 2,4-метанопролин, цис-4-хидроксипролин, транс-4-хидроксипролин, N-метилглицин, ало-треонин, метилтреонин, хидрокси-етилцистеин, хидроксиетил-хомоцистеин, нитроглутамин, хомоглутамин, пипеколова киселина, терт-левцин, норвалин, 2-азафенилаланин, 3-аза-фенилаланин, 4-азафенилаланин и 4-флуорофенилаланин. Няколко метода са известни в областта на техника, включващи не-природно явяващи се аминокиселинни остатъци в протеини. Например една *ин витро* система може да бъде използвана, когато се супресират безсмислени мутации чрез използване на аминокиселициран супресор tRNAs. Методи за синтезиращи аминокиселини и аминокиселициращи tRNA са известни в областта. Транскрипция и транслация на плазмиди, съдържащи безсмислени мутации се провеждат в клетъчна свободна система, съдържаща екстракт от *E. coli* S 30 и търговско достъпни ензими и техни реагенти. Протеините се пречистват чрез хроматография. Например Robertson et al., *J. Am. Chem. Soc.* 113:2722, 1991; Eltman et al., *Methods Enzymol.* 202:301, 1991; Chung et al., *Science* 259:806-9; Chung et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10145-9, 1993). При втори метод, транслация се провежда в *Xenopus* ооцити чрез микроинжекция на мутирала mRNA и химически аминокиселициран супресор tRNA (Turcatti et al., *J. Biol. Chem.* 271: 19991-8, 1996). В трети метод клетки на *E. coli* са културирани в отсъствие на природна аминокиселина, която може да бъде заместена (например фенилаланин) и в присъствие на желана не-природна аминокиселина /и(например 2-азафенилаланин, 3-азафенилаланин, 4-азафенилаланин или 4-флуорофенилаланин). Не-

природната аминокиселина се включва в протеина на мястото на неговия природен двойник. Виж Koide et al., *Biochem.* 33:7470-6, 1994. Природно явяващи се аминокиселинни остатъци могат да се превърнат в не-природно явяващи се видове чрез *in vitro* химическа модификация. Химическа модификация може да бъде комбинирана с място-насочена мутагенеза към допълнително увеличение на обхвата на заместители (Wynn and Richards, *Protein Sci.* 2:395-403, 1993).

Определен брой не-консервативни аминокиселини, аминокиселини, които не са кодирани с генетичен код, не-природно явяващи се аминокиселини и неприродни аминокиселини могат да бъдат заместители за BR43x2 полипептидни аминокиселинни остатъци.

Специфични аминокиселини в BR43x2 полипептиди съгласно настоящото изобретение могат да бъдат идентифицирани съгласно известни в областта процедури, такива като място-насочена мутагенеза или аланин-сканираща мутагенеза (Cunningham and Wells, *Science* 244:1081-5, 1989). Единични аланин мутации са включени при всеки остатък в молекулата и получените мутантни молекули са изследвани за биологична активност /например осигурява намаляване в клетъчен отговор по време на имунния отговор, инхибиране или намаление в автоантитяло продукцията/ до идентифициране на аминокиселинни остатъци, които са решаващи за активността на молекулата. Например при Hilton et al., *J. Biol. Chem.* 271: 4699-708, 1996. Места на биологично взаимодействие, лиганд-свързващи части, като цистеин псевдо-повторения могат също да бъдат определени чрез физични анализи на структура, чрез методите на ядрено-магнитен резонанс, кристалография, електронна дифракция или фотоафинитено белязване, при взаимодействие с мутация на предполагаеми контактни аминокиселини. Например Vos et al., *Science* 255:306-12, 1992; Smith et al., *J. Mol. Biol.* 224:899-904, 1992; Wlodaver et al., *FEBS Lett.* 309:59-64, 1992. Идентичности на специфични аминокиселини могат също да бъдат предположени от анализ на хомолози със съответни TNFR фамилен членове, като TAC1 и BCMA.

Допълнителни аминокиселинни заместители могат да бъдат направени с цистеин псевдо-отговор на BR43x2, толкова дълъг, колкото запазените цистеин, аспартова киселина и левцин остатъци са съхранени и най-висшата по ред структура не е разрушена. За предпочитане е да се направят заместители с цистеин псевдо-повторения на BR43x2 чрез отправка към последователности на други цистеин псевдо-отговори. SEQ ID NO:10 е обобщено цистеин псевдо-повторение, което показва възможни аминокиселинни заместители върху същата линия. Заместители в този домен са обект на ограниченията, споменати тук.

Множество аминокиселинни заместители могат да бъдат направени или изпитани чрез познати методи на мутагенеза и скрининг, като тези описани от Reidhaar-Olson and Sauer (Science 241:53-7, 1988). Накратко, тези автори разкриват методи за едновременно рандомизиране на две или повече позиции в полипептид, избран за функционален полипептид и след това последващо мутагенизирани полипептиди до определяне на спектъра на възможни заместители на всяка позиция. Други методи, които могат да бъдат използвани, включват дисплей на фаги, обяснени от Lowman et al., Biochem. 30-10832-7, 1991; Landner et al., U.S. Patent No 5,223,409; Huse, WIPO Publication WO 92/06204) и регион-насочена мутагенеза (напр. Derbyshire et al., Gene 46:145, 1986; Ner et al., DNA 7:127,1988).

Варианти на разкритите BR43x2 DNA и полипептидни последователности могат да бъдат получени чрез DNA разместване както е описано от Stemmer, Nature 370:389-91, 1994, Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-51, 1994 и WIPO публикация WO97/20078. Накратко, варианти DNA са получени чрез *in vitro* хомоложна рекомбинация чрез произволна фрагментация на двойка DNA, последвано от разграждане чрез PRC, предизвикващо произволно представени местни мутации. Този метод може да бъде променян чрез използване на семейство от двойки DNA, такива като алелови варианти или DNA от различни видове до постигане на допълнителна изменчивост в процесите. Селекция или изследване на желаната активност,

последвана от допълнителни взаимодействия на мутагенеза и опит са условия да се осигури бърза “еволюция” на последователности чрез селектиране на желани мутации, при едновременно селектиране срещу вредни промени.

Мутагенни методи съгласно настоящото изобретение могат да бъдат комбинирани със силно пропадащи, автоматизирани скринингови методи за откриване на клонирани, мутагенни полипептиди в клетките-гостоприемник. Мутагенни DNA молекули, които кодират активни полипептиди (например, осигуряващи увеличение в В клетъчен отговор по време на имунния отговор, инхибиране или намаляване в антияло продукция) могат да бъдат превърнати от клетки-гостоприемник и бързо вкарани в последователност чрез модерно оборудване. Тези методи позволяват бързо определяне на значението на отделните аминокиселинни остатъци в желаните полипептиди и могат да бъдат прилагани към полипептиди с неизвестна структура.

Чрез използването на методите, дискутирани по-горе, един специалист в областта на техниката може да идентифицира и получи множество полипептиди, които са специфично хомоложни към остатъци от 1 до 120 на SEQ ID NO2 или техни алелови варианти и да съхрани В клетъчни супресивни свойства на некултивиран-тип протеин. Такива полипептиди могат да включват допълнителни аминокиселини или домени от други членове на туморен некрозно факторен рецептор надфамирно, афинитетни тагове или други подобни. BR43x2 полипептид или реакция на структури, съдържащи функционални домени на други членове на TNFR надфамилно, образуват хибридни туморни некрозни факторни рецептори, проявяващи променени в клетъчни супресивни възможности.

Настоящото изобретение допълнително осигурява двойници рецептори и полинуклеотиди от други видове (ортологове). Тези видове включват, но не се ограничават до бозайници, птици, земноводни, рептилии, риби, инсекти и други гръбначни и безгръбначни видове. От особен интерес са BR43x2 рецептори от други бозайникови видове, включващи мурина, свински, овчи, говежди, кучешки, фелинни, конски и други рецептори на примати.

Ортологове на човешки BR43x2 рецептор могат да бъдат клонирани чрез използване на информация и състави, осигурени с настоящото изобретение в комбинация с конвенционални техники на клониране. Например cDNA може да бъде клонирана чрез използване на mRNA, получена от тъкан или клетъчен тип, който експресира рецептора. Подобен вид mRNA може да бъде идентифициран чрез използване на Northern блотове с проби, създадени от последователности, описани тук. След това е приготвена библиотека от mRNA на позитивна тъкан или клетъчна линия. Рецептор, кодиращ cDNA може след това да бъде изолиран чрез различни методи, такива като пробирание с цяла или частична cDNA или с една или повече рамки на разградени проби, основани на разкритата последователност. cDNA може също да бъде клонирана чрез PCR, чрез използване на праймери, създадени от последователността, описана тук. В допълнителен метод, cDNA-библиотека може да бъде използвана за трансформирани или трансфектирани клетки на гостоприемник, и експресия на интересуващата cDNA може да бъде открита с антитяло към рецептор. Подобни техники могат също да се приложат при изолиране на геномни клонове.

Рецепторните полипептиди съгласно настоящото изобретение, включващи рецепторни полипептиди с пълна дължина, разтворими рецептори-полипептиди, полипептидни фрагменти и смесени полипептиди, могат да се получат чрез генно инженерство на клетки-гостоприемници съгласно конвенционални техники. Подходящи клетки-гостоприемници са тези клетъчни типове, които могат да бъдат трансформирани или трансфектирани с екзогенна DNA и израстват в култура и включват бактерии, гъбични клетки и културирани високи еукариотни клетки. Предпочитани са еукариотни клетки и частично културирани клетки на многоклетъчни организми. Техники за работа с клонирани DNA молекули и представяне на екзогенна DNA в различни клетки-гостоприемници са разкрити от Sambrook et al., *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor, NY, 1989;

Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Jhon Wiley and Sons, Inc., NY, 1987.

Най-общо, DNA последователност, кодираща BR43x2 полипептид е действено свързана към други генетични елементи, препоръчани за експресия, общо включваща транскрипционен промотер и терминатор в експресионния вектор. Векторът също ще съдържа един или повече селективни маркери и един или повече източника на репликация, въпреки това един специалист в областта на техниката ще различи, че в известни системи селективни маркери могат да се осигуряват върху отделните вектори, и репликации на екзогенна DNA могат да се осигуряват чрез обединяване в гостоприемниковия клетъчен домен. Селекцията на промотери, терминатори, селективни маркери, вектори и други елементи е рутинен метод в обхвата на възможностите на специалист в областта. Много такива елементи са описани в литературата и са възможни чрез използване на търговско оборудване.

За насочване на BR43x2 полипептид в секреторния канал на клетка-гостоприемник в експресионния вектор се осигурява секреторна сигнална последователност (известна като сигнална последователност, водеща последователност, пре-про-последователност или пре-последователност). Секреторната сигнална последователност може да бъде от BR43x2 полипептид или може да бъде получена от друг секретеращ протеин (например t-PA) или ново синтезиран. Секреторна сигнална последователност е присъединена към BR43x2 DNA последователност в коректно четяща се рамка и разположена към пряк ново синтезиран полипептид в секреторен канал на клетката-гостоприемник. Секреторни сигнални последователности са най-общо разположени 5' към DNA последователност, кодираща полипептида. Въпреки това позната сигнална последователност може да бъде разположена където и да е в DNA последователността (например Welch et al., US Patent No 5,037,743; Holland et al., US Patent No 5,143,830).

Културирани клетки от бозайник са подходящи гостоприемници съгласно настоящото изобретение. Методи за въвеждане на екзогенна DNA в

гостоприемникови клетки на бозайник, включват калциево-фосфатно изменена трансфекция (Wigler et al., Cell 14:725, 1978; Corsaro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7:603, 1981; Graham and Van der Eb, Virology 52:456, 1973), електропорация (Neumann et al., EMBO J. 1:841-45, 1982), DEAE- декстран изменена трансфекция (Ausubel et al.) (Hawley-Nelson et al., Focus 15:73, 1993; Ciccione et al., Focus 15:80, 1993). Продукцията на рекомбинантни полипептиди в културални клетки на бозайник е разкрита например от Levinson et al., US 4,713,339; Hagen et al., US 4,784,950; Palmiter et al., US 4,579,821 и Ringold, Us 4,656,134. Подобни културирани клетки от бозайник включват COS-1 (ATCC No. CRL 1650), COS-7 (ATCC No CRL 10314), ВНК (ATCC No CRL 1632), ВНК 570 (ATCC No CRL 10314), 293 (ATCC No CRL 1573); Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977), Jurcat (ATCC No CRL 8129), ВаF3 (интерлевкин-3 зависима пре- лимфоидна клетъчна линия от муринов костен мозък, например Placios Steinmetz, Cell 41:727-34, 1985; Mathey -Prevot et al., Mol. Cell. Biol. 6:4133-5, 1986) и яйчникова клетъчна линия от китайски хамстер (CHO-K1; ATCC No CCL 61). Допълнителни подходящи клетъчни линии, известни в нивото на техника и достъпни за публични демонстрации такива като Американска типова културална колекция ATCC, Роквил, Мериленд. Най-общо са препоръчани силни транскрипционни промотери като промотер от SV-40 или цитомегаловируси, например в US 4,956,288. Други подходящи промотери включват такива от металотионни гени (US 4,579,821 и US 4,601,978) и аденовирусен голям късен промотер.

За отделяне на културални клетки на бозайник, в които е поместена чужда DNA, най-общо се използва лекарствена селекция. Такива клетки най-общо са отбелязани като "трансфектанти". Клетки, които са културирани в присъствие на селективен агент и са способни да преминават през желания ген към техния проген, са обозначени като "стабилни трансфектанти". Препоръчан селектиращ маркер е ген, кодиращ устойчивост към антибиотика неомицин. Селекцията е проведена в присъствие на неомицинов тип лекарство като G-418

или подобно. Селекционни системи могат също да бъдат използвани за повишаване на експресивното ниво на търсения ген, метод известен като "амплификация". Амплификацията се провежда чрез културирани трансфектанти в присъствие на ниско ниво на селективен агент и повишаване на количество на селективен агент и след това повишаване на количеството на селективния агент да селектира клетки, които продуцират високи нива на продукти на въведените гени. Препоръчан амплификационен селектиращ маркер е дихидрофолат редуктаза, която притежава устойчивост към метотрексат. Могат да бъдат използвани и други лекарствено устойчиви гени, например хидромицинова устойчивост, полилекарствена устойчивост, пурамицин ацетилтрансфераза. Алтернативни маркери, които въвеждат изменен фенотип, като зелен флуорисцентен протеин или клетъчно повърхностни протеини като CD4, CD8, Клас I MAC, плацентна алкална фосфата могат да бъдат използвани за отделяне на трансфектирани клетки от нетрансфектирани клетки чрез такива начини като FACS, сортиращи или магнитно зрънчеви сепаративни технологии.

Могат да бъдат използвани и други високи еукаритични клетки като гостоприемници, такива като растителни клетки, инсектни клетки и клетки от хвърчащи. Използването на *Agrobacterium rhizogenes* като вектор за експресиращи гени в растителни клетки е представено от Sinkar et al., J.Biosci. (Bangalore) 11:47-58, 1987. Трансформация на инсектни клетки и продукция на чужди техни полипептиди е разкрито от Guarino et al., US 5,162,222 и публикация WO 94/06463. Инсектните клетки може да бъдат инфектирани с рекомбинантни бакуловируси, най-общо получени от *Autographa californica* ядрено полихидрозен вирус (AcNPV). Например при Posse, The Baculovirus expression System: A laboratory Guide, London, Chapman and Hall; O'Reilly et al., Baculovirus expression Vectors: A Laboratory Manual, New York, Oxford University Press., 1994; Richardson, Ed., Baculovirus expression Protocols. Methods in Molecular Biology, Totowa, NJ, Humana Press, 1995. Втори метод, използван за създаване на рекомбинантен BR43x2 бакуловирус, е транспортно-

базирана система ан Luckov, et al., J. Virol. 67:4566-79, 1993). Тази система, която използва трансферни вектори, е твърд Bac-to-Bac™ кит (Life Technologies Rockville, MD). Тази система използва трансферен вектор, pFastBac1™ (Life Technologies), съдържаща Tn 7 транспорт за задвижване на DNA кодирането на BR43x2 полипептида в бакуловирусен геном, установен при E.coli като пространен плазмид, наречен "бакмид". Например Hill-Perkins and Possee, J. Gen. Virol. 71:971-6, 1990; Bonning, et al., J. Gen. Virol. 75:1551-6, 1994; Chazenbalk and Rapport, j. Biol. Chem.270: 1543-9,1995. В допълнение, трансферните вектори могат да включват вътрешно рамково смесено cDNA кодиране на епитопен таг на C- или N- терминал на експресиран BR43x2 полипептид, например Glu-glu епитопен таг (Grussenmeyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci). Използвайки известна техника в областта трансферен вектор, съдържащ BR43x2, е трансформиран в E.coli и направен скрининг за бакмиди, които съдържат разрушен lacZ ген, показателен за бакуловирус. Бакмидът DNA, съдържащ рекомбинантния бакуловирусен геном, е избран чрез позната техника и се използва да трансфектира Spodoptera frugiperda клетки, например Sf9 клетки. Рекомбинантен вирус, който експресиращ BR43x2 е последващо продуциран. Рекомбинантен вирусен запас се създава чрез методи общо използване в практиката.

Рекомбинантният вирус се използва да засегне клетки- гостоприемници, обикновено клетъчна линия, получена от падналия хелминт spodoptera frugiperda. Например най- общо в Glick and Pasternak, Molecular Biotechnology; Principles and Applications of Recombinant DNA, ASM Press, Washington, D.C.,1994. Друга подходяща клетъчна линия е High Fiveo® клетъчна линия получена ин витро от Trichoplusia ni (US 5,300,435). Търговско достъпни, свободни от серум среди са използвани за растеж и съхраняване на клетките. Подходящи среди са Sf900 II® (Life Technologies) или ESF 921® (Expression Systems) за Sf9 клетки; и Ex-клетка 405® (JRH Biosciences, Lenexa, KS) Express Fiveo® (Life Technologies) за T.ni клетки. Клетките са израснали от

инокулационна плътност на приблизително $2-5 \times 10^6$ клетки, през което рекомбинантен вирусен запас се добавя към мултиплициране на дразнене (MOI) от 0.1 до 10, по-типично близо 3. Използваните процедури са описани в лабораторните ръководства (King and Posse, O'Reilly, et al.; Richardson). Последователно пречистване на BR43x2 полипептида от супернатанта може да бъде постигнато чрез използване на методи, описани тук.

Гъбни клетки, включващи клетки от хлебна мая, също могат да бъдат използвани в настоящото изобретение. Видове хлебна мая с известен интерес, в това отношение са *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* и *Pichia methanolica*. Методи за трансформиране на *Saccharomyces cerevisiae* клетки с екзогенна DNA и продуциращи рекомбинантни техни полипептиди са разкрити например от Kawasaki et al., US 4,931,373; Brake, US 5,037,743; Murray et al., US 4,845,075. Избрани са трансформирани клетки от фенотип, определен от селективен маркер, най-общо лекарствена устойчивост или способност за растеж в присъствие на частична хранителна среда, например левцин. Препоръчителна векторна система за използване в *Saccharomyces cerevisiae* е POT1 векторна система, разкрита от Kawasaki et al., US 4,931,373), който предлага да бъдат селектирани трансформирани клетки чрез растеж в глюкозо-съдържаща среда. Подходящи промотери и терминатори за използване в хлебна мая са тези от гликолитичните ензимни гени (Kawasaki et al., US 4,599,311; Kingsman et al. US 4,615,974 и Bitter, US 4,977,092) и алкохолно дехидрогеназни гени. Също и US 4,990,446; US 5,063,154; US 5,139,936 и US 4,661,454. От областта на техниката са известни трансформационни системи за други хлебни маи, включително *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Ustilago maydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia guilliermodii* и *Candida maltosa*. Например Gleeson et al., J.Gen. Microbiol. 132: 3459-65, 1986 Cregg, US 4,935,349. Клетки от *Aspergillus* могат да бъдат използвани съгласно методи на McKnight et al., US 4,935,349. Методи за трансформиране на

Ascremonium chrysogenum са разкрити от Sumino et al., US 5,162,228. Методи за трансформираща *Neuspora* са разкрити от Lambowitz в US 4,486,533.

Например използването на *Pichia methanolica* като гостоприемник за продуциране на рекомбинантни протеини е разкрита от Raymond в патенти US 5,716,808, US 5,736,383, Raymond, Yeast 14:11-23, 1998г. и в международна публикация WO 97/17450, WO 97/17451, WO 98/02536 и WO 98/02565. DNA молекули за трансформиране *Pichia methanolica* могат най-общо да се приготвят като двойно навити кръгли плазмиди, които са предварително изправени преди трансформацията. За полипептидна продукция в *Pichia methanolica* е за предпочитане промотерът и терминаторът в плаزمид да бъдат *P. methanolica*- гена, като например *Pi.methanolica* -алкохолен ген (AUG1 или AUG2). Други полезни промотери включват тези на дихидроацетон синтаза (DHAS), форматна дехидрогеназа (FMD) и каталаза (CAT) гени. За облекчено включване на DNA в хромозомата –гостоприемник, за предпочитане е да има пълен експресионен сегмент на плазмид, разположен на двата края от гостоприемник DNA последователности. Препоръчителен селективен маркер за използване в *Pichia methanolica* е *P. methanolica* ADE2 ген, който кодира фосфорибозил-5-аминоимидазолова карбоксилаза (AIRC; EC 4.1.1.21), която позволява *ade2* гостоприемникови клетки да растат в отсъствие на аденин. За разширена скала, при индустриални процеси, където е позволено да се минимизира използването на метанол, е за предпочитане да се използват клетки- гостоприемник, в които са отстранени двата метанол обработени гени (AUG1 или AUG2). За продукция на декретирани протеини, е за предпочитане недостиг на клетки- гостоприемник в бакуларни протеазни гени (PER4 и PRB1). Използва се електропорация за облекчаване на включването на плазмид, съдържащ DNA, кодираща полипептид в *P. methanolica* клетки. За предпочитане е да се трансформират *P. methanolica* клетки чрез електропорация чрез експотенциален разпад, пулсиращо електрическо поле със сила на полето от 2.5 до 4.5 kv/cm, за предпочитане 3.75 kv/cm и постоянно време (t) от 1 до 40 милисекунди, още по-добре около 20 милисекунди.

Съгласно настоящото изобретение прокариотични клетки на гостоприемник, включващи родове на бактерията *Escherichia coli*, *Bacillus* и други, са също полезни гостоприемникови клетки. Техники за трансформиране на тези гостоприемници и експресиращи чужди DNA последователности клонирани сами по себе си са добре известни в областта (Sambrook et al.). При експресиране на BR43x2 полипептид в бактерия, като *E. coli*, полипептидът може да бъде съхранен в цитоплазмата, най-често като неразтворими гранули или може да бъде насочен към периплазменото пространство чрез бактериална секреторна последователност. В по-ранен случай, клетките се лизирани и гранулите се възстановяват и денатурират например чрез гуанидин изотиоцианат или урея. Денатурираният полипептид може след това да бъде разгънат и димеризиран чрез разреждане на денатуранта, като диализа срещу разтвор на урея и комбиниране на редуциран и оксидиран глутатион, последвано от диализа на буферен солеви разтвор. В по-късен случай полипептидът може да бъде възстановен от периплазменото пространство в разтворима и функционална форма чрез разграждане на клетките (например чрез соникация или осмотичен шок) до освобождаване на съдържанието на периплазменото пространство и възстановяване на протеина, като по този начин се избягва необходимостта от денатурация и разгъване.

Трансформирани или трансфектирани гостоприемникови клетки са културирани съгласно конвенционални методи в културална среда, съдържаща хранителни вещества и други компоненти, препоръчани за растеж на избрани гостоприемникови клетки. Разнообразие на подходящи среди, включващи определена среда и комплекс среди, са известни в областта на техника и най-общо включват въглероден източник, азотен източник, специфични аминокиселини, витамини и минерали. Средата може да съдържа също такива компоненти като растежни фактори или серум, както е препоръчано. Растежната среда се избира най-общо от клетки, съдържащи екзогенно добавена DNA например чрез лекарствена селекция или недостиг на специфичен хранителен компонент, който е добавен чрез селективен маркер,

изведен върху експресивния вектор или ко-трансфектиран в клетката-гостоприемник. *P. methanolica* клетки са културирани в среда, съдържаща адекватни източници на въглерод, азот и следи на хранителни вещества при температура от около 25°C до 35° С. Течни култури със значителна аерация се използват чрез конвенционални методи, като например чрез разклащане на малки колби или разпръскване на ферментатори. Препоръчителна културална среда за *P. methanolica* е YEPD (2% D-глюкоза, 2% Vacto® Peptone (Difco Laboratories, Detroit, MI) 1% Vacto® екстракт от хлебна мая (Difco Laboratories) 0.004% аденин и 0.006% L-левцин.

Експресирани рекомбинантни BR43x2 (или химерни или смеси на BR43x2 полипептиди) могат да бъдат пречистени чрез фракциониране и/или обичайни пречистващи методи и среди. Съгласно изобретението е препоръчително да се осигуряват протеини или полипептиди с висока чистота, например повече от 95% чистота, още по-добре по-висока от 99%. Амониесулфатна преципитация и кисела или произволна екстракция може да бъде използвана за фракциониране на пробите. Примерно пречистващи етапи могат да включват хидроксиапатит, размерно изключване, FPLC и обратно-фазова високо-скоростна течна хроматография. Подходяща анион-обменна среда може да бъде: производни декстриани, агароза, целулоза, полиакриламид, специални силикати и други подобни. PEI, DEAE, QAE и Q производни са предпочитани, като DEAE fast-Flow Sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ) е предпочитана при отделни случаи. Примерни хроматографски среди са тези, получени с фенил, бутил, или октилови групи, такива като Фенил-сефароза FF (Pharmacia), Toyopearl butil 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA), Октил сефароза (Pharmacia) и други подобни; или полиакрилни гуми, като Amberchrom CG 71 (Toso Haas) и други. Подходящи твърди подложки са стъклени зърна, силиконови зърна, целулозни зърна, агарозни зърна, кръстосано – свързани агарозни зърна, полистиренови зърна, кръстосано – свързани полиакриламидни гуми и други подобни, които са неразтворими при

условията, в които се използват. Тези подложки могат да бъдат променяни с реактивни групи, които позволяват прикрепяне на протеини чрез аминокислотни групи, карбоксилни групи, сулфхидрилни групи, хидроксилни групи и/или карбохидратни общности. Примери за куплиращи структури са цианогенно-бромидна активация, N-хидроксисукциамидна активация, епоксидна активация, сулфхидрилна активация, хидразидна активация и карбоксилни и аминокислотни производни за карбодиаמידно куплиращи структури. Тези или други твърди среди са добре известни в областта на техника и са търговско достъпни. Методи за свързване на рецептор полипептиди към поддържаща среда са също известни в областта на техниката. Отделяне на частен метод е рутинен прием и е определено в частност чрез свойствата на избрания поддържащ материал. Например в *Affinity Chromatography: Principles and Methods*, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden, 1988.

Полипептидите съгласно настоящото изобретение могат да бъдат изолирани чрез използване на техните свойства. Например може да бъде използвана мобилизирана метално-йонна адсорбционна (IMAC) хроматография за пречистване на хистидинови протеини, включващи тези, които съдържат полихистидинови тагове. Накратко, най-напред се зарежда гел с бивалентни метални йони до образуване на хелат (Sulkovski, *Trends in Biochem. Sci.* 3:1-7, 1985). Към тази матрица се адсорбират хистидин-богати протеини с отделни афинитети, зависещи от използвания метален йон и се отмиват чрез конкурентно отмиване, понижаващо рН или чрез използване на силни хелатни агенти. Други методи за пречистване са пречистване на гликозилирани протеини чрез лектин афинитетна хроматография (*Methods in Enzymol.*, Vol. 182, "Guide to Protein Purification", M. Deutscher, ed., Acad. Press, San Diego, 1990, pp. 529-39). В допълнителни изпълнения съгласно изобретението за улесняване на пречистването могат да бъдат създадени излив на полипептида и афинитетния таг (например малтоза-свързващ протеин, FLAG-tag (Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys (SEQ ID No:13)), Glu-Glu tag (Glu Glu Tyr Met Pro Met Glu (SEQ ID No:13)), имуноглобулинов домен).

За предпочитане могат да бъдат използвани протеин разгъващи (и по желание ре-оксидиращи) процедури. За предпочитане е протеинът да се пречиства до > 80% чистота, още по-добре до > 90% , най-добре >95% в отделни случаи е предпочитано фармацевтично чисто състояние, което е по-високо от 99.9% чистота по отношение на контаминиращи макромолекули, в частност други протеини и ядрени киселини и онечистен от инфекции и пирогенни агенти. За препоръчване пречиственият протеин е специфично освободен от други протеини, в частност други протеини или животински източници.

BR43x2 полипептиди или техни фрагменти могат да бъдат получени също чрез химически синтези. BR43x2 полипептиди могат да бъдат мономери или мултимери; гликозилирани или не-гликозилирани; фиксирани или не-фиксирани; и могат да включват или да не включват определящ метионин аминокиселинен остатък. Примерни BR43x2 полипептиди включват полипептиди от 32-40 остатъка в дължина, с аминокиселинна последователност, съответстваща на следния мотив: $\text{XXCX [QEK] [QEKNRDHS] [QE] x\{0-2\}[YFW] [YFW] DXXLLX\{2\} C[IMLV] XCX \{3\}CX\{6-8\}CX\{2\}[YE]CXX}$ (SEQ ID NO:10) и с ограниченията, описани тук.

BR43x2 полипептиди могат да бъдат синтезирани чрез специални твърдо-фазови синтези, частично твърдо-фазови методи, фрагментна кондензация или класически разтворими синтези. За предпочитане полипептидите се получават чрез твърдо-фазови пептидни синтези, например както е описано от Merrifield, J.Am. Chem. Soc. 85:2149, 1963. Синтезът се провежда с аминокиселини, които са защитени на алфа-амино терминалите. Трифункционални аминокиселини с лабилни странични вериги са защитени също с подходящи групи за предпазване от нежелани химически реакции с явяващите се по време на групиране полипептиди. Алфа-амино защитната група е селективно отместена към позволена следваща реакция за поместване на аминокиселините терминалите. Условието за отместване на алфа-амино защитната група не отстраняват странично-верижни защитни групи.

Алфа-амино защитни групи са добре известни в областта на техника за степенни полипептидни синтези. Включените ацилови типови защитни групи (например формил, трифлуорацетил, ацетил) арилов тип защитни групи (биотинил), ароматен уретанов тип защитни групи [например бензил-оксикарбонил (Cbz), заместен бензилоксикарбонил и 9-флуоренилметилоксикарбонил (Fmoc)], алифатни уретанови защитни групи [например, *t*-бутилоксикарбонил (*t*Boc), изопропил-оксикарбонил, циклохексилоксикарбонил] и алкилов тип защитни групи (например бензил, трифенилметил). Препоръчани защитни групи са *t*Boc и Fmoc.

Странично-верижни защитните групи, избрани от останало образование по време на куплиране, не се отместват по време на депротекцията на аминоктерминалните защитни групи или по време на куплиращи условия. Странично-верижните защитни групи трябва също да са отстраними по време на синтеза чрез реакционни условия, които не изменят крайният полипептид. В *t*Boc химизма странично-верижните защитни групи за трифункционални аминокиселини най-много са бензилови. В Fmoc химизма те са предимно терт-бутил или тритилови.

В *t*Boc химизма, за предпочитане странично-верижните защитни групи са този за аргинин, циклохексил за аспартова киселина, 4-метилбензил и ацетамидометил за цистеин, бензил за глутамова киселина, серин за треонин, бензилоксиметил и динитрофенил за хистидин, 2-Cl-бензилоксикарбонил за лизин, формил за триптофан и 2-бромбензил за тирозин. В Fmoc химизма, препоръчителните странично-верижни защитни групи са 2,2,5,7,8-пентаметилхроман-6-сулфонил (Pmc) или 2,2,4,6,7-пентаметилдихидробензофуран-5-сулфонил (Pbf) за аргинин, тритил за аспарагин, цистеин, глутамин и хистидин, терт-бутил за аспартова киселина, глутамова киселина, серин, треонин и тирозин, *t*Boc за лизин и триптофан.

За синтеза на фосфопептидите се използва както пряко, така и следобединяващо включване на фосфатната група. При метода на директното включване фосфатната група върху серин, треонин или тирозин може да бъде

защитена чрез метил, бензил или терт-бутил в Fmoc химията или чрез метил, бензил или фенил в tBoc химията. В Fmoc химията може да бъде използвано пряко включване на фосфотирозин без фосфатна защита. При метода на следобединяващото включване незщитени хидроксилни групи на серин, треонин или тирозин се получават върху твърда фаза с дитерт-бутил-, дибензил- или диметил-N,N'-диизопропил-фосфорамидид, след което се оксидизира чрез терт-бутилхидропероксид.

Твърдофазовата синтеза се провежда обикновено от карбоксил-терминала чрез свързване на алфа-амино защитена (странично-верижно защитена) аминокоселина към подходяща твърда подложка. Естерната връзка се образува, когато прикрепването е извършено към хлорметил, хлортритил или хидрокси метил смола и полученият пептид може да има свободна карбоксилна група при C-терминала. Алтернативно, когато се използва amidна смола, такава като бензхидриламнинна или p-метилбензхидриламнинна смола (за tBoc химия) и Ring-амид или PAL смола (за Fmoc химия), amidната връзка се образува и полученият полипептид има карбоксаmidна група при C-терминала. Тези смоли независимо дали са базирани на полистирен или полиамид или полиетиленгликол с/или без прихващач или връзка, с или без първо аминокиселинно прикрепяне са търговско достъпни и техните препарати са описани от Steward et al., "Solid Phase Peptid Synthesis" (2nd Edition), (Pierce Chemical Co., Rocford, IL, 1984) и Bayer and Rapp, Chem. Pept. Prot. 3:3, 1986; и Atherton et al., Solid Phase Peptid Synthesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford, 1989.

C-терминалната аминокиселина, защитена на страничната верига при необходимост и на α -амино групата се прикрепя към хидроксиметил смола чрез различни активиращи агенти, като дициклохексилкарбодиимид (DCC), N-N'-диизопропилкарбодиимид (DIPCDI) и карбонилдиимидазол (CDI). Тя може да бъде прикрепена към хлортритилна смола пряко в нейната цезиева тетраметиламониева солева форма или в присъствие на триетиламин (TEA) или диизопропилетиламин (DIEA). Първото аминокиселинно прикрепване

към amidна смола е същото като amidно свързаната форма чрез куплиращи реакции.

След прикрепването към подложката от смола алфа-амино защитната група се отстранява чрез различни реагенти в зависимост от химията на защита (напр. Tbos, Fmoc). Степента на Fmoc отстраняването може да бъде наблюдавано при 300 – 320 nm или чрез провеждаща клетка. След отстраняване на алфа-амино защитната група, оставащите защитени аминокиселини се свързват постепенно в необходимия ред до получаване на желаната последователност.

Могат да бъдат използвани различни активиращи агенти за куплиращи реакции, включително DCC, DIPCDI, 2-хлор-1,3-диметилимидиум хексафлуорфосфат (CIP), бензотриазол-1-ил-окси-трис-(диметил-амино)-фосфониум хексафлуорфосфат (BOP) и неговия пиролидинов аналог (PyPOP), бром-трис-пиролидин-фосфониум хексафлуорфосфат (PyBrOP), O(бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуроний хексафлуор фосфат (HBTU) и неговия флуорборат аналог (TBTU) или негов пиролидинов аналог (HBRU), O-(7-азабензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетра метил уроний хексафлуоро фосфат (HATU) и негов тетрафлуорборат аналог (TATU) или негов пиролидинов аналог (HARU). Най-използваните каталитични добавки в куплиращи реакции са 4-диметиламинопиридин (DMAP), 3-хидрокси-3,4-дихидро-4-оксо-1,2,3-бензотриазин (HODhbt), N-хидроксибензотриазол (HOBT) и 1-хидрокси-7-азабензотриазол (HOAt). Всяка защитена аминокиселина се използва с излишък (>2.0 еквивалента), като свързването се извършва в N-метилпиролидон (NMP) или в DMF, CH₂Cl₂ или техни смеси. Степента на завършване на куплиращата реакция може да бъде наблюдавана на всеки етап, например чрез нинхидринова реакция, както е описано от Kaiser et al., Anal. Biochim. 34:595, 1970.

След цялостното получаване на желания пептид, пептидната смола се разцепва с реагент с подходящи почистващи вещества. Fmoc- пептидите се разцепват и де-защитават чрез TFA с почистващи вещества, например вода,

етандитиол, фенол и тиоанизол. Тъс пептидите обикновено се разцепват и де-защитават с течен HF за 1-2 часа при -5° до 0°C , което разцепва полипептида от смолата и отстранява по-голямата част от странично-верижните защитни групи. Почистващи вещества като анизол, диметилсулфамид и р-тиокрезол се използват обикновено в течен HF за предпазване на катиони, образувани по време на разцеплението от алкилираните и ацилираните аминокиселинни остатъци, присъстващи в полипептида. Формилната група на триптофана и динитрофенилната група на хистидина е необходимо да бъдат заменени съответно от пиперидин или тиофенил в DMF преди HF разцепване. Ацетамидометилната група на цистеина може да бъде отстранена с живачен (II) ацетат и по избор с йод, талиев (III) трифлуорацетат или сребърен тетрафлуорборат с едновременно оксидиране на цистеина до цистин. Други силни киселини, използване за tBoc пептидно разцепване и депротекция, са трифлуорметансулфонова киселина (TFMSA) и триметилсилилтрифлуор-оцетна киселина (TMSOTf).

