

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

(19) BG

(11) 106519 A
7(51) C 12 N 15/12



ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 106519

(22) Заявено на 14.03.2002

(24) Начало на действие
на патента от:

Приоритетни данни

(31) 149378	(32) 17.08.99	(33) US
181684	11.02.2000	US
183536	18.02.2000	US

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 4 на 30.04.2003

(45) Отпечатано на

(46) Публикувано в бюлетин №
на

(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(71) Заявител(и):

BIOGEN, INC.

CAMBRIDGE, MA (US)

APOTEC R & D S.A.

GENEVE (CH)

(72) Изобретател(и):

Fabienne Mackay, Vaucluse (AU)

Jeffrey Browning, Brookline, MA

Christine Ambrose, Reading, MA (US)

Jurg Tschopp,

Pascal Schneider, Epalinges (CH)

Jeffrey Thompson, Stoneham, MA (US)

(74) Представител по индустриална
собственост:

Румяна Стефанова Слабова, 1124 София,
ул. "Леонардо да Винчи" 3

(86) № и дата на РСТ заявка:

PCT/US00/22507, 16.08.2000

(87) № и дата на РСТ публикация:

WO01/12812, 22.02.2001

(54) BAFF РЕЦЕПТОР (ВСМА), ИМУНОРЕГУЛАТОРНО СРЕДСТВО

(57) Изобретението се отнася до нов рецептор от семейството на TNF: BAFF-R, до химерни молекули и антитела за BAFF-R и до методи за тяхното използване.

21 претенции, 15 фигури

BG 106519 A

14.03.02

2089/02 - PC

BAFF РЕЦЕПТОР (BCMA), ИМУНОРЕГУЛАТОРНО СРЕДСТВО

ОБЛАСТ НА ТЕХНИКАТА

Настоящото изобретение се отнася до използването на рецептор за BAFF, В-клетъчен активиращ фактор, спадащ към семейството на Тумор некрозис фактора ("TNF") и до неговите блокиращи агенти, които стимулират или подтискат експресията на В-клетки и имуноглобулини. Този рецептор има анти-туморно и имунорегулаторно приложение и се използва също така и при лечение на имunosупресивни нарушения, такива както HIV. В допълнение, рецепторът и неговите блокиращи агенти имат роля за развитието на хипертензия и свързаните с нея нарушения. Освен това, клетки трансфектирани с гена за този рецептор, могат да се използват в генната терапия за лечение на тумори, лимфоми, автоимунни заболявания или наследствени генетични нарушения, включващи В-клетки. Блокиращи агенти като рекомбинантни варианти или антитела, специфични за рецептора имат също така приложения в имунната регулация. Предвижда се също така и използването на рецептора за BAFF като В-клетъчен стимулатор, за стимулиране продукцията на В-клетки, при имунно супресивни заболявания, включващи например използването на пациенти подлагащи се на органна трансплантация (например, костно мозъчен трансплантат), както и при възстановяване след лечения на ракови заболявания. Предвижда се и използването на рецептора за BAFF като адювант или като костимулатор за повишаване и/или възстановяване на В-клетъчните нива приблизително до нормалните нива. Могат да се използват също така и разтворими форми на рецептора за BAFF, които блокират В клетъчната функция, за подтискане на В-клетъчно медираните болести.

ПРЕДШЕСТВАЩО СЪСТОЯНИЕ НА ТЕХНИКАТА

Настоящото изобретение се отнася до нов рецептор в семейството на TNF. Идентифициран е нов рецептор, BAFF-R (или "BCMA").

Семейството на TNF се състои от двойки от лиганди и техните специфични рецептори, отнасящи се до TNF семейство лиганди и TNF семейство рецептори (Bazzoni and Beutler, 1996). Семейството е включено в регулацията на имунната система и вероятно в други не-имунологични системи. Регулацията често е на ниво "управление на превключване", така че сигнализацията на TNF семейството може да доведе до голям брой последователни събития представени най-добре от TNF. TNF може да инициира общ защитен възпалителен отговор на организма към чужда инвазия, който включва променен профил на адхезивни молекули включени в клетъчния трафик, продукцията на хемокини за насочване на специфични клетки към специфични компартменти и съзряването на различни ефекторни клетки. Затова се счита, че като такъв той има клиничен потенциал за регулиране на тези пътища.