Настоящото изобретение допълнително предлага множество други полипептидни смеси и съответни многомерни протеини, съдържащи една или повече полипептидни смеси. Разтворим BR43x2, TAC1 или BCMA полипептид може да бъде експресиран като смес с имуноглобулин тежко верижен постоянен регион, най-често като Fc фрагмент, който съдържа два постоянни регионни домена и липсва променливият регион. Методи за получаване на такива смеси са разкрити в US 5,155,027 и US 5,567,584. Такива смеси най-често са секретирани като многомерни молекули, в които Fc частите са дисулфидно свързани с всеки друг и два не-Ig полипептиди са подредени в близост към всеки друг. Имуноглобулин- BR43x2 (TAC1 или BCMA) полипептидни смеси могат да бъдат експресирани в клетки, получени чрез генно инженерство до продуциране на множество многомерни BR43x2 аналози. Допълнителни (помощни) домени могат да бъдат насочени към BR43x2 (TAC1 или BCMA) полипептиди за достигане до специфични клетки, тъкани или макромолекули. Смесите също могат да бъдат получени чрез

използване на токсини, както е дискусирано тук. По този начин, полипептиди и протеини могат да бъдат насочвани за терапевтични или диагностични цели. BR43x2 полипептид може да бъде насочен към две или повече структури, такива като афинитетен таг за пречистване и целеви домен. Полипептидни смеси могат също да съдържат един или повече разцепващи сайтове, в частност между домени. Tuan et al., *Connect. Tiss. Res.* 34:1-9, 1996. Смеси от такъв тип също могат да бъдат използвани, например към афинитетен пречистващ приближен лиганд от разтвор, като *in vitro* анализно средство за блокиране на сигнали *in vitro*, чрез специфично титриране на лиганда към свързване на лиганд върху клетъчна повърхност или като BR43x2 антагонисти *in vivo*, чрез прилагането им за блокиране на лигандната стимулация. Например в изследване, сместа от протеини може да бъде свързана за поддържане през F_c регион и използвана в ELISA формат.

Изобретението също се отнася до разтворими BR43x2 рецептори и полипептидни фрагменти, използвани да образуват смес от протеини с афинитетни тагове или означения. Разтворими BR43x2-афинитетни тагове смеси протеини са използвани например за идентификация на BR43x2 лиганди, както и като агонисти и антагонисти на природни лиганди. Използвайки означен, разтворим BR43x2 чрез флуоресцентна имуносиметрия или имунохистохимия са идентифицирани клетки, експресиращи лиганда, агонисти или антагонисти. Разтворимите смесени протеини се използват при изучаването на пренос на лиганда върху тъкани или специфични клетъчни линии и да осигурят яснота в рецептор/лиганд биологията.

За пречистване на лиганд, агонисти или антагонисти се добавя BR43x2 - Ig смесен протеин към проба, съдържаща лиганд, агонист или антагонист при условия, които улесняват рецептор-лиганд свързване (най-често температура, рН и йонна сила близки до физиологичната). След това рецептор-лиганд комплексът се отделя чрез смес, използвайки протеин А, който е имобилизиран върху твърда подложка (например неразтворими смолни зърна). Лигандът, агонист, антагонист след това се промива по конвенционални

химически методи, като например със сол или рН градиент. В алтернативен случай смесеният протеин сам може да се свърже към твърда подложка с връзка или промиване, както е посочено по-горе. Методи за имобилизиране на рецептор полипептид към твърда подложка, като например зърна от агароза, кръстосано-свързана агароза, стъкло, целулозни смоли, силициеви смоли, полистирен, кръстосано-свързан поликриламид или други подобни материали, които са стабилни при тези условия на използване, са известни в областта на техника. Методи за свързване на полипептиди към твърди подложки са също известни и включват аминокимия, цианогенна бромидна активация, N-хидроксисукцинимидна активация, епоксидна активация, сулфхидрилна активация и хидразид активация. Получените среди най-общо са под формата на колона и флуиди, съдържащи лиганд, които минават през колоната един или повече пъти, докато лигандът се свърже към рецепторния полипептид. Лигандът след това се промива чрез промени в солевата концентрация, хаотропични агенти ($MnCl_2$) или рН до разрушаване на лиганд-рецепторното свързване.

За да се насочи изнасянето на разтворимия рецептор от клетката-гостоприемник, разтворимият рецептор DNA се свързва към втори DNA сегмент, кодиращ секреторен пептид, като например t-РА секреторен пептид. За да улесни пречистването на секреторния рецептор домен, към рецепторен полипептид може да бъде добавено N- или C- терминално удължение, като например афинитетен таг или друг полипептид или протеин, за който е подходящо антитяло или друг специфичен свързващ агент.

Съгласно настоящото изобретение в скрининг изследвания се използват клетки, които експресират функционално разтворими и мембранно свързани рецептори. Множество подходящи изследвания са известни в областта на техниката. Тези изследвания се базират на откриването на биологичен отговор в целева клетка. Промяна в метаболизма, сравнена с контролна стойност показва тест-соединение, което модулира BR43x2 променен метаболизъм. Едно такова изследване е клетъчно пролиферативно изследване. Клетки се

културират в присъствие или отсъствие на тест съединение и клетъчна пролиферация се открива например чрез измерване на включването на тритиев тимидин или чрез колориметрично изследване на база на метаболитно прекъсване на 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)2,5-дифенил тетразол бромид (МТТ) (Mosman, J. Immunol. Meth. 65:55-63, 1983). При едно алтернативно изследване се използват клетки, които са допълнително обработени да експресират репортерен ген. Репортерният ген е свързан към усилващ елемент (промотер), който е отговорен за рецептор-свързания канал и изследването открива активация на транскрипция на репортерния ген. В областта на техниката са известни голям брой репортерни гени, които са лесно проучвани за клетъчни екстракти, например *E.coli*, хлорамфеникол ацетил трансфераза (САТ) и серумен отговор елемент (SRE) (Shaw et al., Cell 56:563-72, 1989). Такъв препоръчителен репортерен ген е луциферазен ген (Wet et al., Mol. Cell. Biol. 7:725, 1987). Експресията на луциферазен ген се открива чрез луминисценция като се използват методи, известни в областта на техниката (Baumgartner et al., J. Biol. Chem. 269:29094-101, 1994; Schenborn and Goiffin, Promega Notes 41:11, 1993). Луциферазни активностни изследователски кита са търговско достъпни, например от Prmega Corp., Medison, WI. Целеви клетъчни линии от този тип могат да се използват за скринингови библиотеки на химикали, клетъчно-условни културални среди, гъбни бульони, почвени примери, водни примери и други подобни. Например банка на клетъчно-условни среди могат да бъдат изследвани върху целева клетка за идентифициране на клетки, които продуцират лиганд. След това позитивни клетки се използват за продуциране на cDNA библиотека при бозайников експресионен вектор, която е разделена в гнезда, трансфектирани в гостоприемникови клетки и експресирани. След това проби на среди от трансфектирани клетки се изследват с последващо деление на гнезда, ре-трансфекция, субкултуриране и повторно изследване на позитивни клетки до изолиране на клонирани клетки DNA, кодиращи лиганд.

Могат да бъдат успешно използвани система за изследване, която използва лиганд-свързващ рецептор (или антитяло, един член на

комплемент/анти-комплементна двойка) или техен свързващ фрагмент и търговско достъпен биосензорен инструмент (BIAcore®, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NY). Такъв рецептор, антитяло, член на комплемент/анти-комплементна двойка или техен свързващ фрагмент е имобилизиран върху повърхността на рецепторен чип. Използване на този инструмент е разкрито от Karlsson, J. *Immunol. Meth.* 145:229-40, 1991 и Cunningham and Wells, J. *Mol. Biol.* 234:554-63, 1993. Например BR43x2 полипептид, фрагмент, антитяло или член на комплемент/анти-комплементна двойка е ковалентно прикрепен чрез използване на амин или сулфхидрилен химизъм към декстранови влакна, които са прикрепени към златен филм вътре в клетката. Изследваният образец преминава през клетката. Ако лиганд, епитоп или противоположен член на комплемент/антикомплементна двойка присъства в тази проба, то те ще се свържат с имобилизирания рецептор, антитяло или член, съответно предизвикващ промяна в рефрактивния индекс на средата, която е открита кат промяна в повърхностно плазмения резонанс на златния филм. Тази система позволява определянето на повърхностните и отместени стойности, от които може да се изчисли и оцени стехиометрично свързващият афинитет. Лиганд свързващи рецепторни полипептиди могат също да бъдат използвани в други опитни системи, известни в областта на техниката. Такива системи включват графични анализи за определяне на свързващ афинитет (например Scatchard, *Ann. NY Acad. Sci.* 51:660-72, 1949) и калориметрични опити (Cunningham et al., *Science* 253:545-48, 1991; Cunningham et al., *Science* 245:5821-25, 1991).

Scatchard плот анализ за разтворим I^{125} -ztnf4p, свързващ към TAC1 и BCMA е показан във Фигура 2 и е сравнен със свързващите константи на други членове на TNFR фамилията в Таблица 7.

ТАБЛИЦА 7

Лиганд	kd M	Клетъчен източник	Отпратка
TNFa high	7.14E-11	HL-60	a
TNFa low	3.26E-10	HEP-2	a
TNFa high	2.00E-10	HL-60	b
CD27L	3.70E-10	MP-1	c
CD27L	8.30E-09	MP-1	c
CD40L	5.00E-10	EL40.5	d
CD40L	1.00E-09	EBNA	d
(125I-CD40)			
4-1BBL	1.16E-09	Biacore	e
Anti 41Bbmab	4.14E-10	Biacore	e
Ztnf4 ztnf4 sol.	1.25E-09	TACI-BHK	
Ztnf4 ztnf4 sol.	1.25E-09	BCMA-BHK	

a Hohman et al., J.Biol. Chem. 264:14927-34,1989

b Manna and Aggarwal, J.Biol. Chem. 273:33333-41, 1998

c Goodwin al., Cell 73:447-56, 1993

d Armitage et al. Nature 357:80-82, 1992

e Shuford et al., J.Exp. Med. 186:47-55, 1997

Активността на BR43x2 полипептид като рецептор може да бъде измерена чрез силиконов биосензорен микрофизиометър, който мери извънклетъчната киселинна степен или протон-отделянето, свързано с рецепторно свързване и последващи физиологични клетъчни отговори. Едно примерно устройство е Cytosensor Microphysiometer®, произведено от

Molecular Devices, Sunnyvale, CA. С този метод могат да бъдат измерени различни клетъчни отговори, такива като клетъчна полифeрация, йонен транспорт, енергийна продукция, възпалителен отговор, регулаторна и рецепторна активация и други подобни. Например McConnell et al., *Science* 257:1906-12, 1992; Pitchford et al., *Meth. Enzymol.* 228:84-108, 1997; Arimilli et al., *J. Immunol. Meth.* 212:49-59, 1998; Van Liefde et al., *Eur. J. Pharmacol.* 346:87-95, 1998. Микрофизиометърът може да бъде използван за изследване на адхерентни или неадхерентни еукариотични или прокариотични клетки. Чрез измерване на извънклетъчни киселинни промени в клетъчна среда за определено време, микрофизиометърът пряко измерва клетъчните отговори към различни дразнителни, включващи агонисти, лиганди или антагонисти на BR43x2 полипептид. За предпочитане микрофизиометърът се използва за измерване на отговори на BR43x2-експресираща еукариотична клетка, сравнена с контролна еукариотична клетка, която не експресираща BR43x2 полипептид. BR43x2-експресиращи еукариотични клетки съдържат клетки, в които BR43x2 е трансфектиран, както е описано тук, създавайки клетка, която отговаря на BR43x2-модулиращ дразнител; или клетки, природно експресиращи BR43x2, такива като BR43x2-експресиращи клетки, получени от далачна тъкан. Разлики, измерени чрез смяна в извънклетъчна киселинност, например повишаване или намаляване в отговора на клетки, експресиращи BR43x2, съпоставимо с контрола, са пряко измерени от BR43x2-модулирани клетъчни отговори. Освен това, такива BR43x2-модулирани отговори могат да бъдат изследвани при различни дразнителни. Чрез използване на микрофизиометър се предлага и метод за идентифициране на агонисти и антагонисти на BR43x2 полипептид, който включва осигуряване на клетки, експресиращи BR43x2 полипептид, културиране на първа порция на клетките в отсъствие на тест-съединение, културиране на втора порция на клетките в присъствие на тест-съединение и откриване на промяна, например повишаване или намаляване в клетъчния отговор на втората порция на клетките, в сравнение с първата порция на клетките. Промяната в клетъчния отговор е

показана като измерима променена извънклетъчна киселинна степен. Чрез този метод могат да бъдат идентифицирани антагонисти и агонисти за BR43x2 полипептид.

Разтворимият BR43x2 се използва при изследване на разпределението на лиганди в тъкани или специфични клетъчни линии за изясняване на рецептор/лиганд биологията. Може също да бъде приложено при специфицирането на TNF рецептори за техни лиганди като механизъм, чрез който се разграждат лиганд-носещите целеви клетки. Например токсични съединения, като радиофармацевтици, които инактивират целеви клетки; хемотерапевтични агенти, като доксорубин, даунорубицин, метотрексат и цитоксан; токсини, такива като рицин, дифтерия, *Pseudomonas* екзотоксин А и абрин; и антитела към токсични Т-клетъчно повърхностни молекули.

Ztnf4 (5 ng/ml) е установено, че са свързани към BR43x2 (SEQ ID NO:2), TACI (SEQ ID NO:6), BCMA (SEQ ID NO:8) и BR43x2 (SEQ ID NO:9) чрез FACS анализ (Flow Cytometry and Sorting, Melamed et al., eds. Wiley-Liss, 1990 and Immunofluorescence and Cell Sorting, Current Protocol in Immunology, Vol.1, Coligan et al., John Wiley & Son, 1997). FITC-тагов разтворим ztnf4 също е препоръчан за специфично свързване и на В лимфоцити в PBMNC, клетки от сливици, към В клетъчни лимфомно клетъчни линии (Raji, Burkitt's human lymphoma, ATCC CCL86), Ramos (Burkitt's human lymphoma cell line, ATCC CRL-1596), Daudi (Burkitt's human lymphoma, ATCC CCL213) и RPMI 1788 (В лимфоцитно клетъчна линия, ATCC CCL-156) чрез използване на FACS анализ. Не е наблюдавано свързване с HL-60 (ATCC промиелоцитна клетъчна линия, ATCC CCL-240). Спецификата на свързване към В клетки от PBMNC и клетки от сливици е потвърдено от ко-оцветяване с антитела в В клетъчно специфични молекули, включващи CD19, IgD, IgM и CD20. Близостта на ztnf4 към CD40L предполага по-широко тъканно разпространение, отколкото изглежда. Афинитетът на ztnf4 е изследван върху моноцити, дентритни клетки и пречистени Т клетки, използващи цитокин пролиферация, например Т клетъчно пролиферативно изследване, и не би могъл да открива свързване на

ztnf4 или друг биологичен ефект върху друг тип изпитани клетки. Въпреки това, специфичността за В клетки от лиганда и рецептора предполага, че те са полезни за изследване и лечение на автоимунност, В клетъчни канцери, имуномодулация, IBD и всяка антитяло-променена патология, например ITSP, миастения гравис и подобни, бъбречни заболявания, непряк Т клетъчен имунен отговор, реакция на отхвърляне при присаждане, заболяване на отхвърляне на гостоприемника.

Ztnf4 е показан при активиране на В клетки, произтичащи от В клетъчна пролиферация, антитяло продукция и up-регулация на активирани маркери *in vitro* (виж примерите по-долу). Тези ефекти могат да изискат ко-стимулация през IL-4 или други цитокини или стимулация през В клетъчен антиген рецептор или други клетъчно повърхностни рецептори, които активират В клетки, например CD40. Други туморно некротично факторни лиганди, като gp39 и TNF β , също стимулират В клетъчна пролиферация. По този начин полипептидите съгласно настоящото изобретение могат да бъдат насочени към специфично регулирани В клетъчни отговори, инхибиращи активирани В клетки по време на имунния отговор без засягане на други клетъчни популации, което е предимство при лечението на болести. Освен това полипептидите съгласно настоящото изобретение могат да бъдат използвани за модулиране на В клетъчно развитие, развитие на други клетки, антитяло продукция и цитокинова продукция. BR43x2 полипептиди могат също да намерят приложение за предизвикване на апоптоза и/или алергия в клетките. Полипептидите съгласно настоящото изобретение могат също да модулират Т и В клетъчна комуникация чрез неутрализиране на пролиферативните ефекти на ztnf4. Био-изследвания и ELISA са възможни за измерване на клетъчен отговор към ztnf4 в присъствие на разтворим BR43x2, TACI и/или BCMA. Други опити включват онези, които измерват разликите в цитокинова продукция като мярка за клетъчен отговор (например Current Protocol in Immunology ed. John E. Coligan et al., NIH, 1996); опити за измерване на други

клетъчни отговори, включващи антитяло изотип, моноцитна активация, НК клетъчна формация, антиген присъстваща клетъчна функция, апоптоза.

BR43x2 полипептидите съгласно настоящото изобретение биха били полезни за неутрализиране на ефектите на *ztnf4* за лечение на пре-В или В-клетъчна левкемия, като плазмено клетъчна левкемия, хронична или акутна лимфоцитна левкемия, миелом като мултиплетен миелом, плазмено клетъчен миелом, ендотелен миелом и гигантски клетъчен миелом; лимфоми като не-Хочкинов лимфом, който е свързан с нарастването на *ztnf4* полипептиди. Разтворимият BR43x2 може да бъде полезен компонент при лечебен режим за инхибираща туморна прогресия и възстановяване.

Northern blot анализ показва *ztnf4* експресирано в CD8⁺ клетки, моноцити, дендроцити, активирани моноцити. Това предполага, че в някои автоимунни разстройства, цитотоксични Т-клетки могат да стимулират В-клетъчна продукция чрез излишък на продуциране на *ztnf4*. Имуносупресивните протеини, които селективно блокират действието на В-лимфоцити могат да бъдат използвани при лечение на заболявания. Продуцирането на автоантитяло е типично за няколко автоимунни заболявания и е разпространено при тъкънно разграждане и обостряне на заболявания. Автоантитела могат също да доведат до наблюдаване на имунно комплексно разместващи усложнения и до много симптоми на системен лупус еритроматозис, включващ бъбречни заболявания, невралгични симптоми и смърт. Модулираща антитяло продукция, независима от клетъчен отговор също би могла да бъде успешна при много болестни състояния. В клетки също могат да бъдат показани като играещи роля в секрецията на артритогенни имуноглобулини в ревматоиден артрит (Korganow et al., *Immunity* 10:451-61, 1999). Самата инхибиция на *ztnf4* антитяло продукцията би била успешна при лечение на автоимунни заболявания като миастения гравис и ревматоиден артрит. Имуносупресанти терапевтици като разтворим BR43x2, който селективно блокира или неутрализира действието на В-лимфоцити, могат успешно да се използват за такива цели. За да се проверят тези способности в

BR43x2 разтворими рецепторни полипептиди съгласно настоящото изобретение, такива BR43x2 полипептиди се оценяват чрез използване на опити, известни в областта на техниката и описани тук.

Изобретението се отнася и до методи, използващи BR43x2, TAC1 или ВСМА полипептиди, смеси, антитела, агонисти или антагонисти за селективно блокиране или неутрализиране на действията на В- клетки във връзка с крайни стадии на бъбречни заболявания, които могат или не могат да бъдат свързани с автоимунни заболявания. Такива методи биха могли да бъдат полезни за лечение на гломерулонефрит, свързан със заболявания, като например мембранна нефропатия, IgA нефропатия или Бергерова болест, IgM нефропатия или Гудпастьорова болест, след- инфекциозни гломерулонефрити, мезангио-пролиферативни заболявания, малко променен нефричен синдром. Такива методи могат също да се наложат като терапевтични приложения за лечение на вторични гломерулонефрити или васкулити, свързани с такива заболявания като лупус, полиартрит, Henoch-Schonlein, склеродерма, HIV-зависими заболявания, амилоидози или хемолитичен уремичен синдром. Методите съгласно настоящото изобретение могат също да бъдат използвани като част от терапевтични приложения за лечение на интерестициален нефрит или пиелонефрит, свързан с хроничен пиелонефрит, злоупотреба с аналгетици, нефрокалциноза, нефропатия предизвикана от други агенти, нефролитиаза или хроничен или остър интерестициален нефрит.

Методите съгласно настоящото изобретение също включват използване на BR43x2, TAC1 или ВСМА полипептиди, смеси, антитела, агонисти или антагонисти при лечението на хипертензивни или сърдечно-съдови заболявания, включващи бъбречно-артериална стеноза или непроходима и холестеролна емболия или бъбречна емболия.

Методите съгласно настоящото изобретение се отнасят също до диагноза и лечение на бъбречни или урологични неоплазми, мултиплетни миеломи, лимфоми, леко верижни невропатии или амилоидози.

Изобретението се отнася и до методи за блокиране или инхибиране на активирането на В клетки, използващи BR43x2, TAC1 или ВСМА полипептиди, смеси, антитела, агонисти или антагонисти за лечение на астма и други хронични заболявания на дихателните пътища, като бронхит и емфизема.

Съгласно изобретението са разкрити и методи за инхибиране или неутрализиране на ефекторен Т клетъчен отговор, използващ BR43x2, TAC1 или ВСМА полипептиди, смеси, антитела, агонисти или антагонисти за използване в имunosупресия, в частност за терапевтична употреба при реакция на отхвърляне и трансплантационни обратни заболявания. Друго приложение може да бъде при регулиране на имунен отговор, в частност активиране и регулиране на лимфоцити. BR43x2, TAC1 или ВСМА полипептиди, смеси, антитела, агонисти или антагонисти могат да се използват при терапия и лечение на имунна недостатъчност. BR43x2, TAC1 или ВСМА полипептиди, смеси, антитела, агонисти или антагонистимогат да се използват при терапевтични указания за лечение на такива автоимунни заболявания като инсулино зависим диабетен мелитус (IDDM) и болест на Крон. Методите съгласно настоящото изобретение могат да имат допълнителна терапевтична стойност при лечение на хронични възпалителни заболявания, в частност за намаляване на ставна болка, преглъщане, анемия и други свързани симптоми, както и за лечение на септичен шок.

Ефектът от разтворими BR43x2, TAC1 или ВСМА полипептиди и смес от протеини върху имунен отговор може да бъде измерен чрез прилагане на полипептидите съгласно настоящото изобретение върху животни, имунизирани с антиген, последвано от инжектиране на ztnf4 и измерване на антитяло изотопната продукция и В и Т клетъчни отговори, включващи забавен тип хиперсензивност и ин витро пролиферация и цитокинна продукция съгласно методите известни в областта на техника.

Настоящото изобретение се отнася и до метод за инхибиране на ztnf4 активност при бозайници, включващо прилагане към тези бозайници на

количество съединение, избрано от групата, съдържаща: а) полипептид от SEQ ID NO:4; б) полипептид от SEQ ID NO:8; в) смесен протеин; г) полипептид от SEQ ID NO:6 от аминокиселинен остатък 1 до остатък 166; д) полипептид от SEQ ID NO:8 от аминокиселинен остатък от 1 до остатък 150; е) антитяло или антитяло фрагмент, който се свързва специфично към полипептид от SEQ ID NO:4; и ж) антитяло или антитяло фрагмент, който се свързва специфично към полипептид от SEQ ID NO:10. Примери за смесени протеини са смеси на разтворими BR43x2 (SEQ ID NO:4), TAC1 (от аминокиселинен остатък 1 до остатък 166 на SEQ ID NO:6) или BCMA (от аминокиселинен остатък от 1 до остатък 150 на SEQ ID NO:8) с друг полипептид, за предпочитане имуноглобулин тежко верижен постоянен регион F_c фрагмент. Изобретението се отнася и до метод за инхибиране на BR43x2, TAC1 или BCMA рецептор-лигандно образуване.

Такива методи биха могли да бъдат частично използвани където ztnf4 активността е свързана с активирани В лимфоцити и при лечение на пре-В клетъчни или В-клетъчни тумори. Такива методи могат също да бъдат използвани където ztnf4 активността е свързана с антитяло продукция, в частност антитяло продукция, свързана с автоимунни заболявания, като системен лупус еритроматозис, миастения гравис или ревматоиден артрит.

Настоящото изобретение се отнася и до BR43x2 агонисти и антагонисти. Съединения, идентифицирани като BR43x2 агонисти, се използват за модифициране на полиферацията и развитието на целеви клетки *in vitro* и *in vivo*. Например, агонист съединения се използват единично или в комбинация с други цитокини и хормони, като компоненти на определена клетъчно културална среда. По този начин агонистите се използват в специфично медиране на растежа и/или развитието на BR43x2-носеци В лимфоцитни клетки в култура. Агонисти и антагонисти могат също да бъдат полезни при изследване на ефекторни функции на лимфоцити, в частност В лимфоцитна активация и диференциация. Антагонистите се използват като реагенти при изследвания за характеризирание на лиганд-рецепторно взаимодействие.

Съединения, идентифицирани като BR43x2 антагонисти, се използват и за повишаване на хуморалния имунен отговор. В- клетъчните отговори са важни при борба с инфекциозните заболявания, включващи бактериални, вирусни, протозойни и паразитни инфекции. Антитела срещу инфекциозни микроорганизми могат да имобилизират патогена чрез свързване към антиген, последвано от комплемент медиран лизис или клетъчно медирана атака. BR43x2 антагонист може да предизвика повишаване на хуморалния отговор и би могъл да се използва лечебно при индивиди в риск за инфекциозни заболявания или като добавка към ваксинация.

Изобретението се отнася и до антагонисти, които също се свързват към BR43x2 полипептиди или алтернативно към лиганд, към който е свързан BR43x2 полипептид, като по този начин инхибират или елиминират функцията на BR43x2. Такива BR43x2 антагонисти могат да включват антитела; олигонуклеотиди, които се свързват или с BR43x2 полипептид, или с негов лиганд; природни или синтетични аналози на BR43x2 лиганди, които запазват способността да свързват рецептора, но не предизвикват сигнал при всеки лиганд или рецептор. Такива аналози могат да бъдат пептиди или пептидоподобни съединения. Природни или синтетични малки молекули, които се свързват към BR43x2 полипептиди и предпазват сигнала, също могат да бъдат антагонисти. Също така BR43x2 антагонисти могат да се използват като терапевтични средства за лечение на познати заболявания, където блокиращи сигнали от такъв BR43x2 рецептор или лиганд ще бъдат благотворни. Антагонистите са полезни като изследователски реагенти за характеризиране на лиганд-рецепторно взаимодействие. BR43x2 се експресира върху трансформирани В клетъчни линии, включващи EBV индуциран и спонтанен лимфом на Буркит и няколко В клетъчни миеломи. Инхибиране на функцията на BR43x2 може да бъде използвано при лечение на В клетъчен лимфом или множествен миелом. BR43x2 антагонисти, като BR43x2 разтворими рецептори или антитела, могат да бъдат използвани лечебно да предизвикват туморно повлияване.

Активността на агонисти и антагонисти може да бъде определена чрез тестове за активност, които определят силата на рецептор/лиганд свързването. Стабилно трансфектирани В-клетъчни линии, като Baf3 (murine pre-B cell line Palacios and Steinmetz, and Mathey-Prevot et al.,), които ко-експресират високи нива на репортерно генна конструкция, са създадени за NfKB, NFAT-1 и AP-1, които експресират BR43x2. Клетъчни линии, експресиращи TAC1 и BCMA, също се получават по подобен начин и при Jurkat и други В лимфомни клетъчни линии. Установено е, че Ztnf4 сигнализира чрез репортерните гени в тези конструкции. За измерване на свързването могат да бъдат използвани разтворими BR43x2 и антитела.

Един *in vivo* подход за изследване на протеини съгласно настоящото изобретение включва вирусни преносни системи. Примерни вируси за тази цел са адено-вируси, херпес-вируси, ваксинален вирус и адено-свързан вирус (AAV). Аденовирус, двойно-верижен DNA вирус е по-настоящем най-добре изследваният генен трансферен фактор за пренасяне на хетерологна нуклеинова киселина (Becker et al., *Meth. Cell Biol.* 43:161-89, 1994; and Douglas and Curiel, *Science & Medecine* 4:44-53, 1994). Аденовирусните системи предлагат няколко предимства: аденовирусът може: (i) да приеме относително голямо множество DNA вметвания; (ii) може да нарастне до висок титър; (iii) може да инфектира голям брой от различни клетки на бозайници; и (iv) може да се използва с голям брой от наличните вектори, съдържащи различни промотери. Също така, поради това, че аденовирусите са стабилни в кръвния поток, те могат да се прилагат чрез интравенозно инжектиране.

Чрез отделяне на порции от аденовирусния геном могат да бъдат привлечени по-голям брой вметвания на хетерологова DNA (до 7 kb). Тези вметвания могат да бъдат включени във вирусната DNA чрез пряко свързване или хомоложна рекомбинация с ко-трансфектен плазмид. В една примерна система съществуващият E1 ген се отделя от виралния вектор и вирусът не се удвоява, освен ако E1 генът е от гостоприемниковата клетка (човешката 293 клетъчна линия е пример). Когато се прилага интравенозно при здрави

животни, аденовирусите преимуществено се насочват в черния дроб. Ако аденовирусна преносна система има E1 генна липса, вирусът няма да се удвои в гостоприемниковите клетки. Въпреки това, гостоприемниковата тъкан (например черен дроб) ще експресира и произведе (и ако присъства сигнална последователност, секретира) хетерологов протеин. Секретирани протеини ще влязат в циркулацията на силно васкуларизирания черен дроб и могат да бъдат определени ефектите върху инфектираното животно.

Аденовирусните системи могат също да се използват за протеиново продукция *ин витро*. Чрез културиращи аденовирусно-инфектирани не-293 клетки при условия, при които клетките не се делят бързо, клетките могат да продуцират протеини за продължителен период от време. Например, ВНК клетки се развиват до сливане в клетъчни фактори, след което се подлагат на аденовирусно векторно кодиране на съответния секретирани протеин. Клетките след това израстват при свободни от серум условия, които позволяват на инфектирани клетки да се възстановят до няколко седмици без значително клетъчно делене. Алтернативно, аденовирусно векторно инфектирани 293S клетки могат да израстват в суспензионна култура при съответна висока клетъчна плътност до получаване на значими количества на протеин (Garnier et al., *Cytotechnol.* 15:145-55, 1994). По същия начин един експресиран, секретирани хетерологов протеин може да бъде повторно изолиран от клетъчно културалния супернатант. По правилата за инфектирана 293S клетъчна продукция могат да бъдат ефективно получени не-секретирани протеини.

Добре установени животински модели са достъпни за изследване *ин vivo* ефикасност на разтворими BR43x2, TAC1 или BCMA полипептиди съгласно настоящото изобретение при познати болестни състояния. В частност, разтворими BR43x2, TAC1 или BCMA полипептидни фрагменти могат да се изследват при *ин vivo* при голям брой животински модели на автоимунни заболявания, като MRL-lpr или NZB x NZW F1 конгенни породи мишки, които служат като модел на SLE (системен еритроматозин лукус). Такива животински модели са известни в областта на техниката, например

Модели за автоимунни заболявания, Guidebook, Cohen and Miller eds. Academic Press. Резултат на кръстосване между новозеландски черни мишки (NZB) и новозеландски бели мишки (NZW) развиват спонтанна форма на SLE, която е много сходна на SLE при хора. Получените мишки, известни като NZBW, образуват IgM автоантитела срещу T- клетки на възраст един месец и след 5-7 месечна възраст IgM анти-DNA автоантителата са доминантния антиглобулин. Поликлоналната В-клетъчна хиперактивност води до хиперпродукция на автоантитела. Премахването на тези авто-антитела, по-специално на тези, насочени срещу единично верижна DNA, е свързано с развитие на гломерулонефрит, който се проявява клинично като протеинурия, азотемия и смърт от бъбречна недостатъчност. Бъбречната недостатъчност е водеща причина за смъртта на мишките, засегнати от спонтанна SLE, и при NZBW породи този процес е хроничен и унищожителен. Болестта е по-бърза и силна при женски животни, отколкото при мъжки с продължителност на живот само 245 дни, в сравнение с 406 дни за мъжките животни. Докато много от женските животни са симптоматични (протеинурия) при 7-9 месечна възраст, при развиването на симптоми някои могат да бъдат много по-млади или по-стари. Фаталният имунен нефрит, наблюдаван при NZBW мишки, наподобява много гломерулонефрита, наблюдаван при човешка SLE, което прави този спонтанен муринов модел много подходящ за изследване на потенциални SLE терапевтични средства. (Putterman and Naparstek, Муринов модел на спонтанен системен еритроматозен лупус, модели за автоимунни заболявания: Guidebook, Chapter 14, pp. 217-34, 1994; Mohan et al., J.Immunol. 154:1470-80, 1995, and Daikh et al., J.Immunol. 159:3104-09, 1997). Прилагането на разтворим TACI -Ig, BR43x2-Ig или BCMA-Ig или други разтворими протеини и смеси върху тези мишки за оценка на ефикасността на TACI, BR43x2 или BCMA за подобряване на симптоми и изменения на курса на болестта, е описано по-долу в примерната част.

Като инструмент за едновременно откриване на механизма на имунно-повлияна болест и методи за потенциално терапевтични намеси се използват

модели на мишки за експериментален алергичен енцефаломиелит (ЕАЕ). Моделът наподобява човешка мултиплетна склероза и предизвиква демиелизация като резултат на Т-клетъчна активация към невропротеини, такива като миелин базов протеин (МВР) или протеолипиден протеин (РLР). Инокулация с антиген води до индукция на CD4+, клас II МНС-ограничени Т-клетки (Th1). Промени в реда за ЕАЕ могат да предизвикат остър, хроничен рецидив или пасивен транспортен вариант на модела (Weinberg et al., *J. Immunol.* 162:1818-26, 1999; Mijaba et al., *Cell. Immunol.* 186:94-102, 1999; Glabinski, *Meth. Enzym.* 288:182-90, 1997). Прилагането на разтворим TACI-IG, BR43x2-Ig, BCMA-Ig или други разтворими протеини или смеси към тези мишки за оценяване ефикасността на TACI, BR43x2 или BCMA за подобряване на симптоми и изменения при курса на заболяването, е описано по-долу в примерната част.

В колаген-индуциран артритен (CIA) модел мишки развиват хроничен възпалителен артрит, който силно наподобява човешки възпалителен артрит (RA). Тъй като CIA има сходни имунологични и патофизиологични признаци с RA, това го прави идеален модел за скрининг потенциални човешки противовъзпалителни съединения. Друго предимство при използване на CIA модел е това, че механизмите на патогенеза са известни. Идентифицирани са Т- и В-клетъчните епитопи върху тип II колаген и са определени множество имунологични параметри (забавен тип хиперсензитивност и анти-колаген антитяло) и възпалителни (цитокини, хемокини и матрикс-деградиращи ензими), отнасящи се до имуно-медиращ артрит, които могат да бъдат използвани за оценка на ефикасността на тест съединение в моделите (Wooley, *Curr. Opin. Rheum.* 3:407-20, 1999; Williams et al., *Immunol.* 89:9784-788, 1992; Myers et al., *Life Sci.* 61:1861-78, and Wang et al., *Immunol.* 92:8955-959, 1995). Прилагането на разтворими TACI-IG, BR43x2-Ig, BCMA-Ig или други разтворими протеини или смеси към тези мишки за оценяване ефикасността на BR43x2, TACI или BCMA за подобряване на симптоми и изменения при курса на заболяването, е описано по-долу в примерната част.

Могат да бъдат създадени модели на бронхиална инфекция като астма, когато мишки са инфектирани с овалбумин и са ре-стимулирани назално с антиген, който продуцира астматичен отговор в бронхите, подобен на астма. Прилагането на разтворими TACI-Ig, BR43x2-Ig, BCMA-Ig или други разтворими протеини или смеси към тези мишки за оценяване ефикасността на BR43x2, TACI или BCMA за подобряване на симптоми и изменения при курса на заболяването, е описано по-долу в примерната част.

Друга употреба за ин виво модели включва пренос на антиген-предизвикване към животното, последвано от прилагане на разтворим BR43x2 (TACI) или негов лиганд *ztnf4* и измерване на Т и В клетъчен отговор.

Т клетъчно зависим и Т клетъчно независим имунен отговор може да бъде измерен както е описано от Perez-Melgosa et al., *J. Immunol.* 163:1123-7, 1999.

Имунен отговор при животни, подложени на постоянна антигенна обработка (например, овалбумин или колаген), последвано от прилагане на BR43x2, TACI или BCMA полипептиди или разтворими Ig-смеси може да бъде извършено за измерване на ефект върху клетъчен отговор.

Фармакокинетични изследвания могат да бъдат използвани във връзка с радиологично белязани, разтворими BR43x2, TACI или BCMA полипептиди или смеси за определяне на разпространението и полу-живото на такива полипептиди ин виво. Допълнително животински модели могат да бъдат използвани за определяне на ефектите на разтворими BR43x2, TACI или BCMA върху тумори и туморен растеж ин виво.

Предвижда се също така използване на BR43x2, TACI или BCMA полипептиди като заместителни маркери за автоимунни заболявания, бъбречни заболявания, В и Т клетъчни заболявания. Такива пациенти могат да получават кръвотечения и BR43x2, TACI или BCMA разтворими рецептори и техни лиганди могат да бъдат откривани в кръвта.

Изобретението предвижда също антитела. Антитела срещу BR43x2 или пептиди с аминокиселинна последователност SEQ ID NO:8 могат да бъдат

получени например чрез използване като антиген на продукт на експресивен вектор, съдържащ желан полипептид или полипептид, изолиран от природен източник. По-специално използвани антители "свързани специфично" с BR43x2 или пептиди с аминокиселинна последователност SEQ ID NO:10. Счита се, че антителата са специфично свързани, ако се свързват с BR43x2 полипептид или полипептида с SEQ ID NO:8, пептид или епитоп със свързващ афинитет (K_a) от $10^6 M^{-1}$ или повече, за предпочитане $10^7 M^{-1}$ или повече, по-добре $10^8 M^{-1}$ или повече и най-добре $10^9 M^{-1}$ или повече. Свързващият афинитет на едно антитяло може да бъде лесно определен от специалист в областта, например чрез Scatchard анализ (Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51:660, 1949). Подходящи антители са антители, които свързват с BR43x2, по-специално извънклетъчен домен на BR43x2 (аминокиселинни остатъци 1-120 на SEQ ID NO:2) и такива, които свързват с полипептиди с аминокиселинна последователност SEQ ID NO:10.

Анти- BR43x2 антители могат да се получат посредством антигенни BR43x2 епитоп-носеци пептиди и полипептиди. Антигенни епитоп-носеци пептиди и полипептиди, съгласно настоящото изобретение, съдържат последователност от поне девет, за предпочитане между 15 и 30 аминокиселини, включени в последователност SEQ ID NO:2. Въпреки това, пептиди или полипептиди, съдържащи голяма част от аминокиселинна последователност съгласно изобретението, съдържащи от 30 до 50 аминокиселини или каквато и да е дължина, и включващи пълна аминокиселинна последователност на полипептид, съгласно изобретението, също се използват за индуциране на антитела, които се свързват с BR43x2. Подходящо е аминокиселинната последователност да е избрана от епитоп-носец пептид за осигуряване на специфична разтворимост във водни разтворители (например последователността да включва съответни хидрофилни остатъци, докато хидрофобните остатъци да се избягват). Хидрофилни пептиди могат да бъдат избрани от специалист в областта на техника от хидрофобен плот, например (Hopp and Woods (Proc. Nat. Acad. Sci.

USA 78:3824-8, 1981) and Kyte and Doolittle (J. Mol. Biol. 157: 105-142, 1982). Освен това аминокиселинни последователности, съдържащи пролинови остатъци, могат да бъдат подходящи за продукция на антитела.

Поликлонални антитела за рекомбинантен BR43x2 протеин или за BR43x2, изолиран от природен източник, могат да бъдат получени чрез използване на методи, известни на специалисти в областта на техниката. Например Green et al., "Production of Polyclonal Antisera" in *Immunochemical Protocols* (Manson, ed), pages 1-5 (Humana Press 1992), and Williams et al., "Expression of foreign proteins in E.coli using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies" in *DNA Cloning 2: Expression Systems*. 2nd Edition, Glover et al., p.15 (Oxford University Press 1995). Имуногенността на BR43x2 полипептид може да бъде повишена чрез използване на адювант, като например алум (алуминиев хидроксид) или пълнен или непълнен адювант на Freund. Полипептиди, използвани за имунизация, са също смесени полипептиди и също така смеси на BR43x2 или части от тях с имуноглобулинов полипептид или малтоза свързващ протеин. Полипептиден имуноген може да бъде молекула с пълна дължина или част от нея. Ако полипептидната част е "Хапеново-подобна", такава част може за предпочитане да се присъедини или свърже към макромолекулен носител (такъв като ключово блюдо хемоциан (KLH), говежди серумен албумин (BSA) или тетанов токсин) за имунизация.

Въпреки че поликлонални антитела най-често се развиват в животни като коне, кучета, птици, плъхове, мишки, зайци, хамстери, гвинеиски прасета, гъски и овце, анти-BR43x2 антитяло съгласно настоящото изобретение може да бъде получено също и от приматно антитяло. Общи техники за развиване на диагностично и терапевтично полезни антитела в бабуни може да бъде намерено например при Goldenberg et al., WO91/11465 and Losman et al., *Int. J. Cancer* 46:310, 1990. Антитела могат също да бъдат получени в трансгенни животни, като например трансгенни овце, крави, гъски или прасета и могат да

бъдат експресирани в бирена мая и гъби в променени форми, както и в бозайникови и инсектни клетки.

Алтернативно могат да бъдат получени моноклонално анти-BR43x2 антителя. Моноклонални тела на RODENT срещу специфични антигени могат да бъдат получени чрез методи, известни за специалистите в областта на техника, например (Kohler et al., Nature 256:495, 1975, Coligan et al., Current Protocols in Immunology, Vol.1 pages 2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons, 1991), Picksley et al., "Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in E.coli" in DNA Cloning 2: Expression Systems, 2nd Edition, Glover et al., page 93 (Oxford University Press 1995).

Най-общо казано, моноклонални антителя могат да бъдат получени чрез инжектиране на мишки със състав, съдържащ BR43x2 генен продукт, потвърждаване на наличието на антитяло продукция чрез отстраняване на серума, отстраняване на далака до получаване на В-лимфоцити, смесване на В-лимфоцитите с миеломни клетки за продуциране на хибридоми, клониране на хибридоми, отделяне на положителни клони, които продуцират антителя срещу антигена, културиране на клони, които продуцират антителя срещу антигена и изолиране на антителата от хибридомните култури.

Освен това едно анти-BR43x2 антитяло съгласно настоящото изобретение може да бъде получено от човешко моноклонално антитяло. Човешки моноклонални антителя се получават от трансгенни мишки, които са създадени да продуцират специфични човешки антителя в отговор на антигенно предизвикване. При този метод, елементи на човешко тежко и леко верижно месторазположение са включени в породи мишки, произхождащи от ембрионално видови клетъчни линии, които съдържат насочени разкъсвания на ендогенни тежко и леко верижни локации. Трансгенните мишки могат да синтезират човешки антителя, специфични за човешки антигени, и мишките могат да се използват за продуциране на човешки антитяло-секретиращи хибридоми. Методи за получаване на човешки антителя от трансгенни мишки

са описани у например от Green et al., Nat. Genet. 7:13, 1994, Lonberg et al., Nature 368:856, 1994 Taylor et al., Int. Immun. 6:579, 1994.

Моноклинални антитела могат да бъдат изолирани и пречистени от хибридомни култури чрез множество добре установени техники. Такива изолационни техники включват афинитетна хроматография с протеин-А сефароза, размер-изключваща хроматография и йонно-обменна хроматография, (виж например Coligan, pages 2.7.1-2.7.12 – 2.9.1-2.9.3; Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)" в Методи в молекулярната биология, Vol. 10, p. 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992).

В определени случаи може да се иска да се получат фрагменти на анти-BR43x2 антитела. Такива антитяло фрагменти могат да бъдат получени например чрез протеолитична хидролиза на антитялото. Антитяло фрагменти могат да бъдат получени чрез пепсиново и папаиново разграждане на цели антитела по конвенционални методи. Като илюстрация, антитяло фрагменти могат да се получат чрез разцепване на антитела с пепсин до получаване на 5S фрагмент, означен като F(ab')₂. Този фрагмент може допълнително да бъде разцепен чрез тиолен редуциращ агент за получаване на 3.5S Fab' моновалентни фрагменти. По желание, разцепващата реакция може да се извърши чрез блокираща група за сулфхидрилните групи, които се образуват от разцепването на дисулфидните връзки. Като алтернатива, ензимно разцепване чрез пепсин води пряко до два моновалентни Fab фрагмента и един Fc фрагмент. Тези методи са описани например от Goldenberg, US 4,331,647, Nisonoff et al., Arch. Biochem. Biophys. 89:230, 1960, Porter, Biochem. J. 73:119, 1959, Edelman et al., in Methods in Enzymology Vol. 1, p.422 (Academic Press 1967) and Coligan.

Могат да бъдат използвани и други методи на разцепване на антитела, такива като сепарация на тежки вериги до образуване на моновалентни леко-тежко верижни фрагменти, допълнително разцепване на фрагментите или други ензимни, химични или генетични техники, доколкото фрагментите се свързват към антитялото, което е признато от цялото антитяло.

Например Fv фрагменти съдържат асоциация от V_H и V_L вериги. Тази асоциация може да бъде не-ковалентно, както е описано от Inbar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2559, 1972. Алтернативно, различните вериги могат да бъдат свързани чрез вътрешно молекулна дисулфидна връзка или кръстосано свързани чрез химикали, например глутералдехид (виж например Sandhu, Crit. Rev. Biotech. 12:437, 1992).

Fv фрагментите могат да съдържат V_H и V_L вериги, които са съединени с пептидно свързващо тяло. Тези единично-верижни антиген-свързващи протеини (scFv) са получени чрез създаване на структурен ген, съдържащ DNA последователност, кодиращи V_H и V_L домени, които са свързани чрез олигонуклеотид. Структурният ген е вместен в експресионен вектор, който е последователно представен в гостоприемникова клетка, като например E.coli. Рекомбинантните гостоприемникови клетки синтезират единична полипептидна верига със свързващ пептид, свързващ мостовидно двата V домена. Методи за получаване на scFv са описани например от Whitlow et al., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:97, 1991, Bird et al., Science 242:423, 1988, Ladner et al., US 4,946,778, Pack et al., Bio/Technology 11:1271, 1993, Sandhu.

Като илюстрация един scFv може да бъде получен чрез въздействие на лимфоцити върху BR43x2 полипептид *ин витро* и селектиране на антитяло заместващи колекции във фагови или подобни вектори (например чрез използване на имобилизиран или белязан BR43x2 протеин или пептид). Гени, кодиращи полипептиди с потенциално BR43x2 пептидно свързващи домени могат да бъдат получени чрез скрининг на произволни пептидни колекции, преместени върху фаг (фагово заместване) или върху бактерия, като E.coli. Нуклеотидни последователности, кодиращи полипептидите, могат да бъдат получени по много начини, като например чрез произволна мутагенеза и произволна полинуклеотидна синтеза. Тези произволни пептидни заместени колекции могат да бъдат използвани за изследване на пептиди, които взаимодействат с известни цели, които могат да бъдат протеин или

полипептид, като например лиганд или рецептор, биологична или синтетична молекула, органична или неорганична субстанция. Техники за създаване и скрининг на такива произволни пептидни колекции са известни от нивото на техниката (Ladner et al., US 5,223,409, Ladner et al., US 4,946,778, Ladner et al., US 5,403,484, Ladner et al., US 5,571,698 and Kay et al., Phage Display of Peptides and Proteins (Academic Press, Inc. 1996)) и произволни пептидни обясняващи колекции и кит за скрининг на такива колекции са търговско достъпни, например от Clontech (Palo Alto, CA), Invitrogen Inc. (San Diego, CA), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) and Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ). Произволни пептидни колекции могат да бъдат изследвани чрез BR43x2 последователностите, разкрити тук, за идентифициране на протеини, които се свързват към BR43x2.

Друга форма на антицяло фрагмент е пептидно кодиране за единично комплементарно-определящ регион (CDR). CDR пептиди (“минимално разпознати части”) могат да бъдат получени чрез създаване на гени, кодиращи CDR на антицялото, представляващо интерес. Такива гени са получени например чрез използване на полимеразна верижна реакция за синтезиране на различни региони от RNA на антицяло, продуциращи клетки (Larrick et al., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:106, 1991), Courtenay-Luck, “Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies”, in Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritter et al., p. 166 (Cambridge University Press 1995), and Ward et al. “Genetic Manipulation and Expression of Antibodies” in Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch et al., p.137 (Wiley-Liss, Inc. 1995).

Алтернативно, едно анти-BR43x2 антицяло може да бъде извлечено от “хуманизирано” моноклонално антицяло. Хуманизираните моноклонални антитела се получават чрез трансфериращи мишки, комплементарно определени региони от тежки и леки изменчиви вериги на миши имуноглобулин в човешки изменчив домен. След това типични остатъци от човешки антитела се заместват в рамкирани региони на муринови двойници.

Използването на антительни компоненти, произхождащи от хуманизирани моноклонални антитела, спомага за избягване на потенциални проблеми, свързани с имуногенността на муринови константни региони. Общи техники за клонирано муринови имуноглобулин-изменчиви домени са описани например от Orlandi et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:3833, 1989. Техники за получаване на хуманизирани моноклонални антитела са описани например от Jones et al., Nature 321:522, 1986, Carter et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89:4285, 1992, Sandhu, Crit. Rev. Biotech. 12:437, 1992, Singer et al., J. Immun. 150:2844, 1993, Sudhir (ed.), Antibody Engineering Protocols (Humana Press, Inc. 1995), Kelley "Engineering Therapeutic Antibodies" in Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland et al., p. 399-434 (John Wiley & Sons, Inc. 1996) и Queen et al., US 5,693,762 (1997).

Поликлонални анти-идиотип антитела могат да се получат чрез имунизирание на животни с анти-BR43x2 антитела или антительни фрагменти по стандартни техники. Например при Green et al., "Production of Polyclonal Antisera, в Methods in Molecular Biology: Immunochemical Protocols, Manson (ed.), pages 1-12 (Humana Press 1992). Също и при Coligan, p. 2.4.1-2.4.7. Алтернативно, моноклонални анти-идиотип антитела могат да бъдат получени чрез анти-BR43x2 антитела или антительни фрагменти като имуногени по начините, описани по-горе. Като друга алтернатива, хуманизирани анти-идиотип антитела или приматни анти-идиотип антитела могат да бъдат получени чрез по-горе описаните техники. Методи за получаване на анти-идиотип антитела са описани например от Irie в US 5,208,146, Greene et al., US 5,637,677 и Varthakavi and Minocha, J. Gen. Virol. 77:1875, 1996.

Антитела или полипептиди могат също да бъдат директно или индиректно включени в лекарствени средства, токсини, радионуклиди и други, и тези конюгати да бъдат използвани за *in vivo* диагностика или терапевтични приложения. Например полипептиди или антитела съгласно настоящото изобретение могат да бъдат използвани за идентифициране или третиране на тъкани или органи, които експресират съответстваща анти-комплементарна

молекула (съответно рецептор или антиген). По-специално BR43x2 полипептиди или анти-BR43x2 антитела или биоактивни фрагменти или части от тях могат да бъдат куплирани до откриваеми или цитотоксични молекули и пренесени към бозайникови клетки, тъкани или органи, които експресират анти-комплементарни молекули.

Подходящи откриваеми молекули могат да бъдат директно или индиректно прикрепени към полипептида или антитялото и включват радионуклиди, ензими, субстрати, ко-фактори, инхибитори, флуоресцентни маркери, хемилуминисцентни маркери, магнитни частици и други подобни. Подходящи цитотоксични молекули могат директно или индиректно да бъдат прикрепени към полипептид или антитяло и включват бактериални или растителни токсини (например дифтериен токсин, *Pseudomonas* екзотоксин, рицин, абрин и др.) както и терапевтични радионуклиди, като йод-131, рений – 188 или итрий-90 (или директно прикрепен към полипептид или антитяло, или индиректно прикрепен чрез хелиращо образуване). Полипептиди или антитела могат също да бъдат включени в цитотоксични лекарствени средства, като адриамицин. За индиректно прикрепване на откриваема или цитотоксична молекула, тя може да бъде включена в член на комплементарно/антикомплементарна двойка, като другият член е свързан към полипептида или частта-антитялото. Примерна комплементарно/антикомплементарна двойка за тези цели е биотин/стрептавидин.

Разтворими BR43x2 полипептиди или антитела към BR43x2 могат да бъдат директно или индиректно конюгирани към лекарства, токсини, радионуклиди и други, и тези конюгати могат да бъдат използвани за *in vivo* диагностика или терапевтична употреба. Например полипептиди или антитела съгласно настоящото изобретение могат да бъдат използвани за идентифициране или третиране на тъкани или органи, които експресират съответстваща анти-комплементарна молекула (съответно, рецептор или антиген). По-специално, BR43x2 полипептиди или анти-BR43x2 антитела или биоактивни фрагменти или техни части могат да се съединяват към

откриваеми или цитотоксични молекули и да се пренасят към бозайникови клетки, тъкани или органи, които експресират анти-комплементарната молекула.

Подходящи откриваеми молекули могат да бъдат директно или индиректно прикрепени към полипептид или антитяло и включват радионуклиди, ензими, субстрати, ко-фактори, инхибитори, флуоресцентни маркери, хемилуминисцентни маркери, магнитни частици и други подобни. Подходящи цитотоксични молекули могат да бъдат директно или индиректно прикрепени към полипептид или антитяло и включват бактериални или растителни токсини (например дифтериен токсин, *Pseudomonas* екзотоксин, рицин, абрин и др.), както и терапевтични радионуклиди, като йод-131, рений-188 или итрий-90 (или директно прикрепен към полипептид или антитяло, или индиректно прикрепен чрез хелиращо образуване). Полипептиди или антитела могат също да бъдат конюгирани към цитотоксични лекарствени средства, като адриамицин. За индиректно прикрепване на откриваема или цитотоксична молекула, тя може да бъде включена в член на комплементарно/ антикомплементарна двойка, като другият член е свързан към полипептида или частта-антитяло. Примерна комплементарно/ антикомплементарна двойка за тези цели е биотин/ стрептавидин.

Такива полипептидни-токсични смесени протеини или антитела/ фрагмент-токсин смесени протеини могат да бъдат използвани за целево клетъчно или тъканно инхибиране или отстраняване (например при лечение на туморни клетки или тъкани). Алтернативно, ако полипептидът има множество функционални домена (например активиран домен или лиганд свързан домен плюс целеви домен), един смесен протеин, включващ само целеви домен, може да бъде подходящ за насочване на откриваема молекула, цитотоксична молекула или комплементарна молекула към определен тип клетка или тъкан. В примерите, където доменът - смесен протеин включва комплементарна молекула, анти-комплементарната молекула може да бъде конюгирана до откриваема или цитотоксична молекула. Такава домен-

комплементарна молекула смесени протеини представлява генеричен целеви носител за клетъчно/тъканно-специфичен пренос на генетична анти-комплементарно-откриваема/цитотоксично молекулени конюгати. Биоактивните полипептидно или антитяло конюгати, описани тук, могат да се пренасят интравенозно, интраартериално или интрадуктално или могат да бъдат въведени локално на желаното място или разположение.

Антителата могат да бъдат превърнати в разтворими BR43x2 полипептиди, които са His или FLAG® тагирани. Антитела могат също да бъдат получени от E.coli, продуцирани MBP-смесени протеини. Алтернативно такива полипептиди могат да включват смесен протеин в човешки Ig. По-специално, антисерум, съдържащ полипептидни антитела срещу His-тагов или FLAG-тагов разтворим BR43x2, може да бъде използван при анализ на тъканно пренасяне на BR43x2 чрез имуно-хистохимия върху човешка или приматна тъкан. Тези разтворими BR43x2 полипептиди могат също да бъдат използвани за имунизация на мишки, за да продуцират моноклонални тела към разтворим човешки BR43x2 полипептид. Моноклонални антитела срещу разтворим човешки BR43x2 полипептид могат да бъдат използвани към симулирано лиганд/рецептор свързване, водещо до активация или инактивация на лиганд/рецептор двойка. Например, показано е, че кръстосано-свързани анти-разтворими CD40 моноклонални антитела осигуряват стимулаторен сигнал към В клетки, които са суб-оптимално активирани с анти-IgM или LPS и води до пролиферация и имуноглобулинова продукция. Тези моноклонални антитела действат като антагонисти, когато се използват в разтвор чрез блокираща активация на рецептора. Моноклонални антитела срещу BR43x2 могат да бъдат използвани за определяне на разпространението, регулирането и биологичното взаимодействие на BR43x2/BR43x2-лиганд двойка върху специфични клетъчни линии, идентифицирани чрез изследване на тъканното разпределение.

Изобретението също се отнася до изолирани и пречистени BR43x2, TAC1 или BCMA полинуклеотидни проби или праймери. Такива

полинуклеотидни проби могат да бъдат RNA или DNA. DNA може да бъде също cDNA или геномна DNA. Полинуклеотидни проби са единични или двойно-верижни RNA или DNA, най-общо синтетични олигонуклеотиди, но могат да се получат от клонирана cDNA или геномни последователности и най-общо съдържат поне 16 нуклеотида, по-често от 17 до 25 и повече нуклеотида, понякога от 40 до 60 нуклеотида, и в някои случаи от 40 до 60 нуклеотида, и в някои примери една специфична част, домен или дори пълен BR43x2 ген или cDNA. Проби и праймери са най-общо синтетични олигонуклеотиди, но могат да произхождат и от клонирана cDNA или геномни последователности или техни комплементи. Аналитични проби ще бъдат най-общо поне 20 нуклеотиди в дължина, въпреки това могат да бъдат използвани и по-къси проби (14-17 нуклеотида). PCR праймери са с дължина поне 5 нуклеотида, за предпочитане 15 или повече, още по-добре 20-30 нуклеотида. Късите нуклеотиди могат да бъдат използвани, когато малък регион на гена е насочен за анализ. За обширен анализ на гени, полинуклеотидна проба може да съдържа пълен екзон или повече. Проби могат да бъдат маркирани да осигуряват откриваем сигнал като ензим, биотин, радионуклид, флуорофор, хемилуминисцер, пара-магнитна частица и други подобни, които са търговско достъпни от много източници, като например Molecular Probes, Inc. Eugene, OR, and Amersham Corp., Arlington Heights, IL чрез използване на техники, които са добре известни в областта на техниката. Препоръчителни региони, от които могат да бъдат създадени проби, са лиганд-свързващият регион, цистеин псевдо-отговори, сигнални последователности и други. Техники за усъвършенствани полипептидни проби и хибридизиционни методи са известни в областта, например: Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1991.

BR43x2, TAC1 и BCMA полипептиди и антитела могат да бъдат използвани в диагностични системи за откриване на наличието на BR43x2, TAC1 или BCMA и BR43x2, TAC1 или BCMA лиганд полипептиди, такива като ztnf4. Информацията, получена от такива методи за детекция, би

осигурила яснота за значението на BR43x2 полипептиди при различни заболявания и също би ги наложила като диагностични инструменти за заболявания, за които са от значение променените нива на BR43x2. Променените нива на BR43x2, TAC1 или BCMA рецептор полипептиди могат да бъдат индикатор за патофизиологични състояния като тумор, автоимонни разстройства и инфекциозни заболявания.

При едно основно изследване, единична странична пробна молекула се инкубира с RNA, изолирана от биологичен материал, при температура и йонна сила, които усилват базовото групиране между пробата и целеви BR43x2, TAC1 или BCMA RNA видове. След отделяне на несвързана проба от хибриднизиращи молекули, се открива количеството хибриди.

Добре разработени хибридизационни методи на RNA откриване са Northern анализи и дот/слот блот хибридизация (Ausubel and Wu et al., "Analysis of Gene Expression at the RNA Level", in *Methods in Gene Biotechnology*, p. 225-239 (CRC Press, Inc. 1997)). Нуклеотидно киселинни проби могат също да бъдат открити, когато са белязани с радиоизотопи, като P^{32} или S^{35} . Алтернативно, BR43x2 RNA могат да бъдат открити с не-радиоактивен хибридизационен метод (Isaac, *Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes*, Humana Press, Inc., 1993). Най-често не-радиоактивно откриване се постига чрез ензимна конверсия на хромогенни или хемилуминисцентни субстрати. Илюстративно не-радиоактивни общности са биотин, флуоресцеин и дигоксигенин.

BR43x2, TAC1 или BCMA олигонуклеотидни проби също се използват за *in vivo* диагностика. Като илюстрация, ^{18}F -белязани олигонуклеотиди могат да се прилагат към даден обект и да се визуализират чрез позитронова емисионна томография (Tavitian et al., *Nature Medicine* 4:467, 1998).

Голям брой диагностични процедури дават преимущество на полимеразната верижна реакция (PCR) за повишаване на чувствителността на метода за откриване. Стандартните техники за извършване на PCR са добре известни (Mathew, *Protocols in Human Molecular Genetics* (Humana Press, Inc.

1991), White, PCR Protocols: Current Methods and Applications (Humana Press, Inc. 1993), Cotter, Molecular Diagnosis of Cancer (Humana Press Inc. 1996), Hanausek and Walaszek, Tumor Marker Protocols (Humana Press Inc. 1998), Lo, Clinical Applications of PCR (Humana Press Inc. 1998) и Meltzer, PCR in Bioanalysis (Humana Press Inc. 1998). PCR праймери могат да бъдат създадени да усилват една последователност кодираща определен BR43x2 домен или мотив, като BR43x2, TACI или BCMA цистеин богат псевдо-отговор.

Един вариант на PCR за диагностичен анализ е обратна транскриптаза-PCR (RT-PCR). При RT-PCR техниката, RNA е изолирана от биологичен материал, обратно транскрибиран към cDNA, а cDNA е инкубирана с BR43x2 праймери (виж например Wu et al., "Rapid Isolation of Specific cDNA or Genes by PCR", in Methods in Gene Biotechnology, CRC Press, Inc.p. 15-28, 1997). След това се извършва PCR и продуктите се анализират чрез стандартни методи.

Като една илюстрация, RNA е изолирана от биологичен материал като се използва например гуанидин тиоцианатно клетъчна лизисната процедура, описана по горе. Алтернативно, за изолиране на mRNA от клетъчен лизат може да бъде използвана твърдо-фазова техника. Една обратно-транскрипционна реакция може да бъде иницирана с изолираната RNA чрез произволни олигонуклеотиди, къси хомополимери на dT или BR43x2, TACI или BCMA анти-чувствителни олигомери. Олиго-dT праймери предлагат преимуществото, че различни mRNA нуклеотидни последователности са усилены и може да се получат контролирани целеви последователности. BR43x2, TACI или BCMA последователности са подсилени чрез полимеразната верижна реакция, като са използвани два странични олигопептидни праймери, които обикновено са поне 5 бази дълги.

PCR подсилени продукти могат да бъдат открити по много начини. Например, PCR продукти могат да бъдат фракционирани чрез гел електрофореза и визуализирани чрез етидиево бромидно белязване. Алтернативно, фракционирани PCR продукти могат да бъдат трансферирани към мембрана, хибридиизирана с откриваемо-белязана BR43x2 проба и

изследвани чрез автордиография. Допълнителни алтернативни начини са използването на дигоксигенин-белязани дезоксирибонуклеиново киселинни трифосфати до осигуряване на хемилуминисцентно откриване и C-TRAK колориметричен метод.

Друг начин е количествена PCR в реално време (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Ct.). Флуорогенна проба, съдържаща един олигонуклеотид с два закрепени репортерен и потушаващ участък, се закалява специфично между предния и обратния праймер. Чрез използване на 5' ендонуклеазната активност на Tag DNA полимераза се отделя репортерният участък от потушаващия участък и се получава последователно-специфичен сигнал и се усилва като нарастващо увеличение. Флуоресцентният интензитет може да бъде продължително наблюдаван и измерван чрез PCR реакция.

Друг начин за откриване на BR43x2, TAC1 или BCMA експресия е цикличната пробна технология (CPT), в която единично-странична DNA цел се свързва с излишък на DNA-RNA-DNA имагинерна проба до получаване на комплекс, като RNA-частта се разцепва с рибонуклеаза H и се открива присъствието на имагинерната разцепена проба (виж например Beggs et al., J. Clin. Microbiol. 34:2985, 1996 and Bekkaoui et al., Biotechniques 20:240, 1996). Алтернативни методи за откриване на BR43x2, TAC1 или BCMA последователности могат да използват подходи като например нуклеино киселинна последователно-базирана амплификация (NASBA), кооперативна амплификация на шаблони чрез кръстосана хибридизация (CATCH) и лигазно-верижна реакция (LCR) (виж например Marshall et al., US Patent 5,686,272 (1972), Dyer et al., J. Virol. Methods 60:161, 1996; Ehrlich et al., Eur. J. Biochem. 243:358, 1997 and Chadwick et al., J. Virol. Methods 70:59, 1998). На специалистите от тази област на техниката са известни и други стандартни методи.

BR43x2, TAC1 или BCMA проби и праймери също могат да бъдат използвани за откриване и локализиране на BR43x2, TAC1 или BCMA гена експресия в тъканни примери. Методи за такава *in situ* хибридизация са добре

известни за специалистите в областта на техниката (виж например Choo, *In Situ Hybridization Protocols*, Humana Press, Inc., 1994; Wu et al., "Analysis of Cellular DNA or Abundance of mRNA by Radioactive In Situ Hybridization (RISH)" in *Methods in Gene Biotechnology*, CRC Press, Inc., p. 259-278, 1997 and Wu et al., "Localization of DNA or Abundance of mRNA by Fluorescence In Situ Hybridization (RISH)" in *Methods in Gene Biotechnology*, CRC Press, Inc., p. 279-289, 1997).

За специалистите в тази област на техниката са известни множество допълнителни методи за диагностика (например Mathew, *Protocols in Human Molecular Genetics*, Humana Press, Inc., 1991; Coleman and Tsongalis, *Molecular Diagnostics*, Humana Press, Inc. 1996 and Elles, *Molecular Diagnosis of Genetic Diseases*, Humana Press, Inc. 1996).

Освен това такива полипептидни проби могат да се използват за хибридиране на двойникови последователности върху индивидуални хромозоми. Хромозомна идентификация и/или BR43x2 генна карта може да осигури информация относно генната функция и връзката със заболяването. Много такива техники са достъпни за специалиста в областта, например карта за соматични клетъчни хибриди и флуоресценция по време на хибридизация *in situ* (FISH). Препоръчителен метод е радиационната хибридна карта. Радиационна хибридна карта е соматично клетъчна генетична техника, развита за създаване на съседни карти на бозайникови хромозоми с високо разрешение (Cox et al., *Science* 250:245-50, 1990). Частична или пълна информация за генна последователност позволява създаването на PRC праймери, подходящи за използване с хромозомни радиационно-хибридни картографски панели. Търговско достъпни радиационно хибридни картографски панели, които покриват целия геном, са например Stanford G3RH panel and GeneBrige 4 RH Panel (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). Тези панели позволяват бързи, PRC базирани, хромозомни локализации и насочване на гени, последователно-тагирани места (STSs) и други не-полиморфни и полиморфни маркери в желанния регион. Този метод включва установяване на директно

пропорционални физически разстояния между новооткрити гени и по-рано картографирани маркери. Точната информация за позицията на гена може да бъде използвана по много начини: 1/ определяне дали последователността е част от съществуващ приближен и получаване на допълнителни обкръжаващи генетични последователности в различни форми, като например YAC-, BAC- или cDNA клонове; 2/ осигуряване на възможен кандидат ген за наследствено заболяване, който показва връзка към същия хромозомен регион; и 3/ за кръстосано- рефериращ модел организъм, като мишка, която може да бъде подходяща за определяне каква функция може да има частният ген.

Хромозомната локализация също може да бъде проведена чрез използване на STS. Един STS е DNA последователност, която е уникална в човешкия геном и може да бъде използвана като отправна точка за специфичен хромозом или регион на хромозома. Един STS може да бъде определен чрез двойка олигонуклеотидни праймери, които могат да се използват в полимеразно-верижна реакция за специфично определяне на това място при наличие на всички други геномни последователности. Докато STSs са базирани само върху DNA последователност, те могат да бъдат напълно описани в база данни, например Database of Sequence Tagged Sites (dbSTS), GenBank, (National Center for Biological Information, National Institutes of Health, Bethesda, MD <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, които могат да бъдат ползвани за търсене на генна последователност за данните на картата, която съдържа тези кратки геномно означени STS последователности.

Настоящото изобретение също осигурява реагенти за допълнителни диагностични подходи. Например, BR43x2 ген, проба, съдържаща BR43x2 DNA или RNA или тяхна последователност, могат да бъдат използвани за определяне дали BR43x2 генът присъства върху конкретна хромозома или дали се е получила мутация. Откриваемите хромозомни аберации при BR43x2 генното местоположение включват, без да се ограничават до тях, анеплоид, брой промени на генно копие, вмъквания, отстранявания, ограничаване на сайтови промени и подреджания. Тези отклонения от нормата могат да се

наблюдават в кодиращата последователност, в интроните или в страничните последователности, включващи обратен промотер и регулаторни региони и могат да бъдат проявени като физични изменения в кодираща последователност или промени на ген експресивно ниво.

Най-общо, тези диагностични методи включват следните етапи: а/ получаване на генетична проба от пациент; б/ инкубация на генетичната проба с полинуклеотидна проба или праймер, както е описано по-горе, при условия, при които полинуклеотидът ще се хибридизира към комплементарно полинуклеотидна последователност, за да продуцира първо реакционен продукт; и в/ сравнение на първо реакционния продукт с контролен реакционен продукт. Една разлика между първия продукт и контролния продукт е индикация за генетично несъответствие в пациента. Генетичен пример за използване в настоящото изобретение са геномни DNA, cDNA и RNA. Полинуклеотидната проба или праймер може да бъде RNA или DNA и ще съдържа част от SEQ ID NO:3, комплемент от SEQ ID NO:1 или RNA техен еквивалент. Подходящи методи за изследване в този смисъл са молекулярни генетични методи, известни в областта на техниката, като рестрикционно фрагментарен дължинен полиморфичен анализ (RFLP), кратък тандемен отговор (STR)-анализ, използващ PCR техники, свързано-верижна реакция (Barany, PCR Methods and Applications 1:5-16, 1991), рибонуклеазно протекционно изследване и други генетично-свързани методи, известни в областта на техниката (Sambrook et al., Ausubel et al., Ausubel et al., Marian, Chest 108:225-65, 1995). Рибонуклеазно протекционно изследване (виж например Ausubel et al.) включва хибридизация на RNA проба, след което реакционният продукт (RNA-RNA хибрид) е подложен на действието на рибонуклеаза. Хибридизирани региони на RNA са защитени от разграждане. В PCR изследвания, генетичен пример от пациент се инкубира в двойка полинуклеотидни праймери и регионът между праймерите се разширява и възстановява. Промени в размера или количеството на възстановен продукт са показатели за мутации в пациента. Друг метод, основан на PCR, който може да

бъде използван, е единично страничен структурен полиморфичен (SSCP) анализ (Hayashi, PCR Methods and Applications 1:34-8, 1991).

За инхибиране на BR43x2, TAC1 или BCMA гена транскрипция, като например при инхибирано В-клетъчно развитие и взаимодействие с други клетки може да бъде използвана антисензитивна методология. Полинуклеотиди, които са комплементарни към сегмент на BR43x2, TAC1 или BCMA-кодиращи полинуклеотиди, например полинуклеотид, посочен в SEQ ID NO:3, са създадени да се свързват към BR43x2, TAC1 или BCMA-кодираща mRNA и да инхибират транслация на такава mRNA. Такива антисензивни полинуклеотиди се използват за инхибиране на експресия на BR43x2, TAC1 или BCMA полинуклеотид-кодиращи гени в клетъчна култура или в обект.

Могат да бъдат създадени мишки, които да експресират BR43x2, TAC1 или BCMA, обозначени тук като “трансгенни мишки”, и мишки, които проявяват пълна липса на BR43x2, TAC1 или BCMA функция, обозначени като “ударни мишки” (Snouwaert et al., Science 257:1083, 1992; Lowell et al., Nature 366:740-42, 1993; Capecchi, Science 244:1288-92, 1989; Palmiter et al. Annu. Rev. Genet. 20:465-99, 1986). Например трансгенни мишки, които пре-експресират BR43x2, TAC1 или BCMA, или повсеместно или при тъканно-специфичен или тъканно-рестриктивен промотер, могат да бъдат използвани, за да се разбере дали пре-експресията води до фенотип. Например, пре-експресия на див-тип BR43x2, TAC1 или BCMA полипептид, полипептиден фрагмент или техен мутант може да промени нормално клетъчно функциониране, водещо до фенотип, който определя тъкан, в която BR43x2, TAC1 или BCMA експресия е функционално релевантна и може да покаже терапевтична цел за BR43x2, TAC1 или BCMA или техни агонисти или антагонисти. Например, предпочитана трансгенна мишка за извършване на генна инженерия е такава, която пре-експресира разтворим BR43x2, TAC1 или BCMA. Освен това, такава пре-експресия може да предизвиква получаване на фенотип, който показва сходство с човешки заболявания. Аналогично, “ударни” BR43x2, TAC1 или BCMA мишки могат да бъдат използвани, когато BR43x2 е абсолютно

необходим ин виво. Фенотипът на “ударни мишки” е предсказание за ин виво ефектите, които може да има BR43x2, TAC1 или BCMA антагонист като тези, описани. Човешка BR43x2, TAC1 или BCMA cDNA може да бъде използвана за изолиране на муринова BR43x2, TAC1 или BCMA mRNA, cDNA и геномна DNA, които са последователно използвани за създаване на ударни мишки. Тези мишки могат да бъдат използвани за изучаване на BR43x2, TAC1 или BCMA гена и протеинът, кодиран чрез тях в ин виво система, и могат да бъдат използвани в ин виво модели за съответстващи човешки заболявания. Освен това, трансгенна експресия на BR43x2, TAC1 или BCMA антисензивни полинуклеотиди или рибозоми, насочени срещу BR43x2, TAC1 или BCMA, описани тук, могат да бъдат използвани аналогично към описаните трансгенни мишки.