Счита се, че индукцията на различни клетъчни отговори медиирани от това TNF семейство цитокини, се иницира от свързването им със специфични клетъчни рецептори. Идентифицирани са поне два различни TNF рецептора с молекулна маса приблизително 55 kDa (TNFR1) и 75 kDa (TNFR2) [Hohman et al., J. Biol. Chem., 264: 14927-14934 (1989) и Brockhaus et al., PNAS, 87: 3127-3131 (1990)]. И двата TNF рецепторни гена са свързани с обширен полиморфизъм. И двата TNFRs имат типичната структура на клетъчно повърхностни рецептори, включваща извънклетъчен, трансмембранен и вътреклетъчен домен. Извънклетъчната част на тип 1 и тип 2 TNRFs съдържа повторена аминокиселинна последователност от четири богати на цистеин домена (CDRs). Сходен повторен мотив от CDRs съществува в няколко други клетъчно

повърхностни белтъци, включващи р75 рецептора за растежния фактор на нервните клетки и В-клетъчния антиген CD40.

Рецепторите са мощно средство за оценка на биологичните пътища, поради тяхното лесно превръщане в имуноглобулинови рекомбинантни белтъци. Тези димерни разтворими форми на рецептора са добри инхибитори в случаи, медиран или от секретирани или от повърхностно свързани лиганди. Свързвайки се с тези лиганди те предпазват лиганда от взаимодействие с клетъчно асоциирани рецептори, което служи като сигнал. Тези рецептрони-Ig рекомбинантни белтъци са полезни не само в експериментален аспект, но те се използват много успешно в клиниката, в случай на TNF-R-Ig, за лечение на чревно възпалително заболяване, ревматоидни артрити и остър клиничен синдром, съпровождащ прилагане на OKT3 (Eason et al., 1996; Feldmann et al., 1996; van Dullemen et al., 1995). Може да се предположи, че манипулирането на много случаи, медиран от сигнализация чрез рецептори от семейството на TNF, ще има широко приложение при лечение на болести свързани с имунната система, а също така и за широк обхват от болести при човека, които имат патологични последствия, поради усложнения в имунната система. Разтворимата форма на неотдавна описания рецептор, остеопротегерин, може да блокира загубата на костна маса и следователно събитията контролирани от семейството на TNF рецепторната сигнализация не се ограничават само до регулиране на имунната система. Антителата към рецептора могат да блокират лигандното свързване и следователно могат да имат също така и клинично приложение. Такъв тип антитела често са доста дълго-живущи и могат да имат предимства пред разтворимите рецептрони-Ig рекомбинантни белтъци, които имат по-къс полу-живот в кръвта.

Докато подтискането на рецептор медираният път е най-използваното терапевтично приложение на тези рецептори, първоначално като възможност за клинично приложение се е считало активирането на TNF рецепторите (Aggarwal and Natarajan, 1996). Активирането на TNF

рецепторите може да инициира клетъчна смърт в прицелната клетка, а от тук и приложение което е и все още е атрактивно при туморите (Eggermont et al., 1996). Рецепторът може да бъде активиран или чрез прилагане на лиганд, т. е. естественият път или на някои антитела, които могат да крос-реагират с рецептора и които също така са силни агонисти. Антителата ще имат предимство в онкологията, тъй като те могат да останат в кръвта за дълъг период от време, докато лигандите обикновено имат кратък живот в кръвния поток. Тъй като много от тези рецептори могат да се експресират по-чувствително в туморите или те могат да участват в сигнализацията само на клетъчна смърт или диференцировка в туморите, агонистичните антитела могат да бъдат удачно оръжие за лечение на рака. По същия начин, много положителни имунологични събития се медиатират чрез семейството на TNF рецепторите, например възпалителните реакции на гостоприемника, производство на антитяло и т. н. и следователно агонистичните антитела могат да имат благоприятен ефект при други не-онкологични приложения.