Фармацевтично ефективни количества на BR43x2, TAC1 или BCMA полипептиди, съгласно настоящото изобретение могат да бъдат включени с фармацевтично приемливи носители за парантерална, орална, назална, ректална, външна, трансдермална употреба или други подобни по конвенционални методи. Фармацевтичните форми могат допълнително да включват едно или повече разредители, пълнители, емулгатори, консерванти, буфери, ексципиенти и други, и могат да са под формата на течности, прахове, емулсии, супозитории, липозоми, трансдермални пластири и например, таблетки. Преносни системи с бавно или с продължително освобождаване, включващи всеки от големия брой биополимерни (биологично-базирани системи) системи, използващи липозоми и полимерно преносни системи, могат също да бъдат използвани със състави, описани тук, за да осигурят непрекъснат или продължителен източник на BR43x2 полипептид или антагонист. Такива системи за бавно освобождаване са приложими за лекарствени форми, например за орално, външно и парантерално приложение. Терминът “фармацевтично приложим носител” означава носител на среда, която не нарушава ефикасността на биологичната активност на активните инградиенти, и която не е токсична към гостоприемника или пациента. Един

специалист в областта на техниката може да формулира съединенията, съгласно настоящото изобретение по подходящ начин и в съгласие с приети практики, като тези, разкрити от Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Gennaro, Mack Publishing Co., Easton PA., 19th ed., 1995.

Както е използвано тук “фармацевтично ефективно количество” от BR43x2, TACI или BCMA полипептид, агонист или антагонист е количество, достатъчно да предизвика желан биологичен резултат. Резултатът може да бъде намаляване на следи, симптоми или предизвикване на заболяване, или други желани промени на биологична система. Например, ефективно количество от BR43x2, TACI или BCMA полипептид е това, което осигурява същото субективно облекчение на симптоми или обективно установимо подобрене, което е отбелязано чрез клинично или друго квалифицирано наблюдение. Например, като ефективно количество от BR43x2, TACI или BCMA полипептид или разтворима смес могат да осигурят понижаване в В-клетъчен отговор по време на имуноен отговор, инхибиция или понижаване в антитяло продукция, инхибиция на намалението на симптоми, свързани с SLE, MG или RA. Ефективни количества на BR43x2, TACI или BCMA ще понижат процента на В-клетки в периферната кръв. Ефективни количества от BR43x2, TACI или BCMA полипептиди могат да варират значително в зависимост от заболяването или симптома за лечение. Количеството на полипептида за прилагане и неговата концентрация във фармацевтичната форма зависят от избрания носител, пътя на прилагане, силата на конкретния полипептид, клиничното състояние на пациента, страничните ефекти и стабилността на съединението във формата. По този начин клиницистът може да използва подходящ препарат, съдържащ подходяща концентрация във формата, както и количеството на прилаганата форма, зависещо от клиничния опит с дадения пациент или с други пациенти. Тези количества зависят в частност от конкретните условия на лечение, възраст, тегло и общо здравословно състояние на пациента, както и други фактори, очевидни за специалиста в областта. Най-често дозата е биде в границата от 0.1 до 100mg/kg на обекта.

Дози за специфични съединения могат да бъдат определени от ин витро или ин виво изследвания в комбинация с изследвания върху експериментални животни. Концентрации на съединения, за които е установено, че са ефективни при ин витро или ин виво, могат да бъдат ръководство за животински изследвания, при които дозите се изчисляват, за да се получат подобни концентрации на мястото на действие.

По-нататък изобретението е илюстрирано чрез следващите примери, с които не се ограничава неговият обхват.

ПРИМЕРИ

ПРИМЕР 1

Откриване на BR43x2

TAC1 изоформата е клонирана от RPMI създадена колекция чрез секретирани трап подход. RPMI 1788 (активирана В-клетъчна линия) колекция е създадена чрез използване на 96-гнездни поставки. Всяка клетка съдържа около 100 E.coli колонии, всяка от които съдържа един cDNA клон. DNA представители се получават в 96-гнездна форма, чрез TomTech Quadra 9600. Изолираната DNA след това се поставя в 120 фонда, всеки от които представя 1600 клона. Тези фондове се трансфектират в Cos-7 клетки и се поставят в 12-гнездни поставки. Три микролитъра от DNA фонда и 5 µl LipofectAMINE се смесват в 92 µl свободна от серум DMEM среда (55 mg натриев пируват, 146mg L-глутамин, 5mg трансферин, 2.5mg инсулин, 1 mg селен и 5 mg фетуин в 500ml DMEM), инкубирана при стайна температура за 30 минути, след което се добавя 400 µl свободна от серум DMEM среда. DNA – LipofectAMINE смес се добавя към 220,000 Cos-7 клетки/ гнездна поставка върху 12-гнездни клетъчни културални поставки и се инкубира за 5 часа при 37°C. След инкубация, 500µl от 20% FBS DMEM (100 ml FBS, 55 mg натриев пируват, 146mg L-глутамин в 500ml DMEM) се добавят към всяко гнездо и клетките се инкубират за една нощ.

Секретиран трапов екран се представя чрез биотинилиран, FLAG – тагово ztnf4. Клетките се промиват с PBS и се фиксират за 15 минути с 1.8% формалдеhid в PBS. След това клетките се промиват с TNT (0.1 М трис-HCl, 0.15 М NaCl и 0.05% Твин-20 във H₂O). Клетки проникват в 0.1% Тритон-X в PBS за 15 минути, последвано от промиване с TNT. Клетките се блокират за един час с TNB (0.1 М Трис-HCl, 0.15 М NaCl и 0.5% блокиращ реагент) посредством NEN Renaissance® TSA-Direct Kit (Nen, Boston, MA) съгласно инструкциите на производителя. Клетките се промиват с TNT и се блокират за 15 минути с авидин и след това биотин (Vector Labs Cat# SP-2001), промиващ в/между с TNT. Клетките се инкубират за един час с 1 µg/ml ztnf4/Flag/Biotin в TNB, последвано от TNT промиване. След това клетките се инкубират за един час със стрептавидин – HRP (NEN) с 1:300 разреждане в TNB и след това се промиват с TNT. Откриват се хибридизации с флуоресцин тирамиден реагент, разреден 1:50 в разреден буфер (NEN), инкубира се за 4.4 минути и се промива с TNT. Клетките се консервират с Vectashield Mounting среда (Vector Labs, Burlingame, CA) разрежена 1:5 в TNT.

Клетките се визуализират чрез флуоресцентна микроскопия чрез FITC филтър. Дванадесет фонда са позитивни за ztnf4 свързване. Фонд D8, представляващ 1600 клона, се прекъсва долу и се изолира единичен клон D8-1, положителен за ztnf4 свързване. Последващи анализи откриват клон D8-1 със съдържание на полипептидна последователност, която кодира изоформа на TACI, в която Phe21-Arg67 първо цистеиново псевдо-повторение на TACI се замества от единичен аминокиселинен остатък, триптофан. Тази изоформа е обозначена BR43x2, полинуклеотидната последователност на която присъства в SEQ ID NO:1.

ПРИМЕР 2

Локализация на BR43x1 в лимфоцити и моноцити

Обратно транскриптна PCR се използва за локализиране на BR43x1 експресия в Т и В клетки и моноцити. Олигонуклеотидни праймери ZC19980

(SEQ ID NO:15) и ZC19981 (SEQ ID NO:16) се използват за екраниране на CD19⁺, CD3⁺ и моноцит cDNA за BR43. Обратна транскриптазната реакция се провежда при 94°C за три минути, след което чрез 30 цикъла при 94°C за 30 секунди, при 68°C за 2 минути и при 72°C за една минута, последвано от 7 минути екстензия при 72°C. Установява се връзка с очакван размер 720 bp само в В клетки и не се открива в активирани Т клетки, както това е установена за TAC1 чрез използване на антитела (Búlow and Bram).

ПРИМЕР 3

В клетъчно полиферационно изследване посредством BR43 лиганд ztnf4

Епруветка, съдържаща 1×10^8 замразени периферни кръвни мононуклеарни клетки (PBMC) се поставя бързо в 37°C водна баня и се ресуспендира в среда 25мл В клетки (Iscove's модифицирана Dulbecco среда, 10% загрят инактивиран ембрионален говежди серум, 5% L- глутамин, 5% Pen/Strep) в 50 мл флакон. Клетките се изследват за жизнеспособност, използвайки Trypan Blue (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD). Десет милилитра от Ficoll/Нураque Plus (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, NJ) се поставят под клетъчна суспензия, въртят се 30 минути при 1800 оборота/мин. и спират рязко. Междуфазовият пласт след това се отделя и се премества в нов 50мл флакон, довежда се до краен обем от 40 мл с PBS и се завърта за 10 минути при 1200 оборота/мин. с рязко прекъсване. Жизнеспособността на изолираните В клетки се изследва чрез Trypan Blue. В клетките се ресуспендират при крайна концентрация от 1×10^6 клетки на милилитър в В-клетъчна среда и се поставят при 180 μ л/гнездо в 96 гнездна поставка с U-образно дъно (Falcon, VWR, Seattle, WA).

Към клетките се добавя един от следните стимулатори за довеждане до крайния обем от 200мл/гнездо:

Разтворим, FLAG-тагов ztnf-4sCF или ztnf-4sNF при 10 кратно разреждане от 1 мг-1 ng/мл или самостоятелно, с 10 μ г/мл анти-IgM (кози анти човешки IgM) разреден в натриев бикарбонат, pH 9.5, (Southern Biotechnology

Associates, Inc., Birmingham, AL); или с 10µg/ml анти-IgM и 10нг/мл рекомбинантно човешко IL4 (разредено в PBS и 0.1% BSA). Допълнително се тестват други цитокини като IL-3 и IL-6, както и разтворими CD40 (sCD40) антитела (Pharmingen, San Diego, CA). Като контрол на клетките, инкубирани с 1% говежди серумен албумин (BSA) и PBS, 10µg/ml анти-IgM или 10µg/ml анти-IgM и 10 нг/мл рекомбинантно човешко IL4 или други цитокини. След това клетките се инкубират при 37°C в овлажнен инкубатор за 72 часа. Шестнадесет часа преди прибирането на резултата към гнездата се добавя 1µCi ³H тимидин. Клетките се прибират в 96 гнездна филтърна поставка (UniFilter GF/C, Packard, Meriden, CT), където са прибрани чрез клетъчен инструмент (Packard) и се съхраняват съгласно инструкции на производителя. Поставките се сушат при температура 55°C за 20-30 минути и основата на поставките се запечатва с непрозрачно лепило за поставки. Към всяко гнездо се добавя 0.25мл сцинтилационна течност (Microscint-O, Packard) и поставката се проверява чрез микропоставъчен сцинтилационен брояч (Packard).

За измерване на индукцията на IgG продукция в отговор на различни В клетъчни митогени, последващи стимулация на пречистени В клетки, клетки се приготвят както е описано и инкубирано за 9 дни. Клетъчният супернатант се събира за определяне на IgG продукция.

За измерване на клетъчно повърхностна маркерна активация в отговор на различни В клетъчни митогени, следващи стимулация на пречистени В клетки, клетки се приготвят по начин, описан по-горе, но се инкубират 48 часа. Клетъчно повърхностни маркери се измерват чрез FACS анализ.

Пролиферацията на човешки пречистени В клетки, стимулирани с различни В клетъчни митогени, е обобщено в Таблица 5:

ТАБЛИЦА 5

<u>Дразнители</u>	<u>Пролиферативен индекс</u>
ztnf4	1.5
ztnf4 + IL 4	9.9
ztnf4 + анти-IgM + IL 4	15.8

Синергетичен ефект на Ztnf4 + IL 4, IL 3 (10µg/ml) и IL 6 се наблюдава върху В клетъчна пролиферация. Двукратно повишение в В клетъчно сигнализиране се наблюдава, когато се използва sCD40.

Индукцията на IgG продукция (ng/ml) в отговор на различни В клетъчни митогени след стимулиране на пречистени В клетки, е обобщено в Таблица 6.

ТАБЛИЦА 6

<u>Дразнител</u>	<u>Контрол</u>	<u>Ztnf4</u>
анти-IgM	3	7.5
анти-IgM + IL 4	13	32
анти-IgM + IL 4+ IL 5	10	45

Повишение на клетъчните повърхностно активационни маркери се наблюдава след дразнене на пречистени В клетки с Ztnf4 самостоятелно, с анти-IgM или с анти-IgM + IL 4. Няма ефект на пролиферация на PBMNC в присъствие на оптимални или под оптимални Т клетъчни мито гени. Също така, никакъв ефект на TNFα продукция не е наблюдаван в пречистени моноцити в отговор срещу LPS дразнене.

Фигура 3 показва разтворима Ztnf4 активация на човешки В лимфоцити срещу пролиферативни и секретирани имуноглобулини. Фигура 3А показва В клетъчна пролиферация на пречистени човешки периферни В кръвни клетки в отговор на дразнене с разтворим Ztnf4 (25 нг/мл) в присъствие на IL-4 самостоятелно и IL-4 с анти-IgM, анти-CD40 или анти-CD19 след пет дни в култура. Фигура 3В показва нивата на IgM и IgG, измерени в супернатант, получен от човешки В клетки, стимулирани с разтворим Ztnf4 в присъствие на IL-4 или IL-4 + IL-5 след девет дни в култура.

Тези резултати предполагат, че разтворим ztnf4 е В-клетъчно активирана молекула, която действа в съгласие с други В клетъчни дразнения и е слаба самостоятелно. Разтворим ztnf4 усилва В клетъчната пролиферация и Ig индукция. Подрегулацията на адхезионни молекули, ко-стимулаторни

молекули и активирани рецептори предполага участие на В клетки за усилване APC функция.

Фигура 4 показва стимулиране на човешки периферни кръвни В клетки с разтворим ztnf4 (5ng/ml) или контролен протеин в присъствие на 10 ng/ml IL-4 за 5 дни ин витро. Пречистени TACI-Ig, BCMA-Ig или контролен Fc се изследват за инхибиция на разтворима ztnf4 специфична пролиферация.

ПРИМЕР 4

Селектиране на BACI или BCMA трансформирани ВНК клетки чрез ztnf4 свързване

ВНК клетки, експресиращи високо ниво TACI протеин, са избрани чрез разрежено клониране на трансфектантен фонд. Трансфектантни клетки (2×10^5) се инкубират в ледена баня за 30 минути с биотинилиран ztnf4 при 1µг/мл в свързващ буфер (PBS, 2% BSA, 0.02% NaN₃). Клетките се промиват 2 пъти със свързващ буфер, след което се инкубират с SA-PE (Caltag) (1:1000 разреждане в свързващ буфер) във водна баня за 30 минути. След това клетките се промиват отново 2 пъти в свързващ буфер, ресуспендират се в свързващ буфер и се преброяват чрез FACS (FACS Vantage, Becton Dickinson). Избират се клонинги с най-високо свързване на TNF4.

ВНК клетки, експресиращи висока степен от BCMA протеин, се селектират чрез повърхност, белязваща BCMA-експресиращ трансфектен фонд с биотинилиран ztnf4. Следва стрептавидин-Fico-еритрин (SA-PE- Caltag Burlingame, CA) и стерилно сортиране за светли клетки в FL2 върху FACS Vantage устройство (Becton Dickinson). След това единични клонинги се изследват за ztnf4 свързване.

ПРИМЕР 5

Тъканно пренасяне

Човешки множествено тъканни Northern блотове (MTN I, MTN II и MTN III; Clontech) се апробират за определяне на тъканно пренасяне на

човешки BR43x2 и TAC1 експресия. Приблизително 500 бр PRC проби (SEQ ID NO:21) се амплифицират чрез BR43x2 (SEQ ID NO:1) като шаблони и олигонуклеотид ZC20061 (SEQ ID NO:22) и ZC20062 (SEQ ID NO:23) като праймери. Тази последователност е идентична на хомоложен регион на TAC1. Амплификацията се провежда както следва: 1 цикъл при 94°C за 1.0 минута, 30 цикъла от 94°C за 30 секунди, 60°C за 30 секунди и 72°C за 30 секунди, последвано от 1 цикъл при 72°C за 10 минути. PCR продукцията се визуализира чрез агарозно гелна електрофореза и 500 бр PCR продукт се пречиства чрез гел екстракционен кит (Qiagen, Chatsworth, CA) съгласно инструкциите на производителя. Пробата се белязва радиоактивно чрез MULTIPRIME DNA бележещ кит (Amersham, Arlington Heights, IL) съгласно инструкциите на производителя. Пробата се пречиства чрез NUCTRAP ударна колона (Stratagene). За прехибридизиране и като хибридиращ разтвор за Northern блотове се използва EXPRESSHYB (Clontech) разтвор. Хибридизацията се провежда една нощ при 65°C чрез използване на 10⁶ cpm/ml на белязана проба. Блотовете след това се промиват в 2XSSC и 0.1% SDS при стайна температура, последвано от 2 промивания в 0.1XSSC и 0.1% SDS при 50°C. Копие на приблизително 1.5 kb се откриват в далак, лимфен възел и тънки черва.

Човешки множествено тъканни Northern блотове (MTN I, MTN II и MTN III; Clontech) се апробират за определяне на тъканно пренасяне на човешка BCMA експресия. Приблизително 257 бп PRC проби (SEQ ID NO:24) се амплифицират чрез Daudi клетъчна cDNA като шаблон и олигонуклеотид ZC21065 (SEQ ID NO:25) и ZC21067 (SEQ ID NO:26) като праймери. Амплификацията се провежда както следва: 1 цикъл при 94°C за 1.0 минута, 35 цикъла от 94°C за 30 секунди, 60°C за 30 секунди и 72°C за 30 секунди, последвано от 1 цикъл при 72°C за 10 минути. PCR продукцията се визуализира чрез агарозно гелна електрофореза и 257 бп PCR продукт се пречиства чрез гел екстракционен кит (Qiagen, Chatsworth, CA) съгласно

инструкциите на производителя. Пробата се белязва радиоактивно чрез MULTIPRIME DNA бележещ кит (Amersham, Arlington Heights, IL) съгласно инструкциите на производителя. Пробата се пречиства чрез NUCTRAP ударна колона (Stratagene). За прехибридиране и като хибридиращ разтвор за Northern блотове се използва EXPRESSHYB (Clontech) разтвор. Хибридизацията се провежда за една нощ при 65°C чрез използване на 10⁶cpm/ml от белязана проба. Блотовете след това се промиват в 2X SSC и 0.1% SDS при стайна температура, последвано от 2 промивания в 0.1 SSC и 0.1% SDS при 50°C. Копие на приблизително 1.5 кб се откриват в стомах, тънки черва, далак, лимфен възел, трахея и тестиси.

RNA Master Dot блотове (Clontech), които съдържат RNA от различни тъкани, нормализирани към 8 домашни гена, се апробират или с TAC1 проба (SEQ ID NO:21) или с BCMA проба (SEQ ID NO:24) и се хибридизират, както е описано по-горе. BR43x2/TAC1 експресия се наблюдава в далак, лимфен възел, тънки черва, стомах, слюнна жлеза, апендикс, бял дроб, костен мозък и ембрионален далак. BCMA експресия се открива в тънки черва, далак, стомах, дебело черво, лимфен възел и апендикс.

Човешки туморно панелен блот V (Invitrogen Inc., San Diego, CA) и човешки лимфома блот (Invitrogen Inc., San Diego, CA) се използват както е описано по-горе, едновременно с BR43x2/TAC1 проба (SEQ ID NO:21) или BCMA проба (SEQ ID NO:24). В аденолимфом, не-Хочкинов лимфом и паротиден тумор е намерено 1.5 кб копие, съответстващо на TAC1.

Цяла RNA от CD4+, CD8+, CD19+ и смес от лимфоцитно реакционни клетки (CellPro, Bothell, WA) се приготвят чрез гуанидин изотиоцианатен анализ (Chirgwin et al., Biochemistry 18:52-94, 1979), след което се извършва CsCl центрофугиране. Поли(A)+ RNA се изолира чрез олиго d(T) целулозна хроматография (Aviv and Leder, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69:1408-12, 1972). След това се провежда Northern блот анализ както следва:

Около 2 мг от всеки от поли A+ RNAs се денатурира в 2.2M формалдехид/фосфатен буфер (50mM Na₂HPO₄, 50mM NaH₂PO₄, 50mM NaOAc, 1mM EDTA и 2.2M формалдехид) и се сепарира чрез 1.5% агароза мини гел (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA) електрофореза във формалдехид/фосфатен буфер. RNA се изследва чрез блот за една нощ върху нитриран филтър (Schleicher & Schuell, Keene, NH), като филтърът е UV кръстосано свързан (1,200 mJoules) в STRATALINKER® UV свързващ инструмент (Stratagene Cloning Systems, LaJolla, CA), след което се загрява при 80°C за 1 час.

Блотовете се пробират или с TAC1 проба (SEQ ID NO:21), или с BCMA (SEQ ID NO:24) проба. 1.5 кб връзка, съответстваща на TAC1, се открива само в CD 19+ клетки. 1.2 кб копие, съответстващо на BCMA, се открива в CD 8⁺, CD19⁺ и MLR клетки.

Допълнителен Northern блотов анализ се провежда върху блотове, изработени от поли (A) RNA от K-562 клетки (еритроид, ATTC CCL 243), HUT78 клетки (T, ATCC TIB-161), Jurkat клетки (T клетки), DAUDI (Burkitt's human lymphoma, Clontech, Palo Alto, CA), RAJI (Burkitt's human lymphoma Clontech) и HL60 (моноцит), както е описано по-горе. Блотовете са апробирани или с TAC1 (SEQ ID NO:21), или с BCMA (SEQ ID NO:24) проби. В Raji клетки се открива копие на 1.5кб, съответстващ към TAC1. В Daudi, Raji и Hut 78 клетки се открива копие на 1.2кб, съответстващо на BCMA.

За определяне на тъкани, които експресират човешки или муринови TAC1 и човешки BCMA се използва PCR-базиран екран. Човешки и муринови Rapid-Scan™ генно експресионни панели (OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD) се отделят съгласно инструкциите на производителя. Олигонуклеотидни праймери ZC24200 (SEQ ID NO:27) и ZC24201 (SEQ ID NO:28) са конструирани за спин екзон образуване и продуцират 272 bp фрагмент, съответстващ на муринов TAC1. Експресия се открива в далак, тимус, бял дроб, гърди, сърце, мускул, кожа, надбъбречна жлеза, стомах, тънки черва,

мозък, яйчници, простата и ембрион. Допълнителни връзки на ~500 и 800 bp се откриват в много тъкани.

Олигонуклеотидни праймери ZC24198 (SEQ ID NO:29) и ZC24199 (SEQ ID NO:30) са конструирани за спин екзон образуване и продуцират 204bp фрагмент, съответстващ на човешки TAC1. Експресия се открива в далак, мозък, сърце, черен дроб, дебело черво, бял дроб, тънки черва, мускул, стомах, тестиси, плацента, слюнна жлеза, надбъбречна жлеза, панкреас, простата, периферни кръвни лимфоцити и костен мозък.

Олигонуклеотидни праймери ZC24271 (SEQ ID NO:31) и ZC24272 (SEQ ID NO:32) са конструирани за спин екзон образуване и продуцират 329 bp фрагмент, съответстващ на човешки ВСМА. Експресия се открива в мозък, далак, дебело черво, бял дроб, тънки черва, стомах, яйчници, тестиси, слюнна жлеза, надбъбречна жлеза, простата, периферно кръвни лимфоцити, костен мозък и ембрионален черен дроб.

Олигонуклеотидни праймери ZC24495 (SEQ ID NO:33) и ZC24496 (SEQ ID NO:34) са конструирани за спин екзон образуване и продуцират 436 bp фрагмент, съответстващ на човешки ВСМА. Експресия се открива в черен дроб.

ПРИМЕР 6

Получаване на TAC1-Ig или ВСМА1-Ig смесени вектори

Ig Гама1 Fc4 фрагментна конструкция

За да се получи TAC1-Ig смесен протеин Fc регион на човешки IgG1 (възловият регион и CH2 и CH3 домените) се модифицират така, че да се отстранят Fc рецептор (FcγRI) и комплемент (C1q) свързващи функции. Тази модифицирана версия на човешки IgG1 Fc се нарича Fc4.

Fc регионът се изолира от човешка ембрионална чернодробна колекция (Clontech) посредством PRC чрез олиго праймери ZC10,134 (SEQ ID NO:43) и ZC10,135 (SEQ ID NO:44). PRC се използва, за да се включат мутации в Fc регион за редуциране на FcγRI свързване. FcγRI свързаният сайт (Leu-Leu-gly-

Gly) е изменен за Ala-Glu-glu-Ala (амно киселинни остатъци 38-41 на SEQ ID NO:45) съгласно Baum (EMBO J. 13:3992-4001, 1994), за да редуцира FcγRI свързване (Duncan et al., Nature 332:563-4, 1988). Олигонуклеотидни праймери ZC15,345 (SEQ ID NO:46) и ZC15,347 (SEQ ID NO:47) се използват за въвеждане на мутацията. До 50μl краен обем се добавят 570 ng IgFc еталон, 5μl 10x Pfu реакционен буфер (Stratagene), 8μl 1.25 mM dNTPs, 31μl dH₂O, 2μl 20mM ZC15,345 (SEQ ID NO:46) и ZC15347 (SEQ ID NO:47). Добавя се еквивалентно количество минерално масло и реакцията се нагрява до 94°C за 1 минута. Добавя се Pfu полимераза (2.5 единици, Stratagene), последвана от 25 цикъла при 94°C за 30 секунди, 55°C за 30 секунди, 72°C за 1 минута и 7 минутна екстензия при 72°C. Реакционните продукти се подлагат на електрофореза и се открива връзката, съответстваща на предполагаемия размер ~676 bp. Връзката се възбужда от гела и се възстановява чрез QIAGEN QIAquick™ гел екстракционен кит (Qiagen) съгласно инструкциите на производителя.

За въвеждане на мутация на Ala към Ser (аминокиселинен остатък 134 на SEQ ID NO:45) и Pro към Ser (аминокиселинен остатък 135 на SEQ ID NO:45) за редуциране на комплемент C1q свързване и/или комплемент фиксация (Duncan and Winter, Nature 332:788, 1988) и спиране на кодона TAA се използва PCR. Второ, първи кръгови реакции се извършват чрез FcγRI свързваща сайт-мутантна IgFc последователност като еталон. До 50μl краен обем се добавя 1μl FcγRI свързваща сайт-мутантен IgFc еталон, 5μl 10x Pfu реакционен буфер (Stratagene) и 8μl 1.25 mM dNTPs, 31μl dH₂O, 2μl 20mM ZC15,517 (SEQ ID NO:48), 5' праймер, започващ при нуклеотид 26 на SEQ ID NO:45 и 2μl 20mM ZC15,530 (SEQ ID NO:49), 3' праймер, започващ на комплемента на нуклеотид 405 на SEQ ID NO:45. Втората реакция съдържа по 2μl от всеки 20 mM наличности от олигонуклеотидни праймери ZC15,518 (SEQ ID NO:50), един 5' праймер, започващ при нуклеотид 388 на SEQ ID NO:45 и ZC15,347 (SEQ ID NO:47), един 3' праймер за включване на Ala към Ser

мутация, Xba I рестрикционно място и спиращ кодон. Добавя се еквивалентно количество минерално масло и реакциите се нагряват до 94°C за една минута. Добавя се Pfu полимераза (2.5 единици, Stratagene), след което следват 25 цикъла при 94°C за 30 секунди, 55°C за 30 секунди, 72°C за 2 минути; следва 7 минутна екстензия при 72°C. Реакционните продукти се подлагат на електрофореза и се откриват връзките, съответстващи на предполагаемите размери ~370 и ~390 bp. Връзките се възбуждат от гела и се екстрахират чрез QIAGEN QIAquick™ гел екстракционен кит (Qiagen) съгласно инструкциите на производителя. За присъединяване на споменатите по-горе фрагменти се извършва втори кръг на реакцията и се добавя 5' Bam HI рестрикционен сайт. До 50 µl краен обем се добавя 30µl dH₂O, 8µl 1.25 mM dNTPs, 5 µl 10x Pfu полимеразен реакционен буфер (Stratagene) и 1µl от всеки от двата първи, втори PCR продукта. Добавя се еквивалентно количество минерално масло и реакциите се нагряват до 94°C за една мнута. Добавя се Pfu полимераза (2.5 единици, Stratagene), последвано от 5 цикъла при 94°C за 30 секунди, 55°C за 30 секунди и 72°C за 2 минути. Температурата се повишава отново до 94°C и се добавят по 2µl от всеки 20 mM наличности от олигонуклеотидни праймери ZC15,516 (SEQ ID NO:51), 5' праймер, започващ при нуклеотид 1 на SEQ ID NO:45 и ZC15,347 (SEQ ID NO:47), след което следват 25 цикъла при 94°C за 30 секунди, 55°C за 30 секунди, 72°C за 2 минути и крайна екстензия за 7 минути при 72°C. Част от реакцията се визуализира чрез гел електрофореза. Открива се 789bp връзка, съответстваща на предполагаемия сайт.

TAC1-Fc4 и BCMA-Fc4 експресионно векторна конструкция

Експресионни плазмиди, съдържащи TAC1-Fc4 и BCMA-Fc4 смесени протеини, се създават чрез хомоложна рекомбинация в хлебна мая. Фрагмент от TCA1 cDNA се изолира чрез PCR, която включва полинуклеотидна последователност от нуклеотид 15 до нукелотид 475 от SEQ ID NO:5. Двата праймера, използвани в продукцията на TAC1 фрагмент, са: (1) праймер,

съдържащ 40 bp на 5' векторна странична последователност и 17 bp, съответстваща на аминокрай на TAC1 фрагмент от (SEQ ID NO:52); (2) 40 bp на 3' край, съответстващ на странична Fc4 последователност и 17 bp, съответстваща на карбоксилен терминал на TAC1 фрагмент (SEQ ID NO:53). До 100 µl краен обем се добавя 10 ng TAC1 еталон, 10 µl 10x Taq полимеразен реакционен буфер (Perkin Elmer), 8µl 2.5 mM dNTPs, 78µl dH₂O, 2µl от всеки от 20 mM наличности на олигонуклеотидни праймери SEQ ID NO:52 и SEQ ID NO:53 и Taq полимераза (2.5 единици, Life Technology). Добавя се еквивалентно количество минерално масло и реакциите се нагряват до 94°C за две минути, последвано от 25 цикъла при 94°C за 30 секунди, 65°C за 30 секунди, 65°C за 30 секунди, 72°C за 1 минута и рзаширяване при 72°C за 5 минути.

Фрагмент от ВСМА cDNA се изолира чрез PCR, която включва полинуклеотидна последователност от нуклеотид 219 до нуклеотид 362 на SEQ ID NO:7. Два праймера, използвани при получаването на ВСМА фрагмент, са олигонуклеотиден праймер, съдържащ 40 bp на 5' векторна странична последователност и 17 bp, съответстващи на аминокрай на ВСМА фрагмент (SEQ ID NO:54); и олигонуклеотиден праймер, съдържащ 40 bp на 3' край, съответстващ на странична Fc4 последователност и 17 bp, съответстваща на карбоксилен терминал на ВСМА фрагмент (SEQ ID NO:55). До 100 µl краен обем се добавя 10 ng ВСМА еталон, 10 µl 10x Taq полимеразен реакционен буфер (Perkin Elmer), 8µl 2.5 mM dNTPs, 78µl H₂O, 2µl от всеки от 20 mM наличности разтвори на олигонуклеотидни праймери SEQ ID NO:54 и SEQ ID NO:55. Добавя се еквивалентно количество минерално масло и реакциите се нагряват до 94°C за две минути, последвано от 25 цикъла при 94°C за 30 секунди, 65°C за 30 секунди, 72°C за 1 минута, последвано от разширение при 72 °C за 5 минути.

Фрагментът, съдържащ cDNA кодиращата Fc4 фрагменти, се създава по същия начин, един за всяка от TAC1 и ВСМА смесени конструкции. За TAC1

двата праймера, използвани при получаването на Fc4 фрагмент, са (горно и долно направление) олигонуклеотиден праймер, съдържащ 40 bp от 5' TACI странична последователност и 17 bp, съответстващи на карбоксилен терминал на Fc4 фрагмент (SEQ ID NO:56); и олигонуклеотиден праймер, съдържащ 40 bp на 3' край, съответстващ на странична векторна последователност и 17 bp, съответстваща на карбоксилен терминал на Fc4 фрагмент (SEQ ID NO:57). За ВСМА, праймерът от горното направление при получаването на Fc4 фрагмент е олигонуклеотиден праймер, съдържащ 40 bp на 5' ВСМА странична последователност и 17 bp, съответстващи на аминокиселинен терминал на Fc4 фрагмент (SEQ ID NO:58). Праймерът от долното направление за получаване на Fc4 за ВСМА конструкция е същият както този, описан по-горе за TACI- Fc4 (SEQ ID NO:57).

До 100 µl краен обем се добавя 10 ng Fc4 еталон, описан по-горе, 10 µl 10x Taq полимеразен реакционен буфер (Perkin Elmer), 8µl 2.5 mM dNTPs, 78µl dH₂O, 2µl от всеки от 20 mM наличностни разтвори на олигонуклеотидни праймери SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:57 за TACI и олигонуклеотиди SEQ ID NO:58 и SEQ ID NO:57 за ВСМА и Taq полимеразата (2.5 единици, Life Technology). Добавя се еквивалентно количество минерално масло и реакциите се нагряват до 94°C за две минути, последовано от 25 цикъла при 94°C за 30 секунди, 65°C за 30 секунди, 72°C за 1 минута, последвано от разширение при 72°C за 5 минути.

Десет микролитъра от всяка от 100 µl PCR реакции, описани по-горе, се поставят върху 0.8% LMP агарозен гел (Seaplaque GTG) с 1xTBE буфер за анализ. Останалите 90 µl от всяка от 100 µl PCR реакция се преципитират с добавка на 5 µl 1M NaCl и 250µl абсолютен етанол. Плазмид pZMP6 се срязва с SmaI до закрепване върху свързващия агент. Плазмид pZMP6 се получава от плазмид pCZR199 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, ATCC# 98668) и е бозайников експресионен вектор, съдържащ експресионни касети с CMV бърз ранен промотер, консенсусен интрон от изменяем регион на миши

имуноглобулинов тежко верижен локус, множество рестрикционни сайта за вмъкване на кодиращи последователности, стоп кодон и човешки растежно хормонен терминатор. Плазмидът също има *E.coli* източник на репликация, бозайник-селективна маркерна експресийна част с SV40 промотер, усилвател и източник на репликация, DHFR ген и SV40 терминатор. Векторът pZMP6 се получава от вектор pCZR199 чрез заместване на металотионин промотер с CMV бърз ранен промотер и Kozac последователности при 5' край на отворената четяща се рамка.

Сто микролитъра на подходящи клетки от хлебна мая (*S. cerevisiae*) се комбинират с 10 μ l, съдържащи приблизително 1 μ l от всеки TAC1 или BCMA извънклетъчен домен и Fc4 PCR фрагменти, благоприятни за рекомбинация с всеки, и 100ng от SmaI усвоен pZMP6 вектор и трансферирани към 0.2 cm електропорационна кювета. Смесите хлебна мая/DNA се подлагат на електропулсация при 0.75 kV (5kV/cm), безкрайно съпротивление и 25 μ F. Към всяка кювета се добавят 600 μ l от 1.2 M сорбитол и хлебната мая се разделя на два 300 μ l обема върху URA-D поставки и се инкубира при 30°C.

След около 48 часа Ura⁺ трансформанти от хлебната мая от единична поставка се ресуспендират в 1 μ l H₂O и се завъртат кратко към пелети - клетки на хлебната мая. Клетъчната пелета се ресуспендира в 1 μ l от лизис буфер (2% Тритон X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA). Петстотин микролитъра от лизираната смес се добавят към колба на Eppendorf, съдържаща 300 μ l киселинно промити стъклени зърна и 200 μ l фенол-хлороформ, разбърква се вихрово два или три пъти за по една минута, последвано от 5 минутно въртене в Eppendorf центрофуга при максимална скорост. 300 микролитъра от водната фаза се премества в нова колба и DNA преципитира с 600 μ l етанол, последвано от центрофугиране за 10 минути при 4°C. DNA пелет се ресуспендира в 100 μ l вода.

Трансформация на електрореагиращи *E.coli* клетки (DH10B, GibcoBRL) се извършва с 0.5-2 мл DNA преципитат от хлебна мая и 40 μ l от DH10B

клетки. Клетките се подлагат на електрически импулси при 2.0 кV/см, 400 ома и 25 мF. След електропорацията се поставят 1 мл SOC (2% Bacto Tryptone (Difco, Detroit, MI), 0.5% екстракт от хлeбна мая (Difco), 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM глюкоза) в 250 µl кратни части върху четири LB AMP поставки (LB broth Lennox), 1.8% Бакто- агар (Difco) и 100 mg/L ампицилин).

Отделни клонове, притежаващи правилната експресионна конструкция за TACL-Fc4 или BCMA-Fc4, са идентифицирани чрез рестриктивно усвояване за потвърждаване на наличието на вмъкването и това, че различните DNA последователности са свързани правилно една към друга. Вмъкването на положителни клонинги е потвърдено чрез анализи на последователностите. Разширена скала на плазмидна DNA е изолирана чрез използване на Qiagen Maxi кит (Qiagen), съгласно инструкциите на производителя.

ПРИМЕР 7

Експресия на TACI-Fc4 и BCMA-Fc4 при бозайцици

ВНК 570 клетки (ATCC NO: CRL-10314) се поставят в 10 cm клетъчни културални чинийки и се оставят да растат до приблизително 50 до 70% сливане една нощ при 37°C, 5% CO₂, в DMEM/FBS среда (DMEM, Gibco/BRL High Glucose, (Gibco BRL, Gaithersbrug, MD), 5% ембрионален говежди серум (Hyclone, Logan, UT), 1mM L-глутамин (JRH Biosciences, Lenexa, KS), 1mM натриев пируват (Gibco BRL). След това клетките се трансфектират с всеки от плазмидите TACI-Fc4/pZMP6 или BCMA-Fc4/pZMP6 чрез използване на Липофектамин™ (Gibco BRL), в свободна от серум (SF) среда (DMEM, 10mg/ml трансферин, 5 mg/ml инсулин, 2 mg/ml фетуин, 1% L-глутамин и 1% натриев пируват). TACI-Fc4/pZMP6 или BCMA-Fc4/pZMP6 се разтваря в 15 ml колби до пълен краен обем от 640 µl с SF среда. 35 µl от Липофектамин™ (Gibco BRL) се смесва с 605 µl SF среда. Тази Липофектамин™ смес се добавя към DNA смес и се оставя да инкубира около 30 минути при стайна температура. Пет милилитъра от SF среда се добавят към DNA-

Липофектамин™ сместа. Клетките се промиват веднъж с 5мл от SF среда, аспирират се и се добавя DNA-Липофектамин™ смес. Клетките се инкубират при 37°C за пет часа, след което се добавя среда от 6.4 мл DMEM/10% FBS, 1% PSN към всяка поставка. Поставките се инкубират при 37°C цяла нощ и на следващия ден сместа DNA-Липофектамин™ се разменя със свежа 5% DMEM/FBS среда. При извършване дневно по 5 пост-трансфекции, клетките се разцепват в T-162 колба в селектираща среда (DMEM/5% FBS, 1% L-GLU, 1% NaPyr). При приблизително 10 дни пост-трансфекция, две чинийки с 150мм култура от метотрексат устойчиви колонии от всяка трансфекция се трипсинизират и клетките се поставят в T- 162 колба и се трансферират към широка скала култури.

ПРИМЕР 9

Трансгенна експресия на ztnf4

Трансгенни животински експресиращи ztnf4 гени се получават чрез използване на възрастни, фертилни мъжки животни, достигнали плодова зрелост (B6C3f1), фертилни женски (B6C3f1), вазектомирани мъжки (B6D2f1) и възрастни фертилни женски (B6D2f1) (всички от Taconic Farms, Germantown, NY). Достигналите плодова зрелост фертилни женски се супервулират чрез Pregnant Mare`s серумен гонадотропин (Sigma, St. Lois, MO) и човешки хорионов гонадотропин (hCG(Sigma)). Супервулираните женски се съчетават последователно с възрастни фертилни мъжки екземпляри и копулацията се потвърждава чрез наличието на вагинални проби.

Оплодени яйцеклетки се събират чрез хирургическа скопия (Leica MZ12 Stereo Microscope, Leica, Weitzlar, Germany). След това яйцеклетките се промиват с хиалоронидаза и Whitten`s W640 среда (Таблица 8, всички реагенти могат да се доставят от Sigma Chemical Co.), която се инкубира с 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ при 37°C. Яйцеклетките се съхраняват при 37°C/5% CO₂ инкубатор до микроинжектиране.

ТАБЛИЦА 8

WHITTEN'S 640 СРЕДА

	mgs/200 ml	mgs/500 ml
NaCl	1280	3200
KCl	72	180
KH ₂ Cl	32	80
MgSO ₄ -7H ₂ O	60	150
Глюкоза	200	500
Ca ²⁺ Лактоза	106	265
Бензилпеницилин	15	37.5
Стрептомицин SO ₄	10	25
NaHCO ₃	380	950
Na пируват	5	12.5
H ₂ O	200 ml	500 ml
500 mM EDTA	100 µl	250 µl
5% фенолово червено	200 µl	500 µl
BSA	600	1500

858 bp отворената четяща рамка, кодираща пълен човешки TAC1 лиганд Blys (SEQ ID NO:35), се амплифицира чрез PCR така, че да въведе оптимално обозначен кодон и странични 5' *PmeI* и 3' *AscI* посредством олигонуклеотидни праймери на SEQ ID NO:36 и SEQ ID NO:37. Този фрагмент *PmeI/AscI* се субклонира в рKFO24, а В- и/или Т клетъчен рестрикционен трансгенен вектор, съдържащ Ig Em усилвател (690bp *NotI/XbaI* от рEmSR; (Bodrug et al., EMBO J. 13:2124-30, 1994), Ig V_h промотер (536 bp *HincII/XhoI* фрагмент от рJH1X(-); Hu et al., J. Exp. Med. 177:1681-90, 1993) SV40 16S интрон (171 bp *XhoI/HindIII* фрагмент от рEmSR), *PmeI/AscI* полисвързващ агент и човешкия растежно хормонен генен полиаденилационен сигнал (627 bp *SmaI/EcoRI*

фрагмент; Seeburg, DNA 1:239-49, 1982). Трансгенното вмъкване се сепарира от плазмидна черна кост чрез *NotI* усвояване и агарозно гел-пречистване, и оплодени яйцеклетки от съчетания на B6C3F1Тас мишки, описани по-горе, са микроинжектирани и имплантирани в псевдо бременни женски, по-специално както е описано по-рано (Malik et al., Molec. Cell. Biol. 15:2349-58, 1995)

Реципиентите се връщат в кафези по двойки и следва 19-21 дни бременност. След раждането се допуска период от 19-21 дни преди секс и отделяне на малкото, и с чиста ножица от опашката се прави 0.5см биопсия (използвана за генотипизиране).

Геномна DNA се получава от част от опашката чрез търговско достъпен кит (DNeasy 96 Tissue Kit; Qiagen, Valencia, CA) като се следват инструкциите на производителя. Геномна DNA се анализира чрез PCR чрез използване на праймери, означени като човешки разстежен хормон (hGH) 3' UTR част на трансгенния вектор. Праймерите ZC17251 (SEQ ID NO:38) и ZC17252 (SEQ ID NO:39) амплифицират 368-базова двойка фрагмент на hGH. Използването на еднакъв регион към човешката последователност (идентифициран от подреждане на DNA последователности на човешки и миши хормон на разстежа 3' UTR) показва, че PCR реакцията не амплифицира мишата последователност. Освен това, праймери ZC17156 (SEQ ID NO:40) и ZC17157 (SEQ ID NO:41), които хибридизират към векторни последователности и амплифицират cDNA вмъкване, могат да бъдат използвани заедно с hGH праймери. В тези експерименти DNA от животни позитивни за трансгенно получени две връзки, една 368-основна-двойка-връзка, съответстваща на hGH 3' UTR фрагмента, и връзка с изменчив размер, съответстват на cDNA вмъкване.

Веднъж установено, че животните са трансгенни (TG), те се кръстосват обратно в изродена верига чрез поставяне на TG женска с див тип мъжки или TG мъжки с една или две женски от див тип. Когато поколението се роди и отдели, двойките се разделят и техните опашки се отрязват за генотипизиране.

За проверка на експресия на трансгенно живо животно, се провежда биопсия. Анализът на степента на mRNA експресия на всеки трансген се извършва чрез RNA разтвор хибридизационен опит или PCR в реално време върху ABI Prism 7700 (PE Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) като се спазват инструкциите на производителя.

Клетъчно получаване и течна цитометрия

Анализират се основни мишки при различни възрасти. За течен цитометричен анализ (FACS) на лимфоидни тъкани се изолират костно мозъчни (BM) клетки от бедрената и тибийната кост чрез внимателно разчупване във фосфатно буферен разтвор (PBS) като се използва хаванче и чукче. Клетките се ресуспендират, отделят се от костните фрагменти чрез пасивна седиментация и се пелетират при 1000 x g. Спленоцити, тимоцити или лимфно възелни клетки се получават чрез раздробяване на целите тъкани между стъклени пластини, след което се извършва ресуспендиране и пелетиране на клетките както за костния мозък (BM). Клетки се ресуспендират в FACS воден буфер (FACS WB) (Hank's balanced salt solution, 1% BSA, 10 mM HEPES, pH 7.4) при концентрация от 20×10^6 клетки/мл преди оцветяване. За оцветяване, 1×10^6 клетки се трансферират към 5 мл туби и се промиват с 1 мл FACS WB, след което се пелетират при 1000 x g. След това клетките се инкубират върху лед за 20 минути в присъствие на насищащи количества от подходящите FITC-, PE- и/или TriColor (TC)-конюгиран mAbs в цял обем от 100 мл в FACS WB. Клетките се промиват с 1.5 мл от WB, пелетират, след което ресуспендират в 400 мл и се анализират върху FACSCalibur течен цитометър, като се използва CellQuest софтуер (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Детектори за преден (FSC) и страничен (SSC) светлинни дифузери са настроени на линейна скала, докато за всички три флуорисцентни канала (FL-1, FL-2 и FL-3) са използвани логаритмични детектори.

Извършва се компенсация за спектрално покриване между FL канали за всеки експеримент като се използват едноцветно означени клетъчни

популации. Всички клетки са събрани към диск и даните са анализирани чрез CellQuest софтуер. RBC и мъртви клетки се изключват от електронно получените данни на базата на FSC спрямо SSC профили.

Антитела

Флуоресцентно изотиоцианатно (FITC)-конюгирано анти-CD8 моноклонално антитяло (mAb) (клон 53-6.7) и фикоертирин (PE) - конюгиран анти-CD4 (клон RM4-5), анти-CD5 (клон 53-7.3), анти-CD19 (клон 1D3) и анти-синдекан (клон 281-2) mAbs са закупени от PharMingen (San Diego, CA). TriColor(TC)-конюгиран анти-CD45R/B220 mAb (клон RA3-6B2) е закупен от Caltag.

Трансгенни мишки над експресиращи *ztnf4* в лимфоидните отделения развиват нарастващ брой на периферни В клетки, увеличени плазмени клетки и по-високи нива на серумен имуноглобулин. Тези трансгенни животни имат повишен брой В200+ клетки в далака, лимфните възли и тимуса. Повишеният брой на далачни В клетки включва едновременно обикновени В-2 клетки и нормално рядката популация на В-1 клетки. Най-общо В-1 клетки са твърде ограничени към перитониалните и други телесни кухини, продуцират ниско афинитетни самореактивни антитела и често могат да бъдат свързани с развитието на автоимунни заболявания, като системен еритоматозен лупус SLE.

По-възрастни трансгенни животни продуцират автоантитела, развиват протеинурия и склеротични гломерулни характеристики на системен еритроматозен лупус.

Фигура 5А показва единични клетъчни суспензии на далак (горен панел), мезентеричен лимфен възел (среден панел) и костен мозък (долен панел), получени както е описано по долу, белязани с анти-В220-ТС и анализирани чрез течна цитометрия. Броят В220+ клетки във всяка тъкан се изчислява чрез умножение на процента В220+ клетки по общия брой живи клетки (трипан синьо изключване), преброени с хемоцитометър. Всеки бар

представя данни от индивидуални *ztnf4* трансгенни (Tg, полутъмен бар) или не-трансгенни контролни мишки.

Фигура 5B показва клетки, изолирани от *ztnf4* TG (десни панели) или не-трансгенни (леви панели), лимфен възел (горен ред), далак (средни редове), и тимус (долен ред), които са белязани с mAbs към молекулите, обозначени с (DC5, CD4, CD8), след което са анализирани чрез течна цитометрия. Показаните данни изключват умрели клетки RBC.

Фигура 5C показва общо IgG, IgM и IgE нива в серум от *ztnf4* трансгенни мишки, избрани във възраст от 6 до 23 седмици.

Фигура 5D показва амилуидно отлагане и удебелен мезангиум на гломерули, идентифицирани в H&E бъбречни секции от *ztnf4* трансгенни мишки в сравнение с нормални гломерули от контролни екземпляри.

Фигура 5E показва повишение в ефектор Т клетки в *ztnf4* трансгенни мишки, подобно на това, съобщено от Mackay et al., (J. Exp. Med. 190:1697-1710, 1999).

Разтворими TACI(BR43x2) или смеси BCMA-Ig се инжектират (IP, IM или IV) в *ztnf4* пре-експерсирани трансгенни животни. Използва се течен цитометричен анализ (FACS) на лимфоидни тъкани за идентифициране на всяка промяна в броя на B220+ В клетки в далака, лимфните възли и тимуса.

ПРИМЕР 10

Пряко свързване ELISA

За характеризиране на способността на разтворимия TACI-Ig или разтворимия BCMA-Ig да свърже и инхибира биологическата активност на *ztnf4* ин витро се използва пряко свързване ELISA.

Една 96 гнездна поставка е обвита с 1 µg/ml кози-анти-човешки Ig (Jackson Labs, Bar Harbor, MA) в ELISA А буфер (0.1 M Na₂HCO₃, pH 9.6, 0.2% NaN₃) и се инкубира за една нощ при 4°C. TACI, BCMA и несвързан TNF рецептор, такъв като *ztnf4* (SEQ ID NO:42) като контролен, се титруват с от 10µg/ml чрез петкратно разреждане до 320ng/ml плюс нула и се ко-инкубира с

2.5, 0.5 или 0.1 µg/ml биотинилирано ztnf4 или овариален албумин като негативна контрола и се инкубира за един час при стайна температура.

След това ко-инкубираната рецептор биотинилирана лигандна смес се добавя към кози-анти-човешки Ig-обвити 96 гнездни поставки, които след това се промиват (ELISA C, 500 µl, Tween 20 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), 200mg NaN₃, PBS до краен обем 1 литър) и се блокират със Superblock (Pierce, Rockford, IL). След това поставките се инкубират за два часа при 37°C.

Поставките се промиват още веднъж с ELISA C, последвано от добавяне на 100 µl/гнездо от неутро-адивин HRP при 1:10,000 в ELISA B (5 или 10µl BSA (Sigma) за 1% или 2% BSA съответно, 250 µl Tween 20 (Sigma), 100mg NaN₃, фосфатно буфериран солев разтвор pH 7.2 (PBS, Sigma) до краен обем от 500мл. Алтернативно, буферът може да бъде съставен от 1% или 2% BSA в ELISA C буфер. Поставките след това се обработват с ДЗА за 10 минути при стайна температура и са определени при 492.

ПРИМЕР 11

Биологично активен опит

Биологично активен опит се провежда за измерване на разтворима TACI-FC инхибиция на човешка В клетъчна стимулация чрез разтворим ztnf4. В клетки се изолират от периферни кръвни мононуклеарни клетки (PBMNC) чрез CD19 магнитни легла и VarioMacs магнитна сепарационна система (Miltenyi Biotec Auburn, CA) съгласно инструкциите на производителя. Пречистени В клетки се смесват с разтворим ztnf4 (25 ng/ml) и рекомбинантно човешко IL-4 (10 ng/ml Pharmingen) и се поставят (трикратно) върху кръгли дънни 96 гнездни поставки при 1×10^5 клетки за гнездо.

Разтворим TACI-FC се разрежда от 5 µg/ml до 6 ng/ml и се инкубира с В клетката за 5 дни, подлага се на пулсиране за една нощ на 4-тия ден с 1 µCi ³H тимидин (Amersham) за гнездо. Като контролен разтворим TACI-FC също се инкубира с В клетки и без наличие на ztnf4.

Поставките се прибират чрез Packard устройство и се преброяват чрез Packard четец. Разтворимият TACI-Ig рецептор инхибира способността на разтворим ztnf4 да стимулира В клетъчна пролиферация *in vitro* по начин, зависещ от дозата. Десет-кратен моларен излишък TACI-Ig напълно инхибира пролиферацията на човешки В клетки в отговор на разтворим ztnf4 в присъствие на IL-4.

ПРИМЕР 12 ORIGIN Изследване

Нива на ztnf4 в индивиди с болестни симптоми (например такива като SLE, ревматоиден артрит) спрямо нормалните индивиди, са определени чрез електрохемилюминисцентно изследване. Стандартна крива, получена от разтворим, човешки ztnf4 при 10 ng/ml, 1ng/ml, 0.1ng/ml, 0.01 ng/ml и 0 ng/ml, е получена в ORIGIN буфер (Igen, Gaithersburg, MD). Серумни примери се разреждат в ORIGIN буфер. Стандартите и примерите инкубират при стайна температура за 2 часа с биотинилирано заешко анти-човешко ztnf4 –NF BV анти тяло, разрежено до 1 µg/ml в Origin буфер (IGEN) и рутенилиран заешко анти-човешко ztnf4–NF BV поликлонално анти тяло, разрежено до 1µg/ml в Origin буфер (IGEN). След инкубацията примерите се центрофугират и към всеки от стандартите и примерите се добавя 0.4mg/ml стрептавидин Dynabeads (Dyna, Oslo, Norway) при 50µg/l на туба и се инкубират за 30 минути при стайна температура. След това примерите се центрофугират и се четат с анализатор Origin Analyzer (Igen) съгласно инструкциите на производителя. Origin изследването се базира на електрохемилюминисценция и предоставя резултати в ECL - какво представлява това, как работи и какво означава.

Повишено ниво на ztnf4 е открито в серумните примери от двете NZBWF1/J и MRL/MpJ-Fas^{lpr} мишки, които прогресират към напреднал стадий на гломерулонефрит и автоимунно заболяване.

ПРИМЕР 13 Разтворим TACI-Ig в спонтанен модел на SLE

Мишки стават симптоматични за спонтанен SLE приблизително на 7-9

месечна възраст. TACL-Fc се прилага на NZBW мишки за наблюдаване на техния супресивен ефект върху В клетки по време на 5 седмичния период, когато средно В клетъчна авто-антитяло продукция би трябвало да бъде на високи нива в NZBW мишки.

Сто осем седмични женски мишки (NZB x NZW) F₁ (Jackson Labs) се разделят на 6 групи по 15 мишки. Преди лечение мишките се наблюдават веднъж на месец за протеин и кръв в урината, което е отбелязано и за CBC и серумни банки. Серум се изследва за присъствие на авто-антитела. Тъй като протеинурията е важен знак за гломерулонефрит, протеинните нива в урината са наблюдавани чрез устройство на равни интервали по време на курса на изследване. Преди лечение животните се претеглят. Дозирането започва когато мишките са приблизително 5 месечни. Мишките получават три пъти седмично за 5 седмици интраперитонеално инжекции само с носител (PBS) или човешки IgG-FC (контролен протеин) или TACL-FC4 (тест протеин).

Група (5 мишки всяка)	Лечение	доза
1	нетретирана контролна	
2	само носител	
3	човешки IgG-FC	20 µg
4	човешки IgG-FC	100 µg
5	човешки IgG-FC4	20 µg
6	Човешки IgG-FC4	100 µg

Кръв се събира два пъти по време на дозирането и поне два пъти след дозиране. Нивата на урината за протеинурия и телесни тегла се измерват всеки 2 седмици след започването. Стойностите на нивата на кръв и урина и телесно тегло се събират по време на ефтаназията. Измерват се и теглото на далака, тимуса, черния дроб с жлъчния мехур, левия бъбрек и мозъка. Далакът и тимусът се разделят за FACS анализ и хистология. За хистология се събират

също субмандибуларни слюнчени жлези, мезентерична лимфно-възелна верига, чернодробен лоб с жлъчен мехур, сляпо черво и дебело черво, стомах, тънки черва, панкреас, десен бъбрек, надбъбречна жлеза, език с трахея и езофагус, сърце и бели дробове.

Фигура 6 показва повишено ниво на *ztnf4* в серум от NZBWF1 и MRL/*lpr/lpr* мишки, които съответстват на развитието на SLE. Горният панел на фигура 6 показва корелацията на *ztnf4* серумни нива с възрастта, 68 NZBWF1 мишки избрани от 10 до 40 седмична възраст и 10 седмични и 30 седмични NZB/V контролни мишки. Средният панел показва корелация с протеинурията на три степени - следи към 20 mg/dl (T-30), 100-300 ng/dl и 2000 mg/dl в NZBWF1 мишки в сравнение с NZB/V контролни мишки. Долният панел показва *ztnf4* нива с различни титри на анти-ds DNA антитяло в NZBWF1 мишки в сравнение с контролни NZB/V мишки.

Фигура 6B показва същата корелация, направена на 23 MRL/*lpr/lpr* мишки разпределени от 18 до 24 седмична възраст и 10 контролни 11 седмични MRL/MpJ мишки.

Фигура 7 показва резултати от анализа на урина. Счита се, че мишките имат протеинурия, ако резултатът е $\geq 100\text{mg/dl}$. (A) PBS, (B) човешки IgG FC, 100 мг, (C) човешки IgG FC, 20 мг, (D) човешки TACI-IgG, 100 мг и (E) човешки TACI-IgG, 20 мг. Мишки, третирани с разтворима TACI-IgG смес, показват намаление на протеинурия.

Анализ на периферна кръв от третирани животни показва, че бяла кръвна клетка и лимфоцити са редуцирани при TACI-FC третирани мишки (20 и 100 мг) в сравнение с (20 и 100 мг) и PBS третирани мишки 2 седмици след началото на третирането. FACS анализи (лимфоцитен изход) на периферна кръв, взета 6 седмици след започване на третирането (2 седмици след последното третиране) и показва драматично намаляване в процента на B клетките, присъстващи в примерите. B- клетъчните нива са все още в наклония участък при 5 седмици след последното третиране, но не толкова драматично. Таблица 9 показва среден резултат (стандартно отклонение) за мишките във

всяка третирана група (таблица 9). Отклонението в % на В- клетките в периферната кръв също се наблюдава 2 седмици по време на третирането.

ТАБЛИЦА 9

Лечение	Седмица 2		Седмица 5
	% В клетки	% Т клетки	% В клетки
PBS	26.05 (6.52)	67.05 (6.80)	20.83 (3.14)
100 mg FC	23.34 (5.77)	68.23 (7.30)	25.04 (8.07)
20 mg FC	24.09 (6.26)	65.27 (7.18)	18.96 (6.42)
100 mg TACI-FC	11.07 (5.03)	79.06 (6.71)	14.79 (4.76)
20 mg TACI-FC	16.37 (7.27)	69.72 (8.90)	19.14 (5.27)

ПРИМЕР 14Разтворим TACI-Ig в нормални мишки

TACI-FC се прилага към B1ab/C мишки за наблюдение на неговия ефект върху нормални мишки. Шестдесет осеммесечни женски мишки B1ab/C (HSD) се разделят на 12 групи по 5 мишки. Преди третирането мишките се претеглят и се отделя кръв за CBC и серумни банки. Групи от 1 до 9 получават интраперитонеални инжекции (IP) само от носител (PBS) или човешки IgG-FC (контролен протеин) или TACI-FC4 (тест протеин) дневно за 12 дни и до загиването на 14^{ия} ден. Групи 10 и 11 се инжектират с IP инжекции 3 пъти седмично за две седмици до загиване на 14^{ия} ден.

Група (5 мишки всяка)	Лечение	Доза
1	Човешки TACI-FC4	200 mg
2	Човешки TACI-FC4	100 mg
3	Човешки TACI-FC4	20µg
4	Човешки TACI-FC4	5µg
5	Човешки FC4	200µg

6	Човешки FC4	100 mg
7	Човешки FC4	20 mg
8	Човешки FC4	5 mg
9	Носител	Както е използван
10	Човешки TACI-FC4	100 mg
11	Човешки FC4	100 mg
12	Нетретирана контрола	

Кръв се събира на 7мия и 12ия ден. Кръв и телесно тегло се събират по време на ефтаназията. Измерва се теглото на далака, тимуса и мозъка. Далакът и тимусът се разделят за FACS анализ и хистология. Кожа, далак, мезентерична LN верига, надмандибуларни слюнчени жлези, яйчници, матка, цервикален канал, пикочен мехур, мезентерична лимфно-възелна верига, чернодробен лоб с жлъчен мехур, сляпо и дебело черво, стомах, тънки черва, панкреас, десен бъбрек, надбъбречна жлеза, език с трахея и езофагос, сърце, тимус, бедрен мускул, лява и дясна бедрена кост и мозък също могат да бъдат събрани за хистологично изследване.

Както е описано по-горе в Пример 13, наблюдава се значително намаление в проценти на В клетките в периферни кръвни клетки, взети от всички TACI-FC4 третирани примери, в сравнение с тези, третирани с FC4 или PBS самостоятелно и анализирани чрез CBC или FACS на седмия ден (чрез CBC) и дванадесетия ден (като се използва FACS). Освен това има около 50% намаление на В клетки в далаци, взети от животни, третирани с TACI-FC4, в сравнение с тези от FC4- третирани мишки на четиринадесетия ден.

ПРИМЕР 15

Анти ds-DNA ELISA

Автоимунността се характеризира чрез високи нива на анти-удвоени верижни DNA антитела. За измерване на нивата на анти-dsDNA антитела в двете пре-експресиращи ztnnf4 трансгенни мишки и MZBW мишките е

проведено ELISA изследване. 96 гнездна микротитърна поставка (Nunc) се обвива с поли-L-лизин (Sigma) (20 $\mu\text{l/ml}$ в 0.1 M Tris буфер, pH 7.3) при 75 $\mu\text{l/гнездо}$ и инкубира една нощ при стайна температура. Поставките след това се промиват в dH_2O и пълнят с поли dAdT (Sigma) (20 $\mu\text{l/ml}$ в 0.1 M Tris буфер pH 7.3) при 75 $\mu\text{l/гнездо}$ и инкубират при стайна температура за 60 мин., след което се промиват с dH_2O и блокират с 2% BSA (Sigma) в Tris буфер за 30 минути при стайна температура, последвано от крайно промиване с dH_2O .

Серумни примери се вземат от *ztnf4* трансгенни мишки, описани в пример 10 и NZBW мишките, описани в пример 11. Серумните примери се разреждат 1:50 в 1% BSA/2% BGG (Calbiochem) в Tris буфер. Разредените примери след това се титрират в поставката при съотношения 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 и 1:6400 (μl /гнездо) и инкубират за 90 минути при стайна температура.

След това поставките се промиват във dH_2O и кози анти-миши IgG-Fc-*HRP* (Cappel) разреден до 1:1000 в 1% BSA/2%BGG и се добавя при 50 $\mu\text{l/гнездо}$. Поставките се инкубират за 60 минути при стайна температура и се промиват 5 пъти в dH_2O и се обработват с OPD, една таблетка/10 мл и Novo D се поставят в 100 $\mu\text{l/гнездо}$. Обработката се стопира с 1N H_2SO_4 , 100 $\mu\text{l/гнездо}$ и OD четене при 492nm.

Фигура 8 показва анти-ds DNA нива в две *ztnf4* трансгенни мишки (23 седмична възраст), 2 не-трансгенни титърни двойки, сравнени с нивата, определени в серум от NZBWF1 (32 седмична възраст) и *MRL/lpr/lpr* (19 седмична възраст) мишки.

ПРИМЕР 16

Разтворим TACI-Ig в спонтанен модел на ELE

На 25 женски PLxSJL F1 мишки (12 седмична възраст, Jackson Labs) са поставени субкутанни инжекции от антиген (миелин протеолипиден протеин, PLP, остатъци 139-151), формулирани в пълен Freund's адювант при доза 125 μg /мишка. Мишките са разделени на 5 групи по 5 мишки. Поставени са

интраперитонеални инжекции от пертусивен токсин (400ng) на нулевия и на втория ден. Групите получават еднократна, десетократна или стократна доза от TACI, BCMA или BR43x2, една група получава само носител и една група не е третирана. Предпазваща терапия започва на 0 ден, интервенцията започва на 7 ден или при клинически симптом. Симптоми на заболяване, загуба на тегло и парализни прояви на приблизително 10-14 ден и накрая за около 1 седмица. Животните се изследват дневно чрез събиране на телесните тегла и определяне на клиничния резултат, който съответства на усилването на техните симптоми. Клинични прояви на EAE се наблюдават на 10-14 ден от заразяването и продължават приблизително 1 седмица. В края на изследването всички животни се ефтанзират чрез свръх доза газ и загиват. Главният и гръбначният мозък се събират за хистология или се замразяват за mRNA анализ. Телесното тегло и данни от клинични резултати са отбелязани индивидуално и по групи.

Клиничен резултат

- | | |
|-----|--|
| 0 | нормално |
| 0.5 | слабо, опашният тонус може да бъде редуциран, но не отсъства |
| 1 | опашен сегмент (не може да си вдигне опашката, когато мишката е поставена на основата на опашката) |
| 2 | опашен сегмент, слаби крака (не може да си вдигне опашката, може да стои права върху задните крака, но краката са огънати) |
| 3 | пареза (не може да стои с краката под тялото, пълзи с прострени назад крака) |
| 4 | парализа (не може да мърда задните крака, влачи краката, когато се опитва да ходи) |
| 5 | квадриплегия (парализа на предните крака или движение в кръг, може да има наклонена глава) |
| 6 | агонизиращ (напълно парализирано, не може да достигне храна или вода, загиващо животно) |

ПРИМЕР 17TACI-FC и CIA модел за ревматоиден артрит

Осем седмични мъжка DBA/1J мишки (Jackson Labs) се разделят на групи по 5 мишки в група и получават две подкожни инжекции от 50-100 μ l от 1mg/ml колаген (птичи или говежди източник) на 3 седмични интервали. Една контролна група не се инжектира. Първата инжекция се оформя в пълен адювант на Freund, а втората инжекция се оформя в непълен адювант на Freund. TACI-FC се прилага профилактично във или преди втората инжекция или след като животното проявява клиничен резултат от 2 или повече прояви поне след 24 часа. Животните започват да показват симптоми на артрит след втората колагенова инжекция, обикновено по време на 2-3 седмица. Продължителността на заболяването се оценява по всяка лапа чрез уред за измерване на дебелината на лапата и се отбелязва клиничния резултат (0-3) за всяка лапа. Клиничен резултат 0 означава нормален, 1 - възпалени пръсти, 2 - леко възпаление на лапата, 3 - средно възпаление на лапа, 4 - силно възпаление на лапата. Животните се ефтанзират след като се установи болестта след определен период от време, обикновено 7 дни. Лапите се събират за хистология или mRNA анализ и серумът се събира за имуноглобулиново и цитокиново изследване.

ПРИМЕР 18Неутрализиращи TACI антитела

Поликлонални анти-пептидни антитела се получават чрез имунизирание на два женски ново зеландски бели зайци с пептида или huztnf4-1 SAGIAKLEEGPELQLAIPRE (SEQ ID NO:59) или huztnf4-2 SAGIAKLEEGPELQLAIPRE (SEQ ID NO:60). Пептидите са синтезирани чрез Приложен биосистемен модел 431A пептиден синтезатор (Applied Biosystems, Inc. Foster City, CA) съгласно инструкциите на производителя. Пептидите след това се конюгираат към носител-протеинов ключов хемоцианин (KLH) с малеимид активация. На всеки от зайците се поставя начална

интраперитонеална (ip) инжекция от 200µg пептид в пълен Freund адювант, последвано от активиращи ip инжекции от 100 µg пептид в непълен Freund адювант всеки 3 седмици. Седем до десет дни след прилагането на втората активираща инжекция (три пълни инжекции) от животните се взема кръв и серумът се събира. След това животните се активират и се взема кръв на всеки три седмици.

ztnf4 пептид-специфични заешки серуми се охарактеризират чрез ELISA титърна проверка чрез 1µg/ml от пептидите, използвани за получаване на антитялото (SEQ ID NO:59 и NO:60) като антитяло цел. Два заешки серума на huztnf4-1 пептид (SEQ ID NO:59) имат титър към техния специфичен пептид при разреждане от 1:1E5 (1:100 000). Два заешки серума на huztnf4-2 пептид (SEQ ID NO:60) имат титър към техния специфичен пептид при разреждане от 1:5E6 и към рекомбинантни с пълна дължина протеини (N-терминал-FLAG-тагов ztnf4, получен в бакуловирис (huztnf4-NF-Bv) и C-терминален FLAG-тагов ztnf4q, получен в ВНК клетки) при разреждане 1:5E6.

ztnf4-пептидно специфични поликлонални антитела са афинитетно пречистени от заешки серум чрез CNBR-SEPHAROSE 4B протеин колони (Pharmacia LKB), които са получени чрез 10mgs от специфичните пептиди (SEQ ID NO:59 или NO:60) за грам CNBr-SEPHAROSE, последвано от 20X диализа в PBS за една нощ. Ztnf4 специфични антитела са охарактеризирани чрез ELISA титърна проверка, използвайки 1µg/ml от подходящ пептиден антиген или рекомбинантен пълна дължина протеин (huztnf4-NF-Bv) като антитяло цели. Долната граница на откриване (LLD) на заешки анти-huztnf4-1 афинитет пречистено антитяло върху неговият специфичен антиген (huztnf4-1-пептид, SEQ ID NO:59) е с разреждане от 5ng/ml. Долната граница (LLD) на откриване на заешки анти-huztnf4-2 афинитет пречистено антитяло върху неговият специфичен антиген (huztnf4-2 пептид, SEQ ID NO:60) е с разреждане от 0.5 ng/ml. Долната граница на откриване (LLD) на заешки анти-

huztnf4-1 афинитет пречистено антителя върху рекомбинантен протеин huztnf4-NF-Bv е с разреждане от 5 ng/ml.

Моноклонални антители на мишки са получени и избрани за инхибиция от инхибиция на биотин белязан разтворим ztnf4. Никой от TАСI монклоналните антители (248.14, 248.23, 248.24 или 246.3) не блокира ztnf4 свързване върху ВСМА. Моноклонално 248.23 редуцира свързване на 10 ng/ml ztnf4-биотин до около 50%, когато средата е разрежена до 1:243 и намалява свързване до около два пъти в неразредена среда. Моноклонално 246.3 редуцира свързване на 10ng/ml ztnf4-биотин към около 50% между 1:243 и 1:181 разреждане на установена среда и намалява свързване пет пъти в неразредена среда.

От изложеното по-горе е ясно, че въпреки специфичните изпълнения на изобретението, описани тук като илюстрация, различни модификации могат да бъдат направени без отклонение от смисъла и обхвата на изобретението, с които то не се ограничава, освен чрез патентните претенции.

ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Метод за инхибиране *ztnf4* активност в бозайници, включващ прилагане върху бозайниците на количество от съединение, избрано от групата, съдържаща:

- а) полипептид, съдържащ извънклетъчен домен на BR43x2;
- б) полипептид, съдържащ извънклетъчен домен на TAC1;
- в) полипептид, съдържащ извънклетъчен домен на BCMA;
- г) полипептид, съдържащ последователността SEQ ID NO:10;
- д) антияло или антияло фрагмент, който свързва специфично към полипептид на SEQ ID NO:2;
- е) антияло или антияло фрагмент, който свързва специфично към полипептид на SEQ ID NO:4;
- ж) антияло или антияло фрагмент, който свързва специфично към полипептид на SEQ ID NO:6;
- з) антияло или антияло фрагмент, който свързва специфично към полипептид на SEQ ID NO:8;
- и) антияло или антияло фрагмент, който свързва специфично към полипептид на SEQ ID NO:10;
- к) полипептид на SEQ ID NO:4;
- л) аминокиселинни остатъци 1-166 на SEQ ID NO:6 и
- м) аминокиселинни остатъци 1-150 на SEQ ID NO:8.

2. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че съединението е смесен протеин, съдържащ първа част и втора част, присъединени чрез пептидна връзка, като първата част съдържа полипептид, избран от групата, съдържаща :

- а) полипептид, съдържащ последователността SEQ ID NO:8;

б) полипептид, съдържащ аминокиселинни остатъци 25-58 на SEQ ID NO:2;

в) полипептид, съдържащ аминокиселинни остатъци 34-66 на SEQ ID NO:6;

г) полипептид, съдържащ аминокиселинни остатъци 71-104 на SEQ ID NO:6;

д) полипептид, съдържащ аминокиселинни остатъци 25-104 на SEQ ID NO:6;

е) полипептид, съдържащ аминокиселинни остатъци 8-37 на SEQ ID NO:8;

ж) полипептид, съдържащ аминокиселинни остатъци 41-88 на SEQ ID NO:8;

з) полипептид, съдържащ аминокиселинни остатъци 8-88 на SEQ ID NO:8; и

втората част, съдържаща друг полипептид.