Парадоксалното е, че подтискането на пътя може да има благоприятен клиничен ефект при лечение на тумори. Например, Fas лигандът се експресира от някои тумори и тази експресия може да доведе до смърт на Fas позитивните лимфоцити, като по този начин се улеснява способността на тумора да се изплъзне от имунната система. В този случай, подтискането на Fas системата може да позволи след това на имунната система да взаимодейства с тумора по други пътища, при които вече достъпът е възможен (Green and Ware, 1997).

ТЕХНИЧЕСКА СЪЩНОСТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Заявителите са идентифицирали кДНК клон, който кодира полипептид, означен в настоящата заявка като "BAFF-R" или като "BCMA", който се свързва с тумор некрозис фактора, BAFF, В-клетъчен

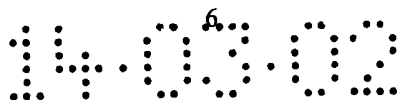
активиращ фактор, спадащ към семейството на Тумор Некрозис Фактор ("TNF"). BAFF е същата молекула, описана преди това във WO/9912964, който е включен тук в справката.

В един вариант изобретението осигурява методи за използване на BAFF-R. В тези методи са включени методи за подтискане на В-клетъчния растеж, индуциран от дендритни клетки В-клетъчен растеж и зреене или производство на имуноглобулин в животни, като се използва BAFF-R полипептид. Включени са също така методи за стимулиране на В-клетъчен растеж, индуциране на В-клетъчен растеж от дендритни клетки и зреене или производство на имуноглобулин в животни, като се използва BAFF-R полипептид или ко-стимулиране на В-клетъчен растеж, индуциране на В-клетъчен растеж от дендритни клетки и зреене или производство на имуноглобулин в животни, като се използва BAFF-R полипептид и анти-Т антитяло, CD 40 лиганд или анти-CD40 лиганд.

В друг вариант, изобретението осигурява методи за използване на BAFF-R при лечение на автоимунни заболявания, хипертензия, сърдечно-съдови нарушения, бъбречни нарушения, В-клетъчни лимфо-пролиферативни нарушения, имуносупресивни болести, органа трансплантация и HIV. Включени са също така методи за приложение на средства за лечение, супресирание или промяна на имунен отговор, включващи сигнален път между BAFF-R и неговият лиганд и методи за подтискане на възпаление чрез прилагане на антитяло, специфично за BAFF-R или негов епитоп.

За предпочитане е методите от настоящото изобретение да се провеждат чрез прилагане на терапевтично ефективно количество от BAFF-R полипептид, химерна молекула, включваща BAFF-R полипептид свързан с хетероложна аминокиселинна секвенция, или хомолог на анти-BAFF-R антитяло.

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



В друг вариант, изобретението осигурява химерни молекули включващи BAFF-R полипептид свързан с хетероложен полипептид или аминокиселинна секвенция. Един пример за такава химерна молекула включва BAFF-R свързан с Fc област от имуноглобулин или епитопна tag секвенция.

В друг вариант, изобретението осигурява анти тяло, което се свързва специфично с BAFF-R полипептида. По избор, анти тялото е моноклонално анти тяло.

КРАТКО ОПИСАНИЕ НА ГРАФИКИТЕ

Фигура 1 показва секвенцията на нуклеинова киселина (SEQ ID NO:2) на кДНК за човешки BAFF-R (BCMA) и получената от нея аминокиселинна последователност (SEQ ID NO:1). Възможно начало на транслация във всеки от остатъците 219 или 228 от нуклеиновата киселина; богат на цистеин домен (CRD) в остатъци 240-341 от нуклеинова киселина от SEQ ID NO:2 (аминокиселинни остатъци 8-41 от (SEQ ID NO:1); и възможна трансмембранна област в остатъци 375-459 от нуклеинова киселина от SEQ ID NO:2.