3. Метод съгласно претенция 2, характеризира се с това, че първата част съдържа допълнително полипептид, избран от групата, съдържаща :

а) аминокиселинни остатъци 59-120 на SEQ ID NO:2;

б) аминокиселинни остатъци 105-166 на SEQ ID NO:6; и

в) аминокиселинни остатъци 89-150 на SEQ ID NO:8.

4. Метод съгласно претенция 2, характеризира се с това, че първата част е избрана от групата, съдържаща :

а) полипептид, съдържащ извънклетъчен домен на BR43x2;

б) полипептид, съдържащ извънклетъчен домен на TAC1; и

в) полипептид, съдържащ извънклетъчен домен на BCMA.

5. Метод съгласно претенция 2, характеризира се с това, че първата част е избрана от групата, съдържаща:

а) полипептид на SEQ ID NO:4;

б) аминокиселинни остатъци 1-154 на SEQ ID NO:6 и

- в) аминокиселинни остатъци 1-48 на SEQ ID NO:8.
6. Метод съгласно претенция 2, характеризиращ се с това, че втората част е имуноглобулинов тежко верижен постоянен регион.
 7. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че антиятлото или антиятло-фрагментът е избран от групата, съдържаща:
 - а) поликлонално антиятло;
 - б) муриново моноклонално антиятло;
 - в) хуманизирано антиятло, получено от б); и
 - г) човешко моноклонално антиятло.
 8. Метод съгласно претенция 7, характеризиращ се с това, че антиятло фрагмента е избран от групата, съдържаща F(ab'), F(ab), Fab', Fab, Fv, scFv и минимално различаващ се участък.
 9. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че бозайникът е примат.
 10. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че ztnf4 активността е свързана с В лимфоцити.
 11. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че ztnf4 активността е свързана с активирани В лимфоцити.
 12. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че ztnf4 активността е свързана с остатъци на В лимфоцити.
 13. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че ztnf4 активността е свързана с антиятло продукция.
 14. Метод съгласно претенция 13, характеризиращ се с това, че антиятло продукцията е свързана с автоимунното заболяване.
 15. Метод съгласно претенция 14, характеризиращ се с това, че автоимунното заболяване е системен лупус еритроматозис, миастения гравис, мултиплетна склероза или ревматоиден артрит.
 16. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че ztnf4 активността е свързана с астма, бронхит или емфизем.

- 17.Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че ztnf4 активността е свързана с краен стадий бъбречна недостатъчност.
18. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че ztnf4 активността е свързана с бъбречно заболяване.
- 19.Метод съгласно претенция 18, характеризиращ се с това, че ztnf4 активността е свързана с гломерулонефрит, васкулит, нефрит или пиелонефрит.
- 20.Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че ztnf4 активността е свързана с бъбречни неоплазми, мултиплетни миеломи, лимфоми, леко верижна невропатия или амилоидоза.
- 21.Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че ztnf4 активността е свързана с ефекторни Т клетки.
- 22.Метод съгласно претенция 21, характеризиращ се с това, че ztnf4 активността е свързана с умерен имунен отговор.
- 23.Метод съгласно претенция 21, характеризиращ се с това, че ztnf4 активността е свързана с имуносупресия.
- 24.Метод съгласно претенция 21, характеризиращ се с това, че имуносупресията е свързана с трансплантационно отхвърляне, трансплантационно обратно гостоприемниково заболяване или възпаление.
- 25.Метод съгласно претенция 24, характеризиращ се с това, че ztnf4 активността е свързана с автоимунни заболявания.
- 26.Метод съгласно претенция 25, характеризиращ се с това, че автоимунното заболяване е инсулин зависим диабетен мелитус или болест на Крон.
- 27.Метод съгласно претенция 26, характеризиращ се с това, че ztnf4 активността е свързана с възпаление.
- 28.Метод съгласно претенция 27, характеризиращ се с това, че възпалението е свързано със ставна болка, гълтане, анемия, или септичен шок.

29. Метод за инхибиране на BR43x2, TAC1 или BCMA рецептор-лиганд образуване, включващо прилагане на количество от съединение, избрано от групата, съдържаща:

- а) полипептид, съдържащ извънклетъчен домен на BR43x2;
- б) полипептид, съдържащ извънклетъчен домен на TAC1; и
- в) полипептид, съдържащ извънклетъчен домен на BCMA.
- г) полипептид, съдържащ последователността SEQ ID NO:10;
- д) антитяло или антитяло фрагмент, който свързва специфично към полипептид на SEQ ID NO:2;
- е) антитяло или антитяло фрагмент, който свързва специфично към полипептид на SEQ ID NO:4;
- ж) антитяло или антитяло фрагмент, който свързва специфично към полипептид на SEQ ID NO:6;
- з) антитяло или антитяло фрагмент, който свързва специфично към полипептид на SEQ ID NO:8;
- и) антитяло или антитяло фрагмент, който свързва специфично към полипептид на SEQ ID NO:10;
- к) антитяло или антитяло фрагмент, който свързва специфично към полипептид на SEQ ID NO:18;
- л) антитяло или антитяло фрагмент, който свързва специфично към полипептид на SEQ ID NO:20;
- м) полипептид на SEQ ID NO:4;
- н) аминокиселинни остатъци 1-166 на SEQ ID NO:6 и
- о) аминокиселинни остатъци 1-150 на SEQ ID NO:8.

30. Метод съгласно претенция 29, характеризиращ се с това, че съединението е смесен протеин, съдържащ първа част и втора част, присъединени чрез пептидна връзка, като първата част съдържа полипептид, избран от групата, съдържаща :

- а) полипептид, съдържащ последователността SEQ ID NO:8;

б) полипептид, съдържащ аминокиселинни остатъци 25-58 на SEQ ID NO:2;

в) полипептид, съдържащ аминокиселинни остатъци 34-66 на SEQ ID NO:6;

г) полипептид, съдържащ аминокиселинни остатъци 71-104 на SEQ ID NO:6;

д) полипептид, съдържащ аминокиселинни остатъци 25-104 на SEQ ID NO:6;

е) полипептид, съдържащ аминокиселинни остатъци 8-37 на SEQ ID NO:8;

ж) полипептид, съдържащ аминокиселинни остатъци 41-88 на SEQ ID NO:8;

з) полипептид, съдържащ аминокиселинни остатъци 8-88 на SEQ ID NO:8; и

втората част, съдържаща друг полипептид.

31. Метод съгласно претенция 30, характеризира се с това, че първата част допълнително съдържа полипептид, избран от групата съдържаща:

а) аминокиселинни остатъци 59-120 на SEQ ID NO:2;

б) аминокиселинни остатъци 105-166 на SEQ ID NO:6; и

в) аминокиселинни остатъци 89-150 на SEQ ID NO:8.

32. Метод съгласно претенция 30, характеризира се с това, че първата част е избрана от групата, съдържаща:

а) полипептид, съдържащ извънклетъчен домен на BR43x2;

б) полипептид, съдържащ извънклетъчен домен на TACI; и

в) полипептид, съдържащ извънклетъчен домен на BCMA

33. Метод съгласно претенция 30, характеризира се с това, че първата част е избрана от групата, съдържаща:

а) полипептид на SEQ ID NO:4;

б) аминокиселинни остатъци 1-154 на SEQ ID NO:6 и

в) аминокиселинни остатъци 1-48 на SEQ ID NO:8.

34. Метод съгласно претенция 30, характеризиращ се с това, че втората част е имуноглобулинов тежко верижен постоянен регион.
35. Метод съгласно претенция 29, характеризиращ се с това, че антиятлото или антиятло-фрагментът е избрано от групата, съдържаща :
- а) поликлонално антиятло;
 - б) муриново моноклонално антиятло;
 - в) хуманизирано антиятло, получено от б); и
 - г) човешко моноклонално антиятло.
36. Метод съгласно претенция 35, характеризиращ се с това, че антиятло фрагментът е избран от групата, съдържаща F(ab'), F(ab), Fab', Fab, Fv, scFv и минимално различаващ се участък.
37. Метод съгласно претенция 29, характеризиращ се с това, че BR43x2, TAC1 или BCMA рецептор-лиганд образуването е свързано с В лимфоцити.
38. Метод съгласно претенция 29, характеризиращ се с това, че BR43x2, TAC1 или BCMA рецептор-лиганд образуването е свързано с активирани В лимфоцити.
39. Метод съгласно претенция 29, характеризиращ се с това, BR43x2, TAC1 или BCMA рецептор-лиганд образуването е свързано с остатаци на В лимфоцити.
40. Метод съгласно претенция 29, характеризиращ се с това, че BR43x2, TAC1 или BCMA рецептор-лиганд образуването е свързано с антиятло продукция.
41. Метод съгласно претенция 29, характеризиращ се с това, че антиятло продукцията е свързана с автоимунно заболяване.
42. Метод съгласно претенция 41, характеризиращ се с това, че автоимунното заболяване е системен лупус еритроматозис, миастения гравис, мултиплетна склероза или ревматоиден артрит.

43. Метод съгласно претенция 29, характеризиращ се с това, че BR43x2, TAC1 или VCMA рецептор-лиганд образуването е свързано с астма, бронхит или емфизем.
44. Метод съгласно претенция 29, характеризиращ се с това, че BR43x2, TAC1 или VCMA рецептор-лиганд образуването е свързано с краен стадий бъбречна недостатъчност.
45. Метод съгласно претенция 29, характеризиращ се с това, че BR43x2, TAC1 или VCMA рецептор-лиганд образуването е свързан с бъбречно заболяване.
46. Метод съгласно претенция 45, характеризиращ се с това, BR43x2, TAC1 или VCMA рецептор-лиганд образуването е свързан с гломерулонефрит, васкулит, нефрит или пиелонефрит.
47. Метод съгласно претенция 29, характеризиращ се с това, че ztnf4 активността е свързана с бъбречни неоплазми, мултиплетни миеломи, лимфоми, леко верижна неуропатия или амилоидоза.
48. Метод съгласно претенция 29, характеризиращ се с това, BR43x2, TAC1 или VCMA рецептор-лиганд образуването е свързан с ефекторни T клетки.
49. Метод съгласно претенция 48, характеризиращ се с това, че BR43x2, TAC1 или VCMA рецептор-лиганд образуването е свързан с регулиране на имунен отговор.
50. Метод съгласно претенция 49, характеризиращ се с това, че рецептор-лиганд образуването е свързан с имunosупресия.
51. Метод съгласно претенция 50, характеризиращ се с това, че имunosупресията е свързана с трансплантационно отхвърляне, трансплантационно обратно гостоприемниково заболяване или възпаление.
52. Метод съгласно претенция 50, характеризиращ се с това, че рецептор-лиганд образуването е свързано с автоимунни заболявания.

53. Метод съгласно претенция 52, характеризиращ се с това, че автоимунното заболяване е инсулин зависим диабетен мелитус или болест на Крон.
54. Метод съгласно претенция 50, характеризиращ се с това, че BR43x2, TAC1 или VCMA рецептор-лиганд образуването е свързано с възпаление.
55. Метод съгласно претенция 54, характеризиращ се с това, че възпалението е свързано със ставна болка, гълтане, анемия, или септичен шок.
56. Изолирана полинуклеотидна молекула, кодираща полипептид на SEQ ID NO: 2.
57. Изолирана полинуклеотидна молекула, кодираща полипептид на SEQ ID NO: 1
58. Експресионен вектор, съдържащ следните оперативни свързани елементи:
транскрипционен промотер;
полинуклеотидна молекула, съгласно претенция 56; и
транскрипционен терминатор.
59. Културална клетка, в която е въведен експресионен вектор, съгласно претенция 58, характеризираща се с това, че културалната клетка експресира полипептида, кодиран чрез полинуклеотиден сегмент.
60. Метод за получаване на полипептид, съдържащ:
културиране на клетка, в която е въведен експресионен вектор съгласно претенция 58, характеризиращ се с това, че
клетката експресира полипептида, кодиран чрез полинуклеотидната молекула; и
възстановяване на експресирания полипептид.
61. Изолиран полипептид с последователност SEQ ID NO: 2.
62. Полипептид съгласно претенция 61, характеризиращ се с това, че е в комбинация с фармацевтично приемлив носител.

```

TacI -----MSGLGRSRRG
BR43X1 -----GRSRRG
BR43X2 -----MSGLGRSRRG
BCMA -----

```

```

TacI  GRSRVDQEER FPQGLWTGVA MRSCPEEQYW DPLL-GTCMS CKTICNHQSQ
BR43X1 GRSRVDQEER FPQGLWTGVA MRSCPEEQYW DPLL-GTCMS CKTICNHQSQ
BR43X2 GRSRVDQEER -----
BCMA  -----MLQM AGQCSQNEYF DSSL-HACIP CQLRCSSTNP
          <--- 1st cys repeat -----

```

```

TacI  -RTCAAFCRS L-----SC RKEQGKFDYH LL-RD-CISC ASICGQHPKQ
BR43X1 -RTCAAFCRS L-----SC RKEQGKFDYH LL-RD-CISC ASICGQHPKQ
BR43X2 -----WS L-----SC RKEQGKFDYH LL-RD-CISC ASICGQHPKQ
BCMA  PLTCQRYCNA SVTNSVKGTN AILWTCLGLS LIISLAVFVL MFLLRKISSE
          <----- 2nd cys repeat -----

```

```

TacI  CAYFCENKLR SPVNLPEELR RQRSGEVENN SDNSGRYQGL EHRGSEASPA
BR43X1 CAYFCENKLR SPVNLPEELR RQRSGEVENN SDNSGRYQGL EHRGSEASPA
BR43X2 CAYFCENKLR SPVNLPEELR RQRSGEVENN SDNSGRYQGL EHRGSEASPA
BCMA  PLKDEFKNTG SGLLGMANID LEKSRTGDEI ILPRGLETV EECTCEDCIK
          ----->

```

```

TacI  LPGLKLSADQ VALVYSTLGL CLCAVLCCFL VAVACFLKKR GDPCSCQPRS
BR43X1 LPGLKLSADQ VALVYSTLGL CLCAVLCCFL VAVACFLKKR GDPCSCQPRS
BR43X2 LPGLKLSADQ VALVYSTLGL CLCAVLCCFL VAVACFLKKR GDPCSCQPRS
BCMA  SKPKVSDHC FPLPAMEEGA TILVTTKTND YCKSLPAALS ATEIEKSISA
          <--- TACI/BR43 TM ----->

```

```

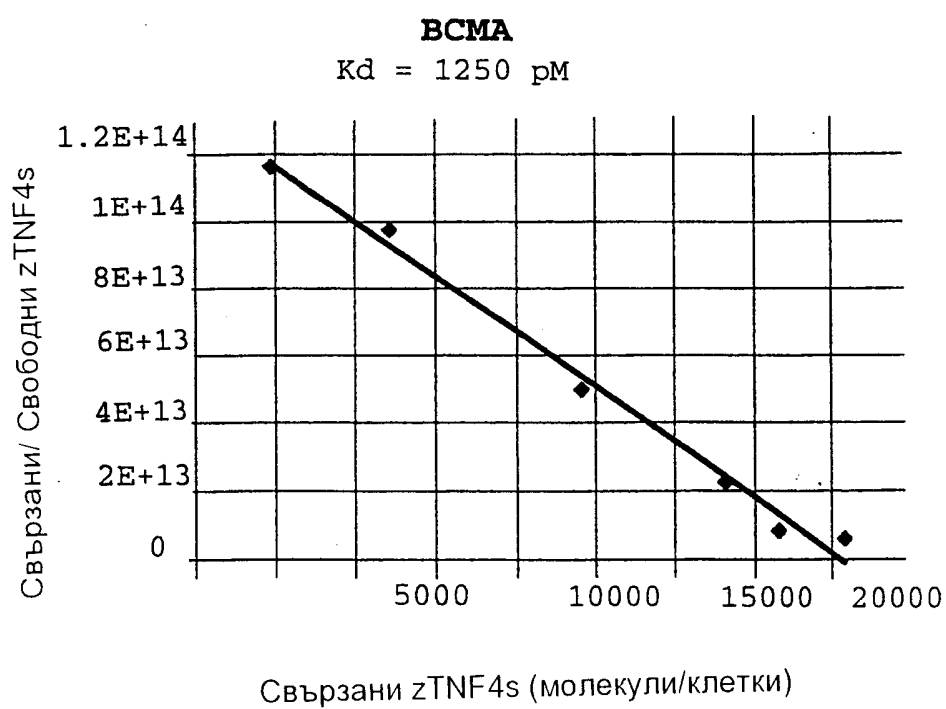
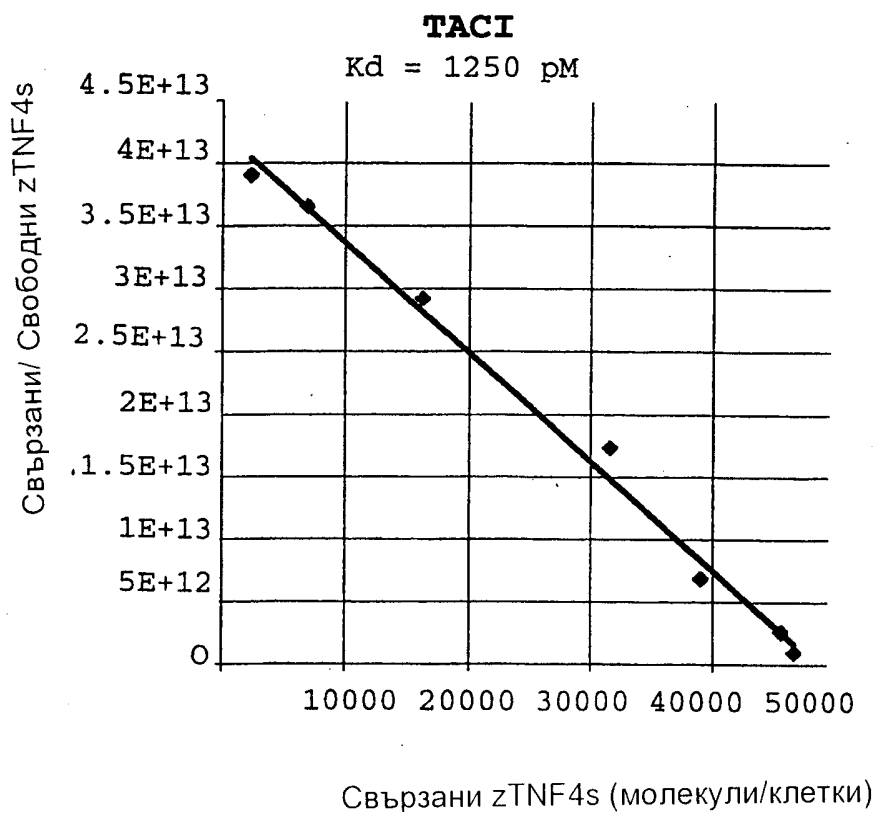
TacI  RPRQSPAKSS QDHAMEAGSP VSTSPEPVET CSFCFPECRA PTQESAVTPG
BR43X1 RPRQSPAKSS QDHAMEAGSP VSTSPEPVET CSFCFPECRA PTQESAVTPG
BR43X2 RPRQSPAKSS QDHAMEAGSP VSTSPEPVET CSFCFPECRA PTQESAVTPG
BCMA  R-----

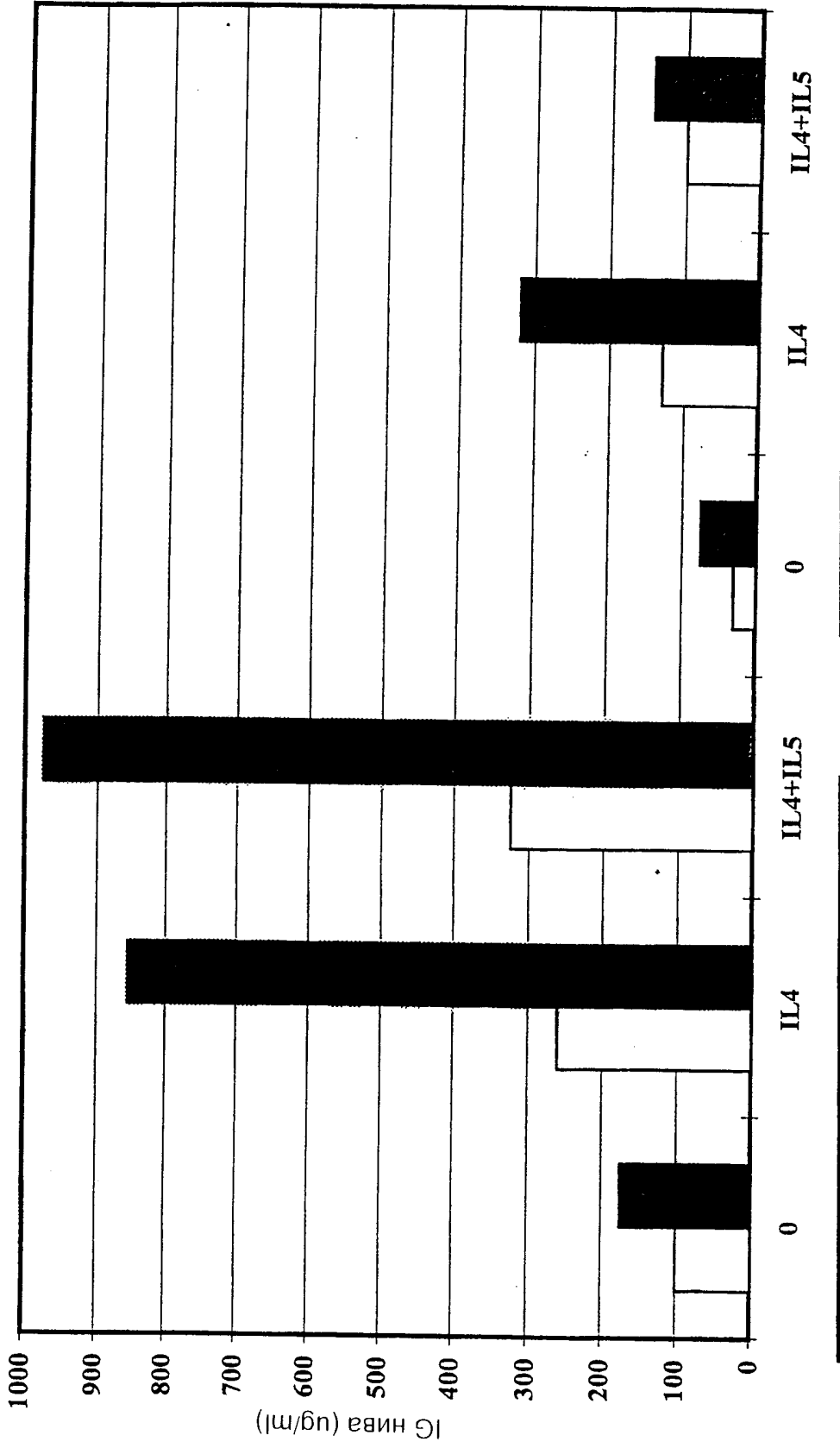
```

```

TacI  TPDPTCAGRW GCHTRTTVLQ PCPHIPDSGL GIVCVPAQEG GPQA-----
BR43X1 TPDPTCAGRW GCHTRTTVLQ PCPHIPDSGL GIVCVPAQEG GPQA-----
BR43X2 TPDPTCAGRW GCHTRTTVLQ PCPHIPDSGL GIVCVPAQEG GPQA-----
BCMA  -----

```

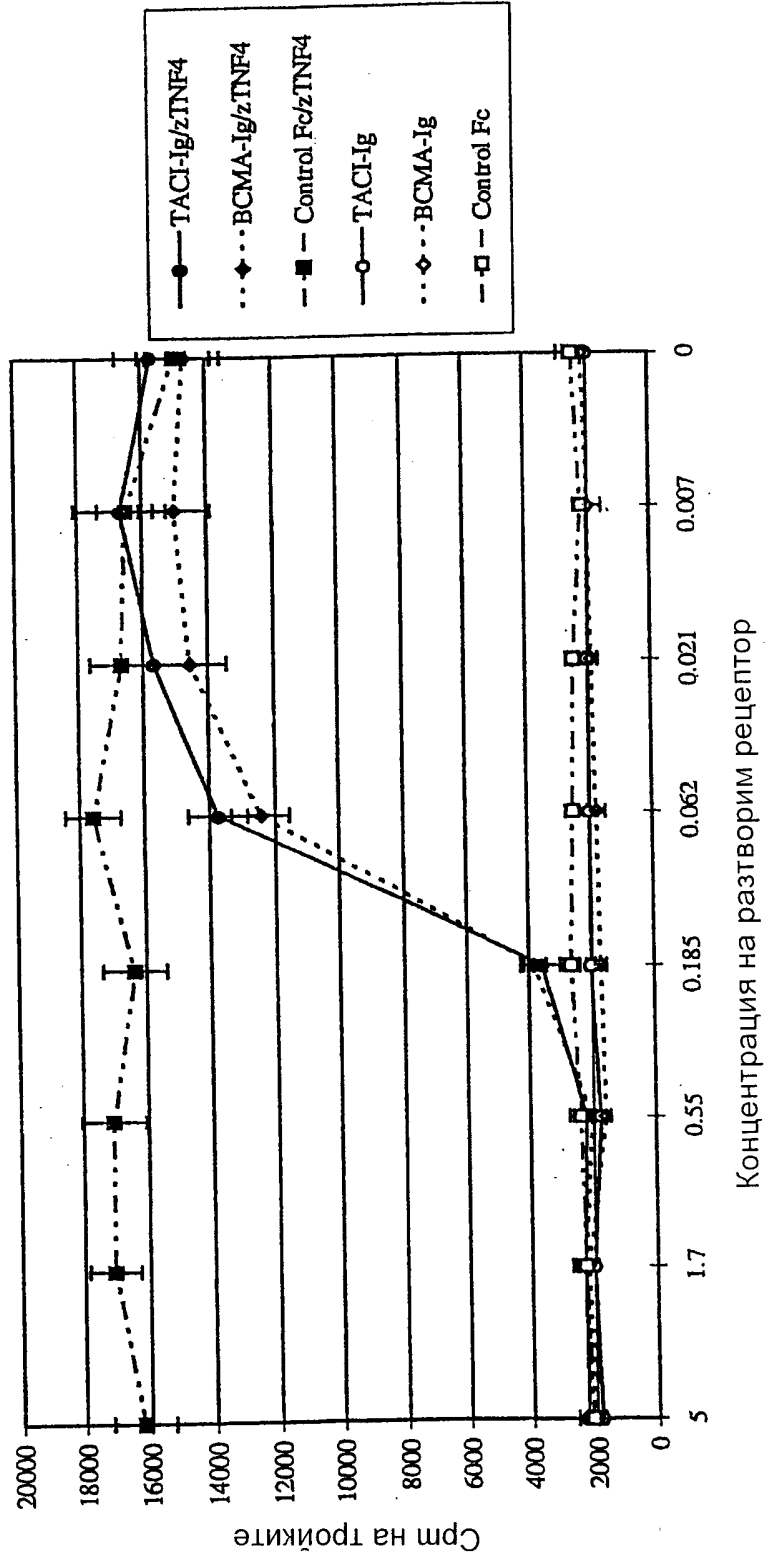




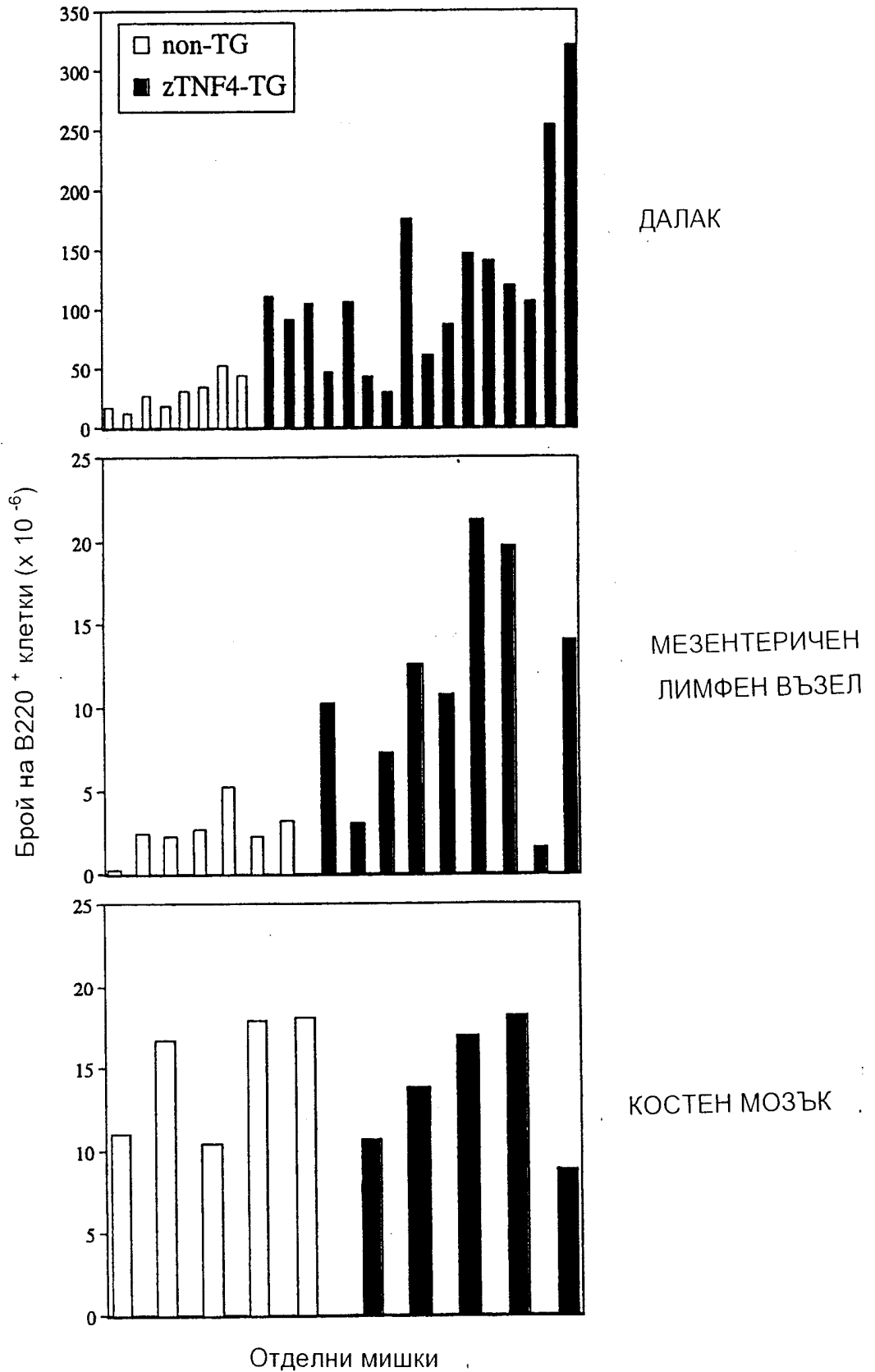
IgG

ФИГУРА 3 В

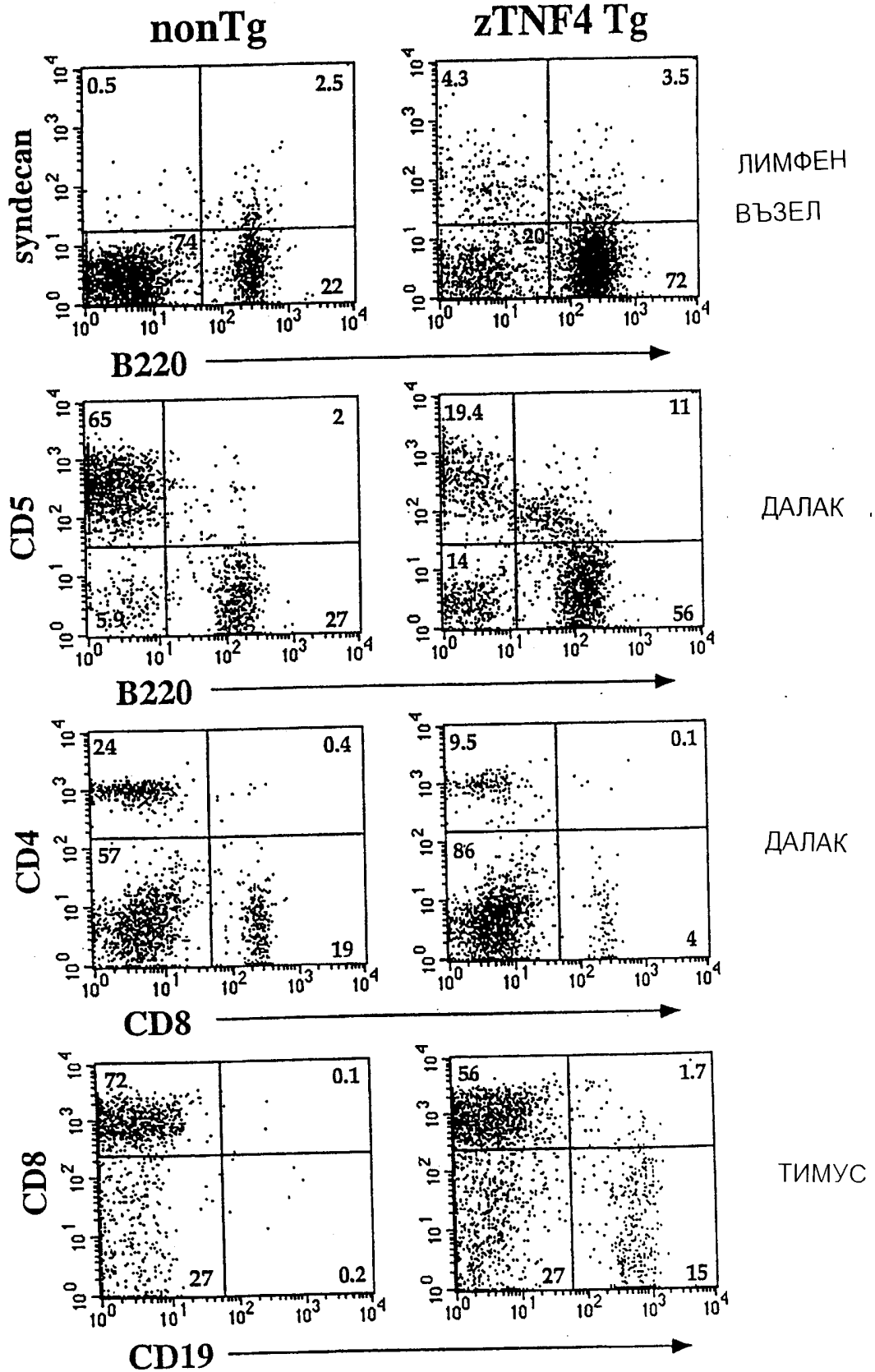
IgM



ФИГУРА 4

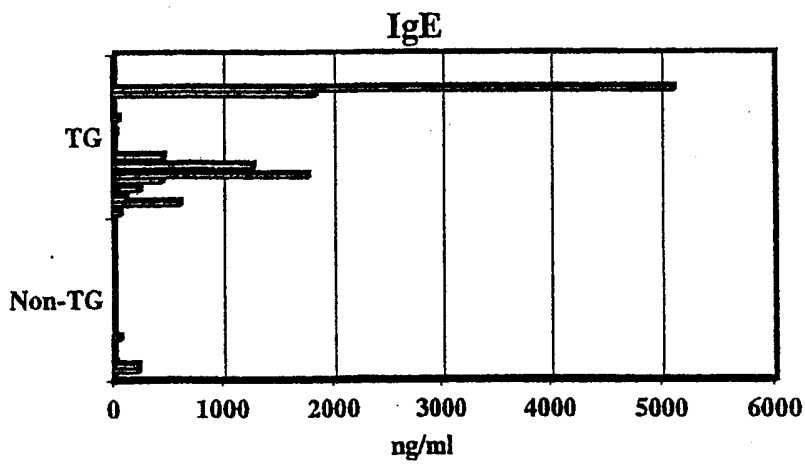
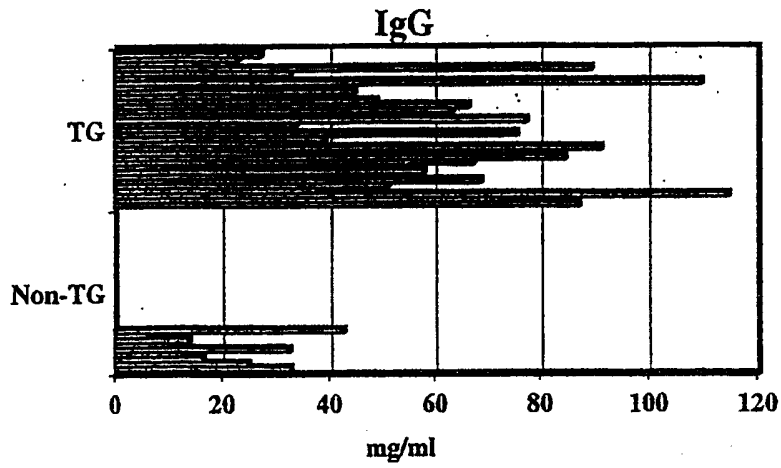
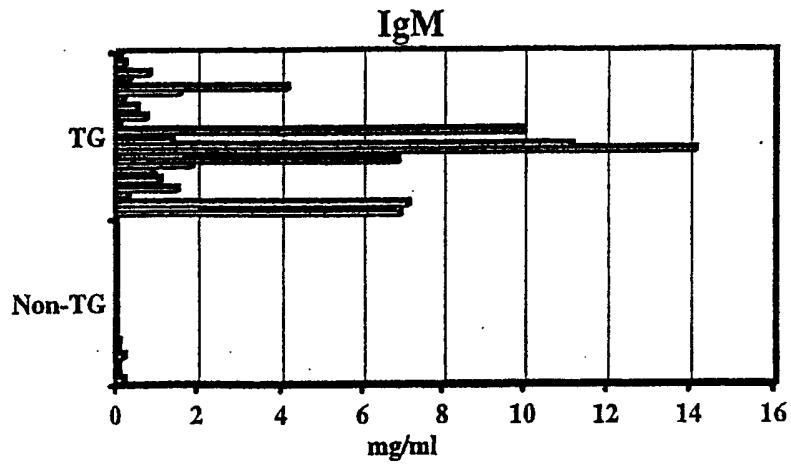


ФИГУРА 5 А

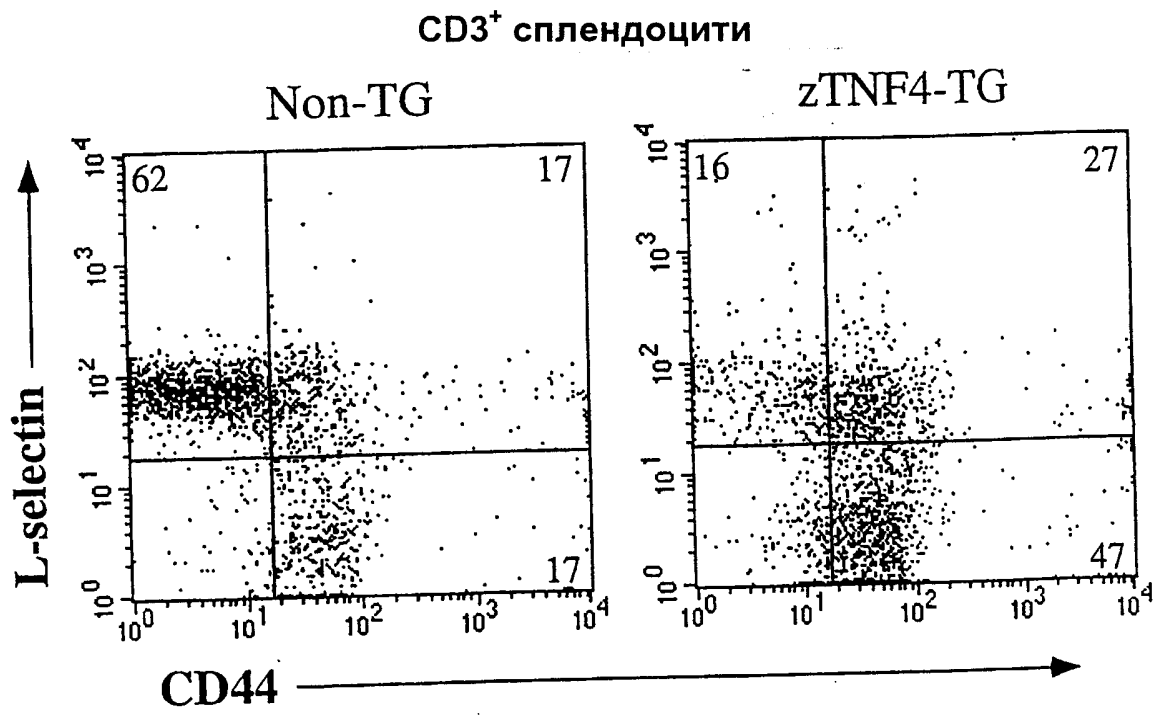


ФИГУРА 5 В

8/13

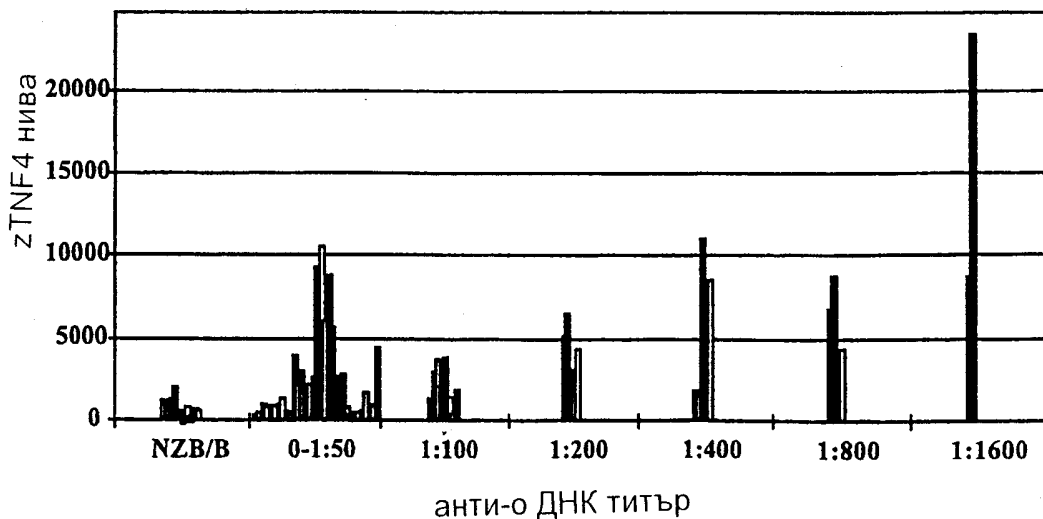
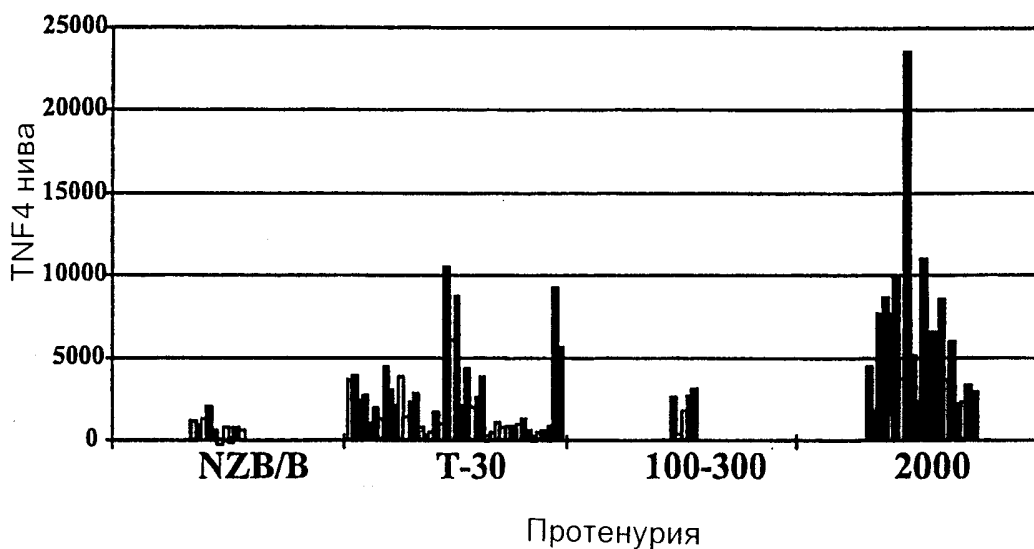
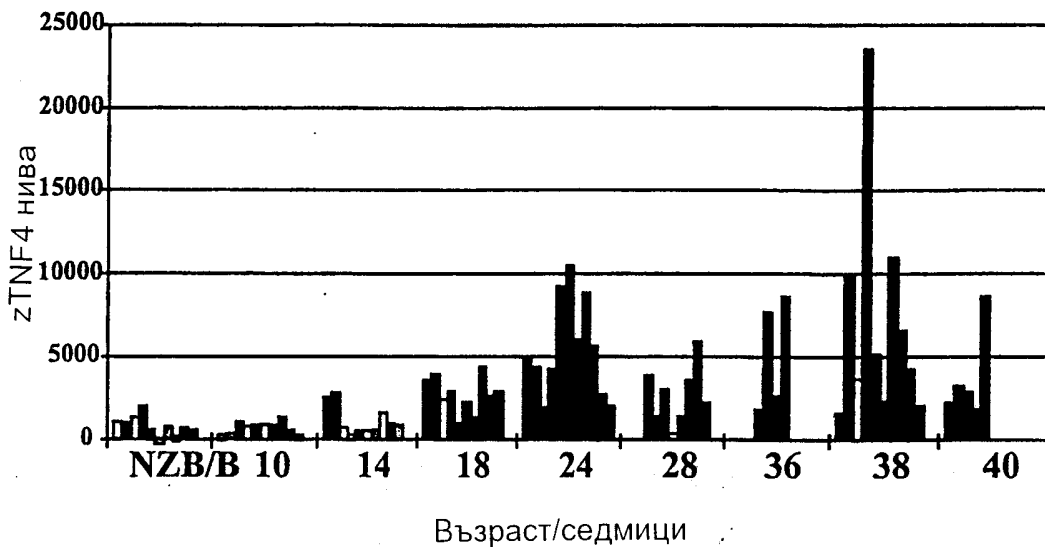


ФИГУРА 5 С



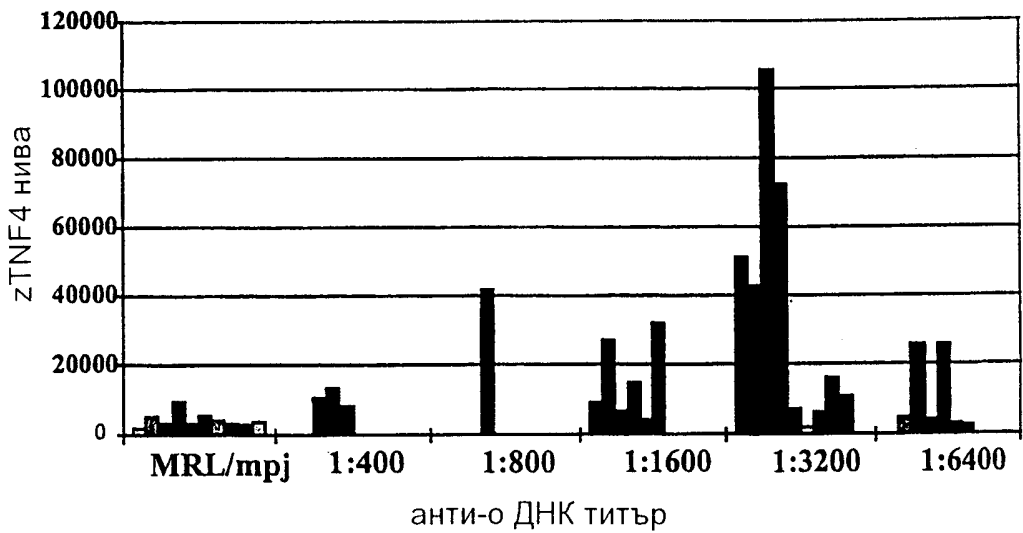
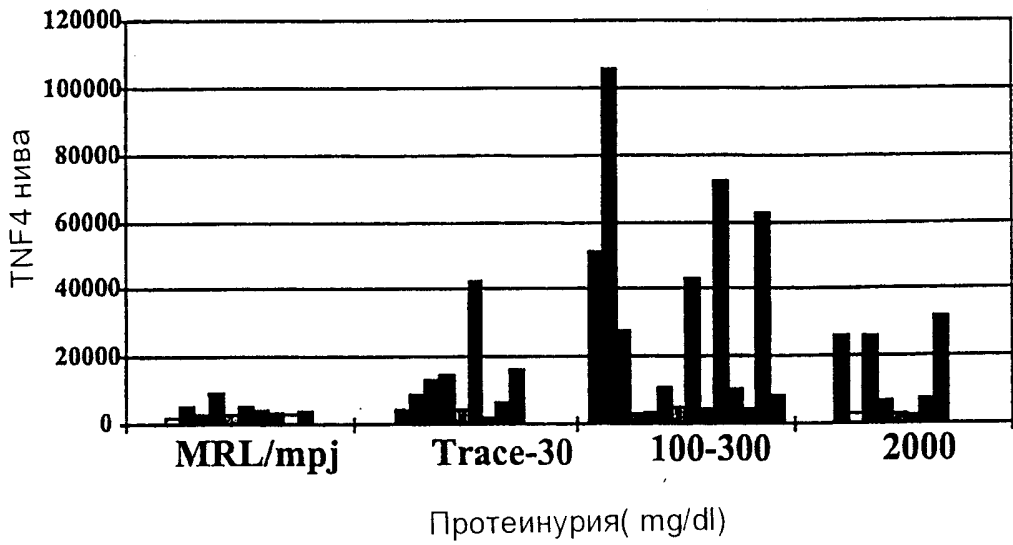
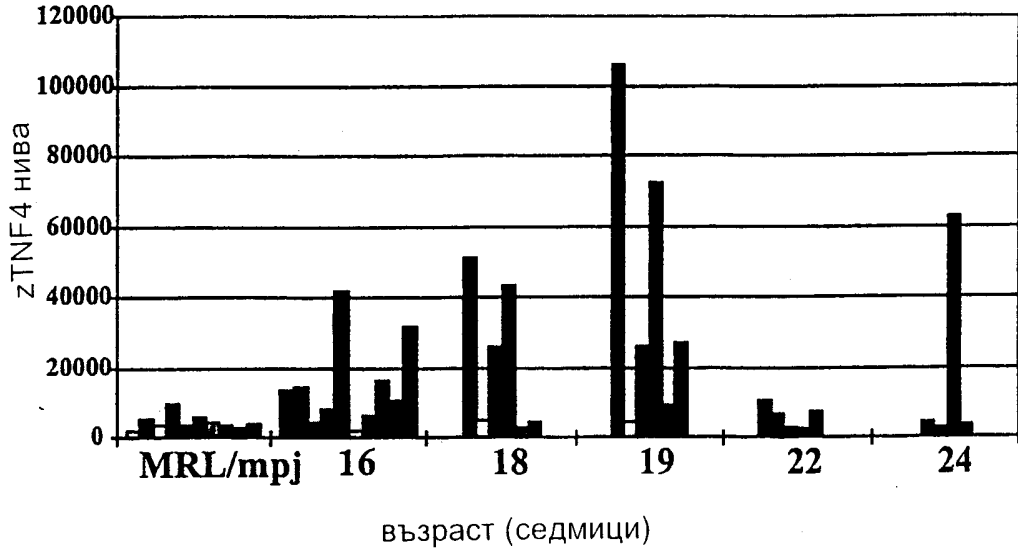
ФИГУРА 5 Е

NZBWF1



ФИГУРА 6 А

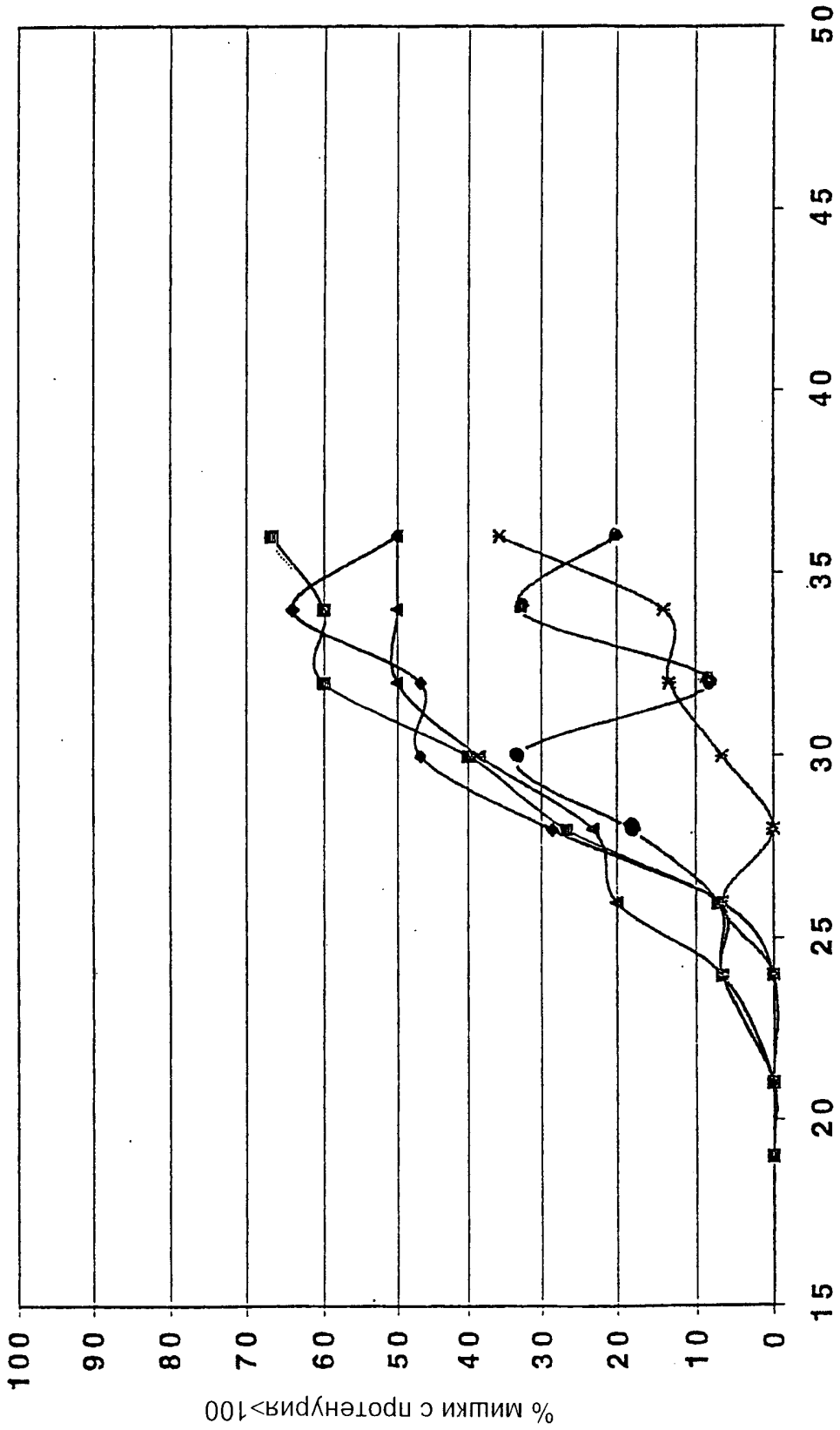
MRL-lpr/lpr



ФИГУРА 6 В

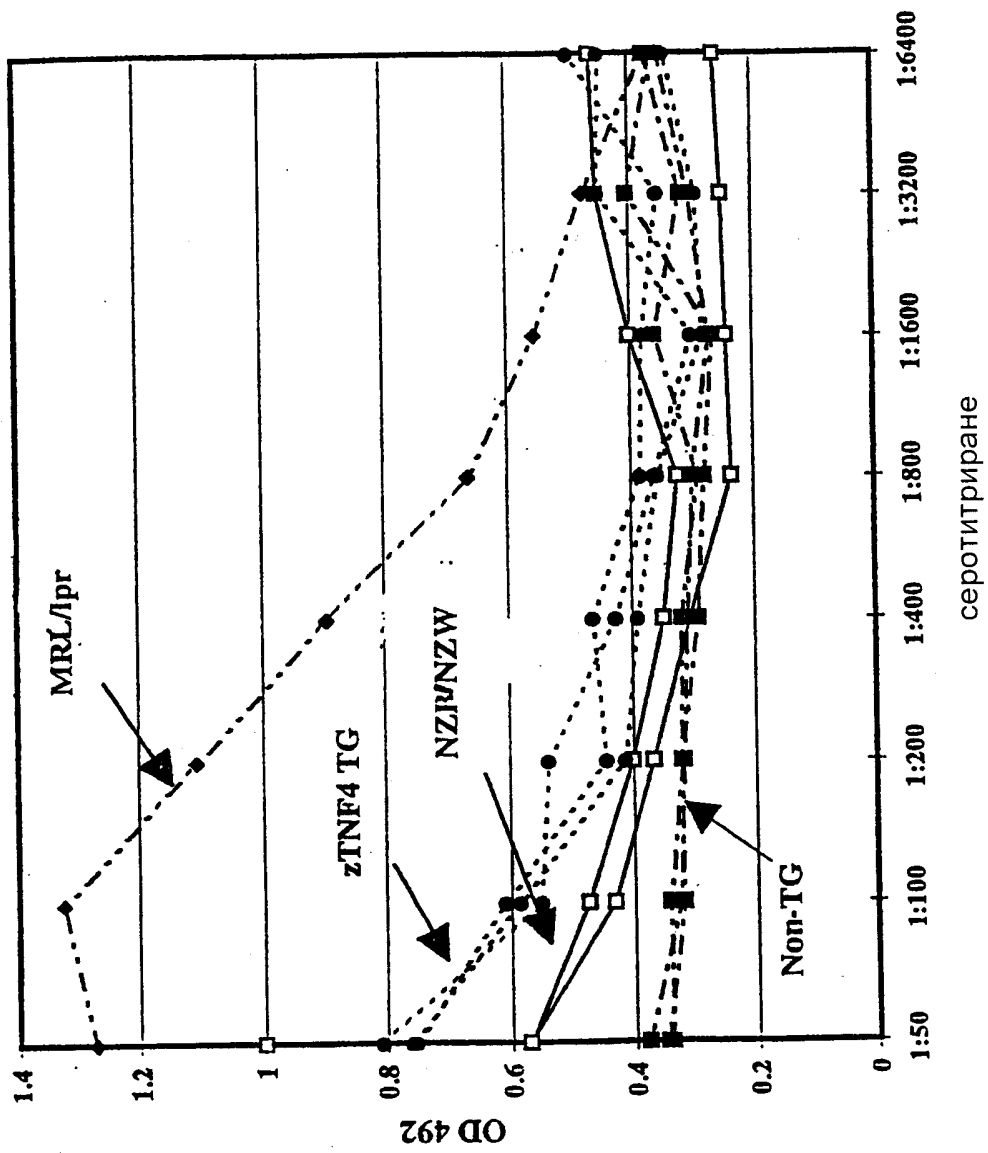
12/13

- ◆— A
- B
- ▲— C
- *— D
- E



възраст (седмици)

ФИГУРА 7



серотитриране
ФИГУРА 8

SEQUENCE LISTING

<110> ZymoGenetics, Inc.

<120> РАЗТВОРИМ РЕЦЕПТОР BR43X2 И МЕТОД ЗА ИЗПОЛЗВАНЕ

<130> 98-75

<150> 09/226,533

<151> 1999-01-07

<160> 60

<170> FastSEQ за Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 1192

<212> DNA

<213> ЧОВЕК

<220>

<221> CDS

<222> (6)...(746)

<400> 1

gagta atg agt ggc ctg ggc cgg agc agg cga ggt ggc cgg agc cgt gtg	50
Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg Ser Arg Val	
1 5 10 15	
gac cag gag gag cgc tgg tca ctc agc tgc cgc aag gag caa ggc aag	98
Asp Gln Glu Glu Arg Trp Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys	
20 25 30	
ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc atc agc tgt gcc tcc atc tgt	146
Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys	
35 40 45	
gga cag cac cct aag caa tgt gca tac ttc tgt gag aac aag ctc agg	194
Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg	
50 55 60	
agc cca gtg aac ctt cca cca gag ctc agg aga cag cgg agt gga gaa	242
Ser Pro Val Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg Ser Gly Glu	
65 70 75	

ggt gaa aac aat tca gac aac tcg gga agg tac caa gga ttg gag cac	290
Val Glu Asn Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Glu His	
80 85 90 95	
aga ggc tca gaa gca agt cca gct ctc ccg ggg ctg aag ctg agt gca	338
Arg Gly Ser Glu Ala Ser Pro Ala Leu Pro Gly Leu Lys Leu Ser Ala	
100 105 110	
gat cag gtg gcc ctg gtc tac agc acg ctg ggg ctc tgc ctg tgt gcc	386
Asp Gln Val Ala Leu Val Tyr Ser Thr Leu Gly Leu Cys Leu Cys Ala	
115 120 125	
gtc ctc tgc tgc ttc ctg gtg gcg gtg gcc tgc ttc ctc aag aag agg	434
Val Leu Cys Cys Phe Leu Val Ala Val Ala Cys Phe Leu Lys Lys Arg	
130 135 140	
ggg gat ccc tgc tcc tgc cag ccc cgc tca agg ccc cgt caa agt ccg	482
Gly Asp Pro Cys Ser Cys Gln Pro Arg Ser Arg Pro Arg Gln Ser Pro	
145 150 155	
gcc aag tct tcc cag gat cac gcg atg gaa gcc ggc agc cct gtg agc	530
Ala Lys Ser Ser Gln Asp His Ala Met Glu Ala Gly Ser Pro Val Ser	
160 165 170 175	
aca tcc ccc gag cca gtg gag acc tgc agc ttc tgc ttc cct gag tgc	578
Thr Ser Pro Glu Pro Val Glu Thr Cys Ser Phe Cys Phe Pro Glu Cys	
180 185 190	
agg gcg ccc acg cag gag agc gca gtc acg cct ggg acc ccc gac ccc	626
Arg Ala Pro Thr Gln Glu Ser Ala Val Thr Pro Gly Thr Pro Asp Pro	
195 200 205	
act tgt gct gga agg tgg ggg tgc cac acc agg acc aca gtc ctg cag	674
Thr Cys Ala Gly Arg Trp Gly Cys His Thr Arg Thr Thr Val Leu Gln	
210 215 220	
cct tgc cca cac atc cca gac agt ggc ctt ggc att gtg tgt gtg cct	722
Pro Cys Pro His Ile Pro Asp Ser Gly Leu Gly Ile Val Cys Val Pro	
225 230 235	
gcc cag gag ggg ggc cca ggt gca taaatggggg tcaggaggagg aaaggaggag	776
Ala Gln Glu Gly Gly Pro Gly Ala	
240 245	

ggagagagat ggagaggagg ggagagagaa agagaggtgg ggagagggga gagagatatg 836
 aggagagaga gacagaggag gcagagaggg agagaaacag aggagacaga gagggagaga 896
 gagacagagg gagagagaga cagaggggaa gagaggcaga gagggaaaga ggcagagaag 956
 gaaagaggca gagagggaga gaggcagaga gggagagagg cagagagaca gagagggaga 1016
 gagggacaga gagagataga gcaggaggtc ggggactct gagtcccagt tcccagtgca 1076
 gctgtaggtc gtcacacct aaccacacgt gcaataaagt cctcgtgcct gctgctcaca 1136
 gccccgaga gccctctc ctggagaata aaaccttgg cagctgcct tcctca 1192

<210> 2

<211> 247

<212> PRT

<213> ЧОВЕК

<400> 2

Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg Ser Arg Val Asp
 1 5 10 15
 Gln Glu Glu Arg Trp Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe
 20 25 30
 Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly
 35 40 45
 Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser
 50 55 60
 Pro Val Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg Ser Gly Glu Val
 65 70 75 80
 Glu Asn Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Glu His Arg
 85 90 95
 Gly Ser Glu Ala Ser Pro Ala Leu Pro Gly Leu Lys Leu Ser Ala Asp
 100 105 110
 Gln Val Ala Leu Val Tyr Ser Thr Leu Gly Leu Cys Leu Cys Ala Val
 115 120 125
 Leu Cys Cys Phe Leu Val Ala Val Ala Cys Phe Leu Lys Lys Arg Gly
 130 135 140
 Asp Pro Cys Ser Cys Gln Pro Arg Ser Arg Pro Arg Gln Ser Pro Ala
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Gln Asp His Ala Met Glu Ala Gly Ser Pro Val Ser Thr
 165 170 175
 Ser Pro Glu Pro Val Glu Thr Cys Ser Phe Cys Phe Pro Glu Cys Arg
 180 185 190
 Ala Pro Thr Gln Glu Ser Ala Val Thr Pro Gly Thr Pro Asp Pro Thr
 195 200 205
 Cys Ala Gly Arg Trp Gly Cys His Thr Arg Thr Thr Val Leu Gln Pro
 210 215 220
 Cys Pro His Ile Pro Asp Ser Gly Leu Gly Ile Val Cys Val Pro Ala
 225 230 235 240
 Gln Glu Gly Gly Pro Gly Ala

245

<210> 3
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> ЧОВЕК

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(360)

<400> 3

atg agt ggc ctg ggc cgg agc agg cga ggt ggc cgg agc cgt gtg gac 48
 Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg Ser Arg Val Asp
 1 5 10 15

cag gag gag cgc tgg tca ctc agc tgc cgc aag gag caa ggc aag ttc 96
 Gln Glu Glu Arg Trp Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe
 20 25 30

tat gac cat ctc ctg agg gac tgc atc agc tgt gcc tcc atc tgt gga 144
 Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly
 35 40 45

cag cac cct aag caa tgt gca tac ttc tgt gag aac aag ctc agg agc 192
 Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser
 50 55 60

cca gtg aac ctt cca cca gag ctc agg aga cag cgg agt gga gaa gtt 240
 Pro Val Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg Ser Gly Glu Val
 65 70 75 80

gaa aac aat tca gac aac tcg gga agg tac caa gga ttg gag cac aga 288
 Glu Asn Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Glu His Arg
 85 90 95

ggc tca gaa gca agt cca gct ctc ccg ggg ctg aag ctg agt gca gat 336
 Gly Ser Glu Ala Ser Pro Ala Leu Pro Gly Leu Lys Leu Ser Ala Asp
 100 105 110

cag gtg gcc ctg gtc tac agc acg 360
 Gln Val Ala Leu Val Tyr Ser Thr
 115 120

<210> 4
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> человек

<400> 4

Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg Ser Arg Val Asp
 1 5 10 15
 Gln Glu Glu Arg Trp Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe
 20 25 30
 Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly
 35 40 45
 Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser
 50 55 60
 Pro Val Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg Ser Gly Glu Val
 65 70 75 80
 Glu Asn Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Glu His Arg
 85 90 95
 Gly Ser Glu Ala Ser Pro Ala Leu Pro Gly Leu Lys Leu Ser Ala Asp
 100 105 110
 Gln Val Ala Leu Val Tyr Ser Thr
 115 120

<210> 5
 <211> 1377
 <212> DNA
 <213> человек

<220>
 <221> CDS
 <222> (14)...(895)

<400> 5

agcatcctga gta atg agt ggc ctg ggc cgg agc agg cga ggt ggc cgg 49
 Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg
 1 5 10
 agc cgt gtg gac cag gag gag cgc ttt cca cag ggc ctg tgg acg ggg 97
 Ser Arg Val Asp Gln Glu Glu Arg Phe Pro Gln Gly Leu Trp Thr Gly
 15 20 25
 gtg gct atg aga tcc tgc ccc gaa gag cag tac tgg gat cct ctg ctg 145
 Val Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro Leu Leu
 30 35 40

ggt acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc aac cat cag agc cag cgc	193
Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser Gln Arg	
45 50 55 60	
acc tgt gca gcc ttc tgc agg tca ctc agc tgc cgc aag gag caa ggc	241
Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly	
65 70 75	
aag ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc atc agc tgt gcc tcc atc	289
Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile	
80 85 90	
tgt gga cag cac cct aag caa tgt gca tac ttc tgt gag aac aag ctc	337
Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu	
95 100 105	
agg agc cca gtg aac ctt cca cca gag ctc agg aga cag cgg agt gga	385
Arg Ser Pro Val Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg Ser Gly	
110 115 120	
gaa gtt gaa aac aat tca gac aac tcg gga agg tac caa gga ttg gag	433
Glu Val Glu Asn Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Glu	
125 130 135 140	
cac aga ggc tca gaa gca agt cca gct ctc ccg ggg ctg aag ctg agt	481
His Arg Gly Ser Glu Ala Ser Pro Ala Leu Pro Gly Leu Lys Leu Ser	
145 150 155	
gca gat cag gtg gcc ctg gtc tac agc acg ctg ggg ctc tgc ctg tgt	529
Ala Asp Gln Val Ala Leu Val Tyr Ser Thr Leu Gly Leu Cys Leu Cys	
160 165 170	
gcc gtc ctc tgc tgc ttc ctg gtg gcg gtg gcc tgc ttc ctc aag aag	577
Ala Val Leu Cys Cys Phe Leu Val Ala Val Ala Cys Phe Leu Lys Lys	
175 180 185	
agg ggg gat ccc tgc tcc tgc cag ccc cgc tca agg ccc cgt caa agt	625
Arg Gly Asp Pro Cys Ser Cys Gln Pro Arg Ser Arg Pro Arg Gln Ser	
190 195 200	
ccg gcc aag tct tcc cag gat cac gcg atg gaa gcc ggc agc cct gtg	673
Pro Ala Lys Ser Ser Gln Asp His Ala Met Glu Ala Gly Ser Pro Val	
205 210 215 220	

agc aca tcc ccc gag cca gtg gag acc tgc agc ttc tgc ttc cct gag 721
 Ser Thr Ser Pro Glu Pro Val Glu Thr Cys Ser Phe Cys Phe Pro Glu
 225 230 235

tgc agg gcg ccc acg cag gag agc gca gtc acg cct ggg acc ccc gac 769
 Cys Arg Ala Pro Thr Gln Glu Ser Ala Val Thr Pro Gly Thr Pro Asp
 240 245 250

ccc act tgt gct gga agg tgg ggg tgc cac acc agg acc aca gtc ctg 817
 Pro Thr Cys Ala Gly Arg Trp Gly Cys His Thr Arg Thr Thr Val Leu
 255 260 265

cag cct tgc cca cac atc cca gac agt ggc ctt ggc att gtg tgt gtg 865
 Gln Pro Cys Pro His Ile Pro Asp Ser Gly Leu Gly Ile Val Cys Val
 270 275 280

cct gcc cag gag ggg ggc cca ggt gca taa atgggggtca gggagggaaa 915
 Pro Ala Gln Glu Gly Pro Gly Ala *
 285 290

ggaggagga gagagatgga gaggagggga gagagaaaga gaggtggga gagggagag 975
 agatatgagg agagagagac agaggaggca gaaagggaga gaaacagagg agacagagag 1035
 ggagagagag acagagggag agagagacag aggggaagag aggcagagag gaaagagggc 1095
 agagaaggaa agagacaggc agagaaggag agaggcagag agggagagag gcagagaggg 1155
 agagaggcag agagacagag agggagagag ggacagagag agatagagca ggaggtcggg 1215
 gcactctgag tcccagttcc cagtgcagct gtaggtcgtc atcacctaac cacacgtgca 1275
 ataaagtct cgtgctgct gctcacagcc cccgagagcc cctcctctg gagaataaaa 1335
 ctttgagcag ctgcccttcc tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 1377

<210> 6
 <211> 293
 <212> PRT
 <213> ЧОВЕК

<400> 6

Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg Ser Arg Val Asp
 1 5 10 15
 Gln Glu Glu Arg Phe Pro Gln Gly Leu Trp Thr Gly Val Ala Met Arg
 20 25 30
 Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met
 35 40 45
 Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala
 50 55 60
 Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp
 65 70 75 80

cag tgc tcc caa aat gaa tat ttt gac agt ttg ttg cat gct tgc ata Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser Leu Leu His Ala Cys Ile	284
10 15 20	
cct tgt caa ctt cga tgt tct tct aat act cct cct cta aca tgt cag Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr Pro Pro Leu Thr Cys Gln	332
25 30 35	
cgt tat tgt aat gca agt gtg acc aat tca gtg aaa gga acg aat gcg Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser Val Lys Gly Thr Asn Ala	380
40 45 50	
att ctc tgg acc tgt ttg gga ctg agc tta ata att tct ttg gca gtt Ile Leu Trp Thr Cys Leu Gly Leu Ser Leu Ile Ile Ser Leu Ala Val	428
55 60 65 70	
ttc gtg cta atg ttt ttg cta agg aag ata agc tct gaa cca tta aag Phe Val Leu Met Phe Leu Leu Arg Lys Ile Ser Ser Glu Pro Leu Lys	476
75 80 85	
gac gag ttt aaa aac aca gga tca ggt ctc ctg ggc atg gct aac att Asp Glu Phe Lys Asn Thr Gly Ser Gly Leu Leu Gly Met Ala Asn Ile	524
90 95 100	
gac ctg gaa aag agc agg act ggt gat gaa att att ctt ccg aga ggc Asp Leu Glu Lys Ser Arg Thr Gly Asp Glu Ile Ile Leu Pro Arg Gly	572
105 110 115	
ctc gag tac acg gtg gaa gaa tgc acc tgt gaa gac tgc atc aag agc Leu Glu Tyr Thr Val Glu Glu Cys Thr Cys Glu Asp Cys Ile Lys Ser	620
120 125 130	
aaa ccg aag gtc gac tct gac cat tgc ttt cca ctc cca gct atg gag Lys Pro Lys Val Asp Ser Asp His Cys Phe Pro Leu Pro Ala Met Glu	668
135 140 145 150	
gaa ggc gca acc att ctt gtc acc acg aaa acg aat gac tat tgc aag Glu Gly Ala Thr Ile Leu Val Thr Thr Lys Thr Asn Asp Tyr Cys Lys	716
155 160 165	
agc ctg cca gct gct ttg agt gct acg gag ata gag aaa tca att tct Ser Leu Pro Ala Ala Leu Ser Ala Thr Glu Ile Glu Lys Ser Ile Ser	764
170 175 180	

gct agg taa ttaaccattt cgactcgagc agtgccactt taaaaatctt
Ala Arg *

813

ttgtcagaat agatgatgtg tcagatctct ttaggatgac tgtatctttc agttgccgat
acagcttttt gtcctctaac tgtggaaact ctttatgtta gatatatttc tctaggttac
tgttgggagc ttaatggtag aaacttcctt ggtttcatga ttaaagtctt ttttttct
ga