Фигура 2 показва секвенцията на нуклеинова киселина (SEQ ID NO:4) и получената от нея аминокиселинна последователност (SEQ ID NO:3) на pJST538, плазмид кодиращ BAFF-R-Fc; остатъци 1-69 от нуклеинова киселина, миша IgG-каппа сигнална последователност; остатъци 70-222 от нуклеинова киселина; BAFF-R (остатъци 1-153 от нуклеинова киселина); остатъци 223-906 от нуклеинова киселина, човешко IgG.

Фигура 3 показва секвенцията на нуклеинова киселина на pJST 535, плазмид кодиращ пълната дължина на човешки BAFF-R и получената от нея аминокиселинна последователност.

Фигура 4 показва структурно сравнение между TNF-R55 и BAFF-R.

Фигура 5 показва клетки 293BNA, трансфектирани или с (а) CH269 (1.0 μg) или с (б) pJST535 (0.1 μg) плазмид, експресиращи пълната дължина на BAFF-R и оцветени с 0.5 $\mu\text{g/ml}$ flag-hBAFF, анализирани върху плака.

Фигура 6 (а) показва FACS съвпадащ с трансфектираните с pJST535 293 EBNA клетки и оцветени както следва: без лиганд (черна хистограма), 1 $\mu\text{g/ml}$ flag-hCD40 (розова) или flag-hBAFF (зелена). Всички проби след това се оцветяват с анти-flag M2, последвано от магарешко анти-мишо IgG, както е описано в методите в Пример 2.

Фигура 6 (б) показва FACS хистограми със статистики от същия експеримент. Оцветяването е следното: (1) неоцветени, (2) 7AAD само, (3) 2-ри етап и 7AAD само, (4) 9 $\mu\text{g/ml}$ flag-hBAFF, (5) 3 $\mu\text{g/ml}$ flag-hBAFF, (6) 1 $\mu\text{g/ml}$ flag-hBAFF, (7) 0.33 $\mu\text{g/ml}$ flag-hBAFF, (8) 0.11 $\mu\text{g/ml}$ flag-hBAFF, (9) flag-CD40L 1 $\mu\text{g/ml}$.

Фигура 7 показва имунопреципитати с BAFF-R-Fc както е описано в методите в Пример 4. Стандартни молекулни маркери, в kDa са както са отбелязани от лявата страна на фигурата. Старт (1) 12.5 ng flag-hTWEAK, (2) 12.5 ng flag-hBAFF, (3) имунопреципитация на flag-hBAFF с 0.5 ml BAFF-R-Fc среда, в която са отглеждани клетките, (4) имунопреципитация на flag-hTWEAK с 0.5 ml BAFF-R-Fc среда, в която са отглеждани клетките, (5) имунопреципитация на лиганд с 0.5 ml BAFF-R-Fc среда, в която са отглеждани клетките (6) имунопреципитация на flag-hBAFF с 0.5

ml среда от не-трансфектирани 293EBNA, (7) имунопреципитация на flag-hTWEAK с 0.5 ml условна среда от не-трансфектирани 293 EBNA.

Фигура 8 показва диаграма на резултатите от анализа за пролиферация на спленоцити, в която броят на включените за минута (CPM) в миши спленоцитни клетки в зависимост от количеството добавен BAFF ($\mu\text{g/ml}$).

Фигура 9 показва диаграма на резултатите от анализа за блокиране на BAFF, анализирайки свързването на BAFF с Raji клетки, в който стойностите на MFI (среден флуоресцентен интензитет) са в зависимост от количеството на R:hIgG1 (ng/ml).

Фигура 10 (а) показва диаграма на експресията на IgM спрямо CD1 чрез FACS анализ, за Baff Tg мишки, които получават h-Ig (среден панел) или hBCMA-Ig (долен панел) и за див тип котило - контроли, които получават PBS инжекции (горен панел), както е описано в Пример 11.