873

933

993

995

<210> 8

<211> 184

<212> PRT

<213> человек

<400> 8

Met	Leu	Gln	Met	Ala	Gly	Gln	Cys	Ser	Gln	Asn	Glu	Tyr	Phe	Asp	Ser
1				5					10					15	
Leu	Leu	His	Ala	Cys	Ile	Pro	Cys	Gln	Leu	Arg	Cys	Ser	Ser	Asn	Thr
			20					25						30	
Pro	Pro	Leu	Thr	Cys	Gln	Arg	Tyr	Cys	Asn	Ala	Ser	Val	Thr	Asn	Ser
		35					40						45		
Val	Lys	Gly	Thr	Asn	Ala	Ile	Leu	Trp	Thr	Cys	Leu	Gly	Leu	Ser	Leu
	50					55					60				
Ile	Ile	Ser	Leu	Ala	Val	Phe	Val	Leu	Met	Phe	Leu	Leu	Arg	Lys	Ile
65					70					75					80
Ser	Ser	Glu	Pro	Leu	Lys	Asp	Glu	Phe	Lys	Asn	Thr	Gly	Ser	Gly	Leu
				85					90					95	
Leu	Gly	Met	Ala	Asn	Ile	Asp	Leu	Glu	Lys	Ser	Arg	Thr	Gly	Asp	Glu
			100					105						110	
Ile	Ile	Leu	Pro	Arg	Gly	Leu	Glu	Tyr	Thr	Val	Glu	Glu	Cys	Thr	Cys
		115					120						125		
Glu	Asp	Cys	Ile	Lys	Ser	Lys	Pro	Lys	Val	Asp	Ser	Asp	His	Cys	Phe
	130					135					140				
Pro	Leu	Pro	Ala	Met	Glu	Glu	Gly	Ala	Thr	Ile	Leu	Val	Thr	Thr	Lys
145					150					155					160
Thr	Asn	Asp	Tyr	Cys	Lys	Ser	Leu	Pro	Ala	Ala	Leu	Ser	Ala	Thr	Glu
				165					170					175	
Ile	Glu	Lys	Ser	Ile	Ser	Ala	Arg								
				180											

<210> 9

<211> 245

<212> PRT

<213> человек

<400> 9
 Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg Ser Arg Val Asp Gln Glu Glu Arg
 1 5 10 15
 Phe Pro Gln Gly Leu Trp Thr Gly Val Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu
 20 25 30
 Glu Gln Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr
 35 40 45
 Ile Cys Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser
 50 55 60
 Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg
 65 70 75 80
 Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys
 85 90 95
 Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Pro Val Asn Leu Pro Pro
 100 105 110
 Glu Leu Arg Arg Gln Arg Ser Gly Glu Val Glu Asn Asn Ser Asp Asn
 115 120 125
 Ser Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Glu His Arg Gly Ser Glu Ala Ser Pro
 130 135 140
 Ala Leu Pro Gly Leu Lys Leu Ser Ala Asp Gln Val Ala Leu Val Tyr
 145 150 155 160
 Ser Thr Leu Gly Leu Cys Leu Cys Ala Val Leu Cys Cys Phe Leu Val
 165 170 175
 Ala Val Ala Cys Phe Leu Lys Lys Arg Gly Asp Pro Cys Ser Cys Gln
 180 185 190
 Pro Arg Ser Arg Pro Arg Gln Ser Pro Ala Lys Ser Ser Gln Asp His
 195 200 205
 Ala Met Glu Ala Gly Ser Pro Val Ser Thr Ser Pro Glu Pro Val Glu
 210 215 220
 Thr Cys Ser Phe Cys Phe Pro Glu Cys Arg Ala Pro Thr Gln Glu Ser
 225 230 235 240
 Ala Val Thr Pro Gly
 245

<210> 10

<211> 40

<212> PRT

<213> Изкуствена последователност

<220>

<223> Основно описание на цистеинов псевдо-отговор домен

<221> ВАРИАНТ

<222> (1)...(2)

- <223> Всеки Хаа е независимо всеки аминокиселинен остатък с изключение на цистеин, или отсъства
- <221> ВАРИАНТ
<222> (4)... (4)
<223> Хаа е всеки аминокиселинен остатък освен цистеин
- <221> ВАРИАНТ
<222> (5)... (5)
<223> Хаа е слутамин, глутаминова киселина или лизин
- <221> ВАРИАНТ
<222> (6)... (6)
<223> Хаа е глутамин, глутамова киселина, лизин, аспарагин, аргинин, аспартова киселина, хистидин или серин.
- <221> ВАРИАНТ
<222> (7)... (7)
<223> Хаа е глутамин или глутамова киселина.
- <221> ВАРИАНТ
<222> (8)... (9)
<223> Всеки Хаа е независимо всеки аминокиселинен остатък с изключение на цистеин или отсъства
- <221> ВАРИАНТ
<222> (10)... (11)
<223> Хаа е тирозин, фенилаланин или триптофан
- <221> ВАРИАНТ
<222> (13)... (13)
<223> Хаа е всеки аминокиселинен остатък освен цистеин
- <221> ВАРИАНТ
<222> (16)... (17)
<223> Всеки Хаа е независимо всеки аминокиселинен остатък освен цистеин
- <221> ВАРИАНТ
<222> (19)... (19)
<223> Хаа е изолевцин, метионин, левцин или валин
- <221> ВАРИАНТ

<222> (20) ... (20)

<223> Хаа е всеки аминокиселинен остатък освен цистеин

<221> ВАРИАНТ

<222> (22) ... (24)

<223> Хаа е независимо кой аминокиселинен остатък с изключение на цистеин

<221> ВАРИАНТ

<222> (26) ... (31)

<223> Всеки Хаа е независимо кой аминокиселинен остатък с изключение на цистеин

<221> ВАРИАНТ

<222> (32) ... (33)

<223> Всеки Хаа е независимо кой аминокиселинен остатък с изключение на цистеин или отсъства

<221> ВАРИАНТ

<222> (35) ... (36)

<223> Всеки Хаа е независимо кой аминокиселинен остатък с изключение на цистеин

<221> ВАРИАНТ

<222> (37) ... (37)

<223> Хаа е тирозин или фенилаланин

<221> ВАРИАНТ

<222> (39) ... (40)

<223> Всеки Хаа е независимо всеки аминокиселинен остатък с изключение на цистеин или отсъства

<400> 10

Хаа Хаа Cys Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Asp Хаа Leu Leu Хаа
1 5 10 15

Хаа Cys Хаа Хаа Cys Хаа Хаа Хаа Cys Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа
20 25 30

Хаа Cys Хаа Хаа Хаа Cys Хаа Хаа
35 40

<210> 11

<211> 360

<212> DNA

<213> Изкуствена последователност

<220>

<223> Дегенеративна олигонуклеотидна последователност,
кодираща полипептид на SEQ ID NO:4

<221> Вариант

<222> (1)...(360)

<223> Всеки N е независимо A, T, G, или C.

<400> 11

atgwsnggny tnggmgnws nmgnmgnggn ggnmgnwsnm gngtngayca rgargarmgn	60
tggwsnytnw sntgymgnaa rgarcarggn aarttytayg aycaytnyt nmngaytgy	120
athwsntgyg cnwsnathtg yggncarcay ccnaarcart gygcntaytt ytgygaraay	180
aarytnmgnw snccngtnaa yytncncn garytnmgnm gncarmgnws ngngargtn	240
garaayaayw sngayaayws nggnmgtay carggnytn gncaymgng nwsngargcn	300
wsnccngcny tncnggnyt naarytnwsn gcngaycarg tngcnytngt ntaywsnacn	360

<210> 12

<211> 741

<212> DNA

<213> Изкуствена последователност

<220>

<223> Дегенеративна олигонуклеотидна последователност,
кодираща полипептид на SEQ ID NO:2

<221> Вариант

<222> (1)...(741)

<223> Всеки N е независимо A, T, G, или C.

<400> 12

atgwsnggny tnggmgnws nmgnmgnggn ggnmgnwsnm gngtngayca rgargarmgn	60
tggwsnytnw sntgymgnaa rgarcarggn aarttytayg aycaytnyt nmngaytgy	120
athwsntgyg cnwsnathtg yggncarcay ccnaarcart gygcntaytt ytgygaraay	180
aarytnmgnw snccngtnaa yytncncn garytnmgnm gncarmgnws ngngargtn	240
garaayaayw sngayaayws nggnmgtay carggnytn gncaymgng nwsngargcn	300
wsnccngcny tncnggnyt naarytnwsn gcngaycarg tngcnytngt ntaywsnacn	360
ytnggnytnt gyytntgygc ngtnytntgy tgyttytng tngcngtngc ntgyttyytn	420
aaraarmgng gngayccntg ywsntgycar ccnmgnwsnm gncnmgnc rwsnccngcn	480
aarwsnwsnc argaycaygc natggargcn ggnwsnccng tnwsnacnws nccngarccn	540
gtngaracnt gywsnttytg yttyccngar tgygmngcnc cnacncarga rwsngcngtn	600
acnccnggna cncngaycc nactgygc ggnmgtggg gntgycayac nmgnacnacn	660
gtnytncarc cntgyccnca yathccngay wsnggnytn gnathtngt ygtncngcn	720
cargarggng gncngngc n	741

<210> 13

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Изкуствена последователност

<220>
 <223> FLAG tag

<400> 13
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

<210> 14
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Изкуствена последователност

<220>
 <223> Glu-Glu tag

<400> 14
 Glu Glu Tyr Met Pro Met Glu
 1 5

<210> 15
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Изкуствена последователност

<220>
 <223> Олигонуклеотид ZC19980

<400> 15
 cgaagagcag tactgggatc ctct

24

<210> 16
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Изкуствена последователност

<220>
 <223> Олигонуклеотид ZC19981

<400> 16
 gcccaaggcca ctgtctggga tgt

23

<210> 17
 <211> 1149
 <212> DNA
 <213> Човек

<220>
 <221> CDS
 <222> (236)...(1027)

<400> 17
 gaattcggca cgaggcagaa aggagaaaat tcaggataac tctcctgagg ggtgagccaa 60
 gccctgccat gtagtgcacg caggacatca acaaacacag ataacaggaa atgatccatt 120
 ccctgtggtc acttattcta aaggcccaa ccttcaaagt tcaagtagtg atatggatga 180
 ctccacagaa agggagcagt cacgccttac ttcttgctt aagaaaagag aagaa atg 238
 Met
 1

aaa ctg aag gag tgt gtt tcc atc ctc cca cgg aag gaa agc ccc tct 286
 Lys Leu Lys Glu Cys Val Ser Ile Leu Pro Arg Lys Glu Ser Pro Ser
 5 10 15

gtc cga tcc tcc aaa gac gga aag ctg ctg gct gca acc ttg ctg ctg 334
 Val Arg Ser Ser Lys Asp Gly Lys Leu Leu Ala Ala Thr Leu Leu Leu
 20 25 30

gca ctg ctg tct tgc tgc ctc acg gtg gtg tct ttc tac cag gtg gcc 382
 Ala Leu Leu Ser Cys Cys Leu Thr Val Val Ser Phe Tyr Gln Val Ala
 35 40 45

gcc ctg caa ggg gac ctg gcc agc ctc cgg gca gag ctg cag ggc cac 430
 Ala Leu Gln Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg Ala Glu Leu Gln Gly His
 50 55 60 65

cac gcg gag aag ctg cca gca gga gca gga gcc ccc aag gcc ggc ctg 478
 His Ala Glu Lys Leu Pro Ala Gly Ala Gly Ala Pro Lys Ala Gly Leu
 70 75 80

gag gaa gct cca gct gtc acc gcg gga ctg aaa atc ttt gaa cca cca 526
 Glu Glu Ala Pro Ala Val Thr Ala Gly Leu Lys Ile Phe Glu Pro Pro
 85 90 95

gct cca gga gaa ggc aac tcc agt cag aac agc aga aat aag cgt gcc 574
 Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asn Ser Arg Asn Lys Arg Ala
 100 105 110

ggt cag ggt cca gaa gaa aca gtc act caa gac tgc ttg caa ctg att	622
Val Gln Gly Pro Glu Glu Thr Val Thr Gln Asp Cys Leu Gln Leu Ile	
115 120 125	
gca gac agt gaa aca cca act ata caa aaa gga tct tac aca ttt gtt	670
Ala Asp Ser Glu Thr Pro Thr Ile Gln Lys Gly Ser Tyr Thr Phe Val	
130 135 140 145	
cca tgg ctt ctc agc ttt aaa agg gga agt gcc cta gaa gaa aaa gag	718
Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser Ala Leu Glu Glu Lys Glu	
150 155 160	
aat aaa ata ttg gtc aaa gaa act ggt tac ttt ttt ata tat ggt cag	766
Asn Lys Ile Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr Phe Phe Ile Tyr Gly Gln	
165 170 175	
ggt tta tat act gat aag acc tac gcc atg gga cat cta att cag agg	814
Val Leu Tyr Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met Gly His Leu Ile Gln Arg	
180 185 190	
aag aag gtc cat gtc ttt ggg gat gaa ttg agt ctg gtg act ttg ttt	862
Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu Ser Leu Val Thr Leu Phe	
195 200 205	
cga tgt att caa aat atg cct gaa aca cta ccc aat aat tcc tgc tat	910
Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu Pro Asn Asn Ser Cys Tyr	
210 215 220 225	
tca gct ggc att gca aaa ctg gaa gaa gga gat gaa ctc caa ctt gca	958
Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly Asp Glu Leu Gln Leu Ala	
230 235 240	
ata cca aga gaa aat gca caa ata tca ctg gat gga gat gtc aca ttt	1006
Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Leu Asp Gly Asp Val Thr Phe	
245 250 255	
ttt ggt gca ttg aaa ctg ctg tgacctactt acaccatgctc tgtagctatt	1057
Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu	
260	
ttcctccctt tctctgtacc tctaagaaga aagaatctaa ctgaaaatac caaaaaaaaa	1117
aaaaaaaaaa aaaaaaccct cgagcgccg cc	1149

<210> 18

<211> 264

<212> PRT

<213> Човек

<400> 18

Met	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Val	Ser	Ile	Leu	Pro	Arg	Lys	Glu	Ser	Pro
1				5					10					15	
Ser	Val	Arg	Ser	Ser	Lys	Asp	Gly	Lys	Leu	Leu	Ala	Ala	Thr	Leu	Leu
			20					25					30		
Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Cys	Cys	Leu	Thr	Val	Val	Ser	Phe	Tyr	Gln	Val
		35						40					45		
Ala	Ala	Leu	Gln	Gly	Asp	Leu	Ala	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Leu	Gln	Gly
		50				55					60				
His	His	Ala	Glu	Lys	Leu	Pro	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	Pro	Lys	Ala	Gly
65					70					75					80
Leu	Glu	Glu	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Ala	Gly	Leu	Lys	Ile	Phe	Glu	Pro
				85						90					95
Pro	Ala	Pro	Gly	Glu	Gly	Asn	Ser	Ser	Gln	Asn	Ser	Arg	Asn	Lys	Arg
			100						105					110	
Ala	Val	Gln	Gly	Pro	Glu	Glu	Thr	Val	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Leu
		115						120				125			
Ile	Ala	Asp	Ser	Glu	Thr	Pro	Thr	Ile	Gln	Lys	Gly	Ser	Tyr	Thr	Phe
		130				135					140				
Val	Pro	Trp	Leu	Leu	Ser	Phe	Lys	Arg	Gly	Ser	Ala	Leu	Glu	Glu	Lys
145					150						155				160
Glu	Asn	Lys	Ile	Leu	Val	Lys	Glu	Thr	Gly	Tyr	Phe	Phe	Ile	Tyr	Gly
			165						170						175
Gln	Val	Leu	Tyr	Thr	Asp	Lys	Thr	Tyr	Ala	Met	Gly	His	Leu	Ile	Gln
			180					185					190		
Arg	Lys	Lys	Val	His	Val	Phe	Gly	Asp	Glu	Leu	Ser	Leu	Val	Thr	Leu
		195					200						205		
Phe	Arg	Cys	Ile	Gln	Asn	Met	Pro	Glu	Thr	Leu	Pro	Asn	Asn	Ser	Cys
		210				215						220			
Tyr	Ser	Ala	Gly	Ile	Ala	Lys	Leu	Glu	Glu	Gly	Asp	Glu	Leu	Gln	Leu
225					230						235				240
Ala	Ile	Pro	Arg	Glu	Asn	Ala	Gln	Ile	Ser	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Thr
			245						250						255
Phe	Phe	Gly	Ala	Leu	Lys	Leu	Leu								
			260												

<210> 19

<211> 1430

<212> DNA

<213> Мускулен мус

<220>

<221> CDS

<222> (102)...(848)

<400> 19

ttggcgcagg agcgtgcgta ggattgctcg ctcacaacag gcacctgact ggtattgaaa 60
 gccgagtctt cccttcctct ttaaaggatt ggtgaccagg c atg gct atg gca ttc 116
 Met Ala Met Ala Phe
 1 5

tgc ccc aaa gat cag tac tgg gac tcc tca agg aaa tcc tgt gtc tcc 164
 Cys Pro Lys Asp Gln Tyr Trp Asp Ser Ser Arg Lys Ser Cys Val Ser
 10 15 20

tgt gca ctg acc tgc agc cag agg agc cag cgc acc tgt aca gac ttc 212
 Cys Ala Leu Thr Cys Ser Gln Arg Ser Gln Arg Thr Cys Thr Asp Phe
 25 30 35

tgc aaa ttc atc aat tgc cga aaa gag caa ggc agg tac tac gac cat 260
 Cys Lys Phe Ile Asn Cys Arg Lys Glu Gln Gly Arg Tyr Tyr Asp His
 40 45 50

ctc ctg ggg gcc tgc gtc agc tgt gac tcc acc tgc aca cag cac cct 308
 Leu Leu Gly Ala Cys Val Ser Cys Asp Ser Thr Cys Thr Gln His Pro
 55 60 65

cag cag tgt gcc cac ttc tgt gag aaa agg ccc aga agc cag gcg aac 356
 Gln Gln Cys Ala His Phe Cys Glu Lys Arg Pro Arg Ser Gln Ala Asn
 70 75 80 85

ctc cag ccc gag ctc ggg aga cca cag gcc ggg gag gtg gaa gtc agg 404
 Leu Gln Pro Glu Leu Gly Arg Pro Gln Ala Gly Glu Val Glu Val Arg
 90 95 100

tca gac aac tca gga agg cac cag gga tct gag cat ggt cca gga ttg 452
 Ser Asp Asn Ser Gly Arg His Gln Gly Ser Glu His Gly Pro Gly Leu
 105 110 115

agg cta agt agc gac cag ctg act ctc tac tgc aca ctg ggg gtc tgc 500
 Arg Leu Ser Ser Asp Gln Leu Thr Leu Tyr Cys Thr Leu Gly Val Cys
 120 125 130

ctc tgc gcc atc ttc tgc tgt ttc ttg gtg gcc ttg gcc tcc ttc ctc 548
 Leu Cys Ala Ile Phe Cys Cys Phe Leu Val Ala Leu Ala Ser Phe Leu
 135 140 145

agg cgt aga gga gag cca cta ccc agc cag cct gcc ggg cca cgt ggg 596
 Arg Arg Arg Gly Glu Pro Leu Pro Ser Gln Pro Ala Gly Pro Arg Gly
 150 155 160 165

tca caa gca aac tct ccc cac gcc cac cgc ccc gtg aca gag gct tgc 644
 Ser Gln Ala Asn Ser Pro His Ala His Arg Pro Val Thr Glu Ala Cys
 170 175 180

gac gag gtg acc gcg tca ccc cag cct gtg gaa acg tgt agc ttc tgc 692
 Asp Glu Val Thr Ala Ser Pro Gln Pro Val Glu Thr Cys Ser Phe Cys
 185 190 195

ttc ccg gag cgc agt tct ccc act cag gag agc gcg ccg cgt tgc ctc 740
 Phe Pro Glu Arg Ser Ser Pro Thr Gln Glu Ser Ala Pro Arg Ser Leu
 200 205 210

ggg ata cac ggc ttc gcg ggc act gcc gcc ccg cag ccc tgt atg cgt 788
 Gly Ile His Gly Phe Ala Gly Thr Ala Ala Pro Gln Pro Cys Met Arg
 215 220 225

gca aca gta ggc ggc ctg ggt gtc ctg cgc gca tcc act ggg gac gct 836
 Ala Thr Val Gly Gly Leu Gly Val Leu Arg Ala Ser Thr Gly Asp Ala
 230 235 240 245

cgt ccg gca act tgacagcccg aaaaataaaa aagacaattt agaggatgga 888
 Arg Pro Ala Thr

gtgacagagg gggaaagggg tggagaagag acagatgaag acacgataaa ggaagcccgg 948
 ctgaccccac gcagagcaac aaagcaacca cctgcagcgc ccacgttccc agcaccgcct 1008
 gtgcctgccg ctgtgtccta tactttccag agcagtcaac ctgtgccttt tttctttagt 1068
 cgagaaagat ggagaatgac cggcacctag cattaccctt acaattctta caaacaagtg 1128
 gtctttccta tggccttagg cagatagctg agtgcagtgt ggatgtattt gtgatttaag 1188
 taacttgat gtgtatgtgc agattcgggg ttatgtcata tgtgcatgta tacgtgagtt 1248
 gtgtgtctgt atgagttgtg tgtatgtg cgcctataaa tatgtgtgtg aattctgtgc 1308
 atgcagatgt gtgtgtacat atgtgtctgg ctgatgtggt atagccagaa agatgagggc 1368
 ccttctaggt gaaggccaaa catctaaaa ccatctaggt gatgggtgct cgtgccgaat 1428
 tc 1430

<210> 20

<211> 249

<212> PRT

<213> Мускулен мус

<400> 20

Met Ala Met Ala Phe Cys Pro Lys Asp Gln Tyr Trp Asp Ser Ser Arg
 1 5 10 15
 Lys Ser Cys Val Ser Cys Ala Leu Thr Cys Ser Gln Arg Ser Gln Arg
 20 25 30
 Thr Cys Thr Asp Phe Cys Lys Phe Ile Asn Cys Arg Lys Glu Gln Gly
 35 40 45
 Arg Tyr Tyr Asp His Leu Leu Gly Ala Cys Val Ser Cys Asp Ser Thr
 50 55 60
 Cys Thr Gln His Pro Gln Gln Cys Ala His Phe Cys Glu Lys Arg Pro
 65 70 75 80
 Arg Ser Gln Ala Asn Leu Gln Pro Glu Leu Gly Arg Pro Gln Ala Gly
 85 90 95
 Glu Val Glu Val Arg Ser Asp Asn Ser Gly Arg His Gln Gly Ser Glu
 100 105 110
 His Gly Pro Gly Leu Arg Leu Ser Ser Asp Gln Leu Thr Leu Tyr Cys
 115 120 125
 Thr Leu Gly Val Cys Leu Cys Ala Ile Phe Cys Cys Phe Leu Val Ala
 130 135 140
 Leu Ala Ser Phe Leu Arg Arg Arg Gly Glu Pro Leu Pro Ser Gln Pro
 145 150 155 160
 Ala Gly Pro Arg Gly Ser Gln Ala Asn Ser Pro His Ala His Arg Pro
 165 170 175
 Val Thr Glu Ala Cys Asp Glu Val Thr Ala Ser Pro Gln Pro Val Glu
 180 185 190
 Thr Cys Ser Phe Cys Phe Pro Glu Arg Ser Ser Pro Thr Gln Glu Ser
 195 200 205
 Ala Pro Arg Ser Leu Gly Ile His Gly Phe Ala Gly Thr Ala Ala Pro
 210 215 220
 Gln Pro Cys Met Arg Ala Thr Val Gly Gly Leu Gly Val Leu Arg Ala
 225 230 235 240
 Ser Thr Gly Asp Ala Arg Pro Ala Thr
 245

<210> 21

<211> 473

<212> DNA

<213> Изкуствена последователност

<220>

<223> Северна Блот проба

<400> 21

ctgtggacgg ggggtggctat gagatcctgc cccgaagagc agtactggga tcctctgctg 60
 ggtacctgca tgtcctgcaa aaccatttgc aaccatcaga gccagcgac ctgtgcagcc 120
 ttctgcaggt cactcagctg ccgcaaggag caaggcaagt tctatgacca tctcctgagg 180

gactgcatca gctgtgcctc catctgtgga cagcaccccta agcaatgtgc atacttctgt	240
gagaacaagc tcaggagccc agtgaacctt ccaccagagc tcaggagaca gcggagtgga	300
gaagttgaaa acaattcaga caactcggga aggtaccaag gattggagca cagaggctca	360
gaagcaagtc cagctctccc ggggctgaag ctgagtgcag atcagggtggc cctggctctac	420
agcacgctgg ggctctgcct gtgtgccgtc ctctgctgct tcctgggtggc ggt	473

<210> 22

<211> 25

<212> DNA

<213> Изкуствена последователност

<220>

<223> ZC20061

<400> 22

ctgtggacag ggggtggctat gagat	25
------------------------------	----

<210> 23

<211> 25

<212> DNA

<213> Изкуствена последователност

<220>

<223> Oligonucleotide ZC20062

<400> 23

accgscacca ggaagcacag aggac	25
-----------------------------	----

<210> 24

<211> 256

<212> DNA

<213> Изкуствена последователност

<220>

<223> Северна Блот проба

<400> 24

tgcgattctc tggacctggt tgggactgag cttaataatt tctttggcag ttttcgtgct	60
aatgtttttg ctaaggaaga taagctctga accattaaag gacgagtta aaaacacagg	120
atcaggctc ctgggcatgg ctaacattga cctggaaaag agcaggactg gtgatgaaat	180
tattcttccg agaggcctcg agtacacggt ggaagaatgc acctgtgaag actgcatcaa	240
gagcaaaccg aaggtc	256

<210> 25

<211> 22

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Олигонуклеотид ZC21065

<400> 25
 tgcgattctc tggacctgtt tg 22

<210> 26
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Изкуствена последователност

<220>
 <223> Олигонуклеотид ZC21067

<400> 26
 gaccttcggt ttgctcttga tg 22

<210> 27
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Изкуствена последователност

<220>
 <223> Олигонуклеотид ZC24200

<400> 27
 acaactggggg tctgcctctg 20

<210> 28
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Изкуствена последователност

<220>
 <223> Олигонуклеотид ZC24201

<400> 28
 gcgaagccgt gtatccc 17

<210> 29
 <211> 17
 <212> DNA

- <213> Изкуствена последователност
- <220>
- <223> Олигонуклеотид ZC24198
- <400> 29
tctacagcac gctgggg 17
- <210> 30
- <211> 16
- <212> DNA
- <213> Изкуствена последователност
- <220>
- <223> Олигонуклеотид ZC24199
- <400> 30
gcacaagtgg ggtcgg 16
- <210> 31
- <211> 19
- <212> DNA
- <213> Изкуствена последователност
- <220>
- <223> Олигонуклеотид ZC24271
- <400> 31
ttattgtaat gcaagtgtg 19
- <210> 32
- <211> 17
- <212> DNA
- <213> Изкуствена последователност
- <220>
- <223> Олигонуклеотид ZC24272
- <400> 32
tagctgggag tggaag 17
- <210> 33
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Изкуствена последователност

<220>

<223> Олигонуклеотид ZC24495

<400> 33

- tccaagcgtg accagttcag 20

<210> 34

<211> 18

<212> DNA

<213> Изкуствена последователност

<220>

<223> Олигонуклеотид ZC24496

<400> 34

agttggcttc tccatccc 18

<210> 35

<211> 1090

<212> DNA

<213> Човек

<400> 35

taactctcct	gaggggtgag	ccaagccctg	ccatgtagtg	cacgcaggac	atcaacaaac	60
acagataaca	ggaatgac	cattccctgt	ggcacttat	tctaaaggcc	ccaaccttca	120
aagtcaagt	agtgatatgg	atgactccac	agaaagggag	cagtcacgcc	ttacttcttg	180
ccttaagaaa	agagaagaaa	tgaaactgaa	ggagtgtgtt	tccatcctcc	cacggaagga	240
aagcccctct	gtccgatcct	caaagacgg	aaagctgctg	gctgcaacct	tgctgctggc	300
actgctgtct	tgctgcctca	cggtggtgtc	tttctaccag	gtggccgcc	tgcaagggga	360
cctggccagc	ctccgggcag	agctgcaggg	ccaccacgcg	gagaagctgc	cagcaggagc	420
aggagcccc	aaggccggcc	tggaggaagc	tccagctgtc	accgcgggac	tgaaaatctt	480
tgaaccacca	gctccaggag	aaggcaactc	cagtcagaac	agcagaaata	agcgtgccgt	540
tcagggcca	gaagaaacag	tactcaaga	ctgcttgcaa	ctgattgcag	acagtgaaac	600
accaactata	caaaaaggat	cttacacatt	tgttccatgg	cttctcagct	ttaaaagggg	660
aagtgcccta	gaagaaaaag	agaataaaat	attggtcaaa	gaaactggtt	acttttttat	720
atatggtcag	gttttatata	ctgataagac	ctacgccatg	ggacatctaa	ttcagaggaa	780
gaaggtccat	gtctttgggg	atgaattgag	tctggtgact	ttgtttcgat	gtattcaaaa	840
tatgcctgaa	acactacca	ataattcctg	ctattcagct	ggcattgcaa	aactggaaga	900
aggagatgaa	ctccaacttg	caataccaag	agaaaatgca	caaatatcac	tggatggaga	960
tgtcacattt	tttgggtgat	tgaaactgct	gtgacctact	tacaccatgt	ctgtagctat	1020
tttctcct	ttctctgtac	ctctaagaag	aaagaatcta	actgaaaata	caaaaaaaaa	1080
aaaaaaaaaa						1090

<210> 36

<211> 35
 <212> DNA
 <213> Изкуствена последователност

<220>
 <223> Олигонуклеотид

<400> 36
 cgcgcggttt aaacgscacc atggatgact ccaca 35

<210> 37
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Изкуствена последователност

<220>
 <223> Олигонуклеотид

<400> 37
 gtatacggcg cgcctcacag cagtttcaat gc 32

<210> 38
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Изкуствена последователност

<220>
 <223> Олигонуклеотид ZC17251

<400> 38
 tctggacgtc ctctgctgg tatag 25

<210> 39
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Изкуствена последователност

<220>
 <223> Олигонуклеотид ZC17252

<400> 39
 ggtatggagc aaggggcaag ttggg 25

<210> 40
 <211> 27

<212> DNA

<213> Изкуствена последователност

<220>

<223> Олигонуклеотид ZC17156

<400> 40

gagtggcaac ttccagggcc aggagag

27

<210> 41

<211> 27

<212> DNA

<213> Изкуствена последователност

<220>

<223> Олигонуклеотид ZC17157

<400> 41

cttttgctag cctcaaccct gactatc

27

<210> 42

<211> 813

<212> DNA

<213> Човек

<400> 42

ggcacagcac	ggggcgatgg	gcgcgtttcg	ggccctgtgc	ggcctggcgc	tgctgtgcgc	60
gctcagcctg	ggtcagcgcc	ccaccggggg	tcccgggtgc	ggccctgggc	gcctcctgct	120
tgggacggga	acggacgcgc	gctgctgccg	ggttcacacg	acgcgctgct	gccgcgatta	180
cccgggcbag	gagtgtgttt	ccgagtggga	ctgcatgtgt	gtccagcctg	aattccactg	240
cggagaccct	tgctgcacga	cctgccggca	ccacccttgt	ccccaggcc	aggggtaca	300
gtcccagggg	aaattcagtt	ttggcttcca	gtgtatcgac	tgtgcctcgg	ggaccttctc	360
cgggggccac	gaaggccact	gaaaccttg	gacagactgc	accagttcg	ggtttctcac	420
tgtgttcctt	gggaacaaga	cccacaacgc	tgtgtgcgtc	ccagggtccc	cgccggcaga	480
gccgcttggg	tggctgaccg	tcgtctctct	ggcctgggcc	gctgctgccc	tcctcctgac	540
ctcggcccag	cttgactgc	acatctggca	gctgaggagt	cagtgcattg	ggccccgaga	600
gaccagctg	ctgctggagg	tgccgccgtc	gaccgaagac	gccagaagct	gccagttccc	660
cgaggaagag	cggggcgagc	gatcggcaga	ggagaagggg	cggctgggag	acctgtgggt	720
gtgagcctgg	ctgtcctccg	gggcccaccg	ccgcagccag	cccctcccca	ggagctcccc	780
aggccgcagg	gctctgcggt	ctgctctggg	ccg			813

<210> 43

<211> 44

<212> DNA

<213> Изкуствена последователност

<220>

<223> Олигонуклеотид ZC10.134

<400> 43

- atcagcggaa ttcagatctt cagacaааас tcacacatgc ccac 44

<210> 44

<211> 35

<212> DNA

<213> Изкуствена последователност

<220>

<223> Олигонуклеотид ZC10135

<400> 44

ggcagtctct agatcattta cccggagaca gggag 35

<210> 45

<211> 768

<212> DNA

<213> Човек

<220>

<221> CDS

<222> (7)...(759)

<223> Ig Fc последователност

<400> 45

ggatcc atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gcg gct ccc 48
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro
 1 5 10

aga tgg gtc ctg tcc gag ccc aga tct tca gac aaa act cac aca tgc 96
 Arg Trp Val Leu Ser Glu Pro Arg Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
 15 20 25 30

cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc 144
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu
 35 40 45

ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag 192
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 50 55 60

gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys 65 70 75	240
ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys 80 85 90	288
ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu 95 100 105 110	336
acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys 115 120 125	384
gtc tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys 130 135 140	432
gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser 145 150 155	480
cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys 160 165 170	528
ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln 175 180 185 190	576
ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly 195 200 205	624
tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln 210 215 220	672
cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn 225 230 235	720

cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taatctaga 768
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 240 245 250

<210> 46
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Изкуствена последователност

<220>
 <223> Олигонуклеотид ZC15345

<400> 46
 ccgtgcccag cacctgaagc cgagggggca ccgtcagtct tcctcttccc cc 52

<210> 47
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Изкуствена последователност

<220>
 <223> Олигонуклеотид ZC15347

<400> 47
 ggattctaga ttttataccg ggagacaggg a 31

<210> 48
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Изкуствена последователност

<220>
 <223> Олигонуклеотид ZC15517

<400> 48
 ggtggcggct cccagatggg tcctgtccga gccagatct tcagacaaaa ctcac 55

<210> 49
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Изкуствена последователност

<220>
 <223> Олигонуклеотид ZC15530

- <400> 49
 tgggagggct ttgttga 18
- <210> 50
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Изкуствена последователност
- <220>
 <223> Олигонуклеотид ZC15518
- <400> 50
 тссаасаааg ccctcccatc ctccatcgag aaaaccatct cc 42
- <210> 51
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Изкуствена последователност
- <220>
 <223> Олигонуклеотид ZC15516
- <400> 51
 ggatggatcc atgaagcacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcggctc ccagatg 57
- <210> 52
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Изкуствена последователност
- <220>
 <223> Олигонуклеотиден праймер
- <400> 52
 ctсagccagg ааатссатgс сgagttgаgа сgcttссgта gаatgаgtgg сctgggссg 59
- <210> 53
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Изкуствена последователност
- <220>
 <223> Олигонуклеотиден праймер

- <400> 53
gcatgtgtga gttttgtctg aagatctggg ctcttcagc cccgggag 48
- <210> 54
<211> 59
<212> DNA
<213> Изкуствена последователност
- <220>
<223> Олигонуклеотиден праимер
- <400> 54
ctcagccagg aatccatgc cgagttgaga cgcttccgta gaatgagtgg cctgggccg 59
- <210> 55
<211> 59
<212> DNA
<213> Изкуствена последователност
- <220>
<223> Олигонуклеотиден праимер
- <400> 55
gcacggtggg catgtgtgag ttttgtctga agatctgggc tccttcagcc cccgggagag 59
- <210> 56
<211> 60
<212> DNA
<213> Изкуствена последователност
- <220>
<223> Олигонуклеотиден праимер
- <400> 56
gcacagaggc tcagaagcaa gtccagctct cccggggctg aaggagccca gatcttcaga 60
- <210> 57
<211> 56
<212> DNA
<213> Изкуствена последователност
- <220>
<223> Олигонуклеотиден праимер
- <400> 57