Фигура 10 (б) показва диаграма на експресията на CD21 спрямо IgM чрез FACS анализ при въвеждане на IgD позитивни популации от Baff Tg мишки, които получават h-Ig (среден панел) или hBCMA-Ig (долен панел) и от див тип котило - контроли, които получават PBS инжекции (горен панел), както е описано в Пример 11.

Фигура 10 (в) показва диаграма на експресията на CD21 спрямо IgM чрез FACS анализ, при въвеждане на IgD негативни популации за Baff Tg мишки, които получават h-Ig (среден панел) или hBCMA-Ig (долен панел) и за див тип котило - контроли, които получават PBS инжекции (горен панел), както е описано в Пример 11.

Фигура 11 показва теглата на далаците за всички групи Baff Tg мишки (дадени като тегло в mg +/- стандартно отклонение).

Фигура 12 показва диаграма на протеинурия (mg/dL) спрямо брой инжекции за Baff Tg мишки, третирани с PBS, hIg, hBCMA-Ig и за котило - контроли.

Фигура 13 показва диаграма за средната стойност на артериално налягане (mmHg) за Baff Tg мишки и див тип контроли.

Фигура 14 показва диаграма за отделните средни стойности на артериално налягане (mmHg) за Baff Tg мишки и див тип контроли.

Фигура 15 показва бар - графика за процента на SNF1 мишки, с остра форма на нефрити, след третиране с BAFF-R-Ig (BCMA-Ig), HuIgG или PBS.

Фигура 16 показва графика на общия брой CD11c+DC клетки (в милиони) за мишки, третирани in vivo с 20 µg BCMA-Ig, 50 µg BCMA-Ig, HuIgG или PBS. Изследваните CD11c+DC клетъчни популации са: (1) CD8a-CD4-, (2) CD8a+CD4-, и (3) CD8a-CD4+.

ПОДРОБНО ОПИСАНИЕ

Дефиниции

Използваните тук термини “BAFF-R” и “BCMA” включват нативна BAFF-R секвенция и BAFF-R варианти (които са определени по-нататък). BAFF-R може да бъде изолиран от различни източници, такива като миши

или човешки тъкани или от друг източник, или да се получи чрез рекомбинантни или синтетични методи.

“Нативна BAFF-R секвенция” включва полипептид притежаващ същата аминокиселинна последователност като BAFF-R, получен от природния. Такава нативна BAFF-R секвенция може да бъде естествено изолирана или може да се получи чрез рекомбинантни или синтетични начини. Срещат се естествено скъсени или секретирани форми на BAFF-R (например разтворими форми, съдържащи например секвенция на извънклетъчен домен), срещат се естествени вариантни форми (например алтернативно сплайсирани форми), срещат се и естествени алелни варианти на BAFF-R. В един вариант от изобретението, нативната BAFF-R секвенция е зрял BAFF-R полипептид или полипептид с цялата нативна секвенция, включваща аминокиселини от 1 до 184 от SEQ ID NO:1 или неин фрагмент.

“Извънклетъчен BAFF-R домен” или “BAFF-R ECD”, се отнася до форма на BAFF-R, която фактически е свободна от трансмембранны и цитоплазмни домени на BAFF-R. Обикновено, извънклетъчния BAFF-R домен ще има по-малко от 1 % от тези трансмембранны и цитоплазмни домени и ще има предимно по-малко от 0.5 % от тези домени. По избор, BAFF-R ECD ще включва аминокиселинни остатъци 8 до 41 от SEQ ID NO:1, или аминокиселинни остатъци 4 до 51 от SEQ ID NO:1, или аминокиселинни остатъци 1 до 53 от SEQ ID NO:1. В предпочитан вариант от настоящото изобретение, BAFF-R ECD включва аминокиселинни остатъци 1 до 51 от SEQ ID NO:1. За специалистите в областта е ясно, че трансмембранныят домен идентифициран за BAFF-R полипептида от настоящото изобретение е определен съобразно критериите, използвани рутинно в областта за идентифициране на такъв тип хидрофобен домен. Точните граници на трансмембранныя домен могат да варират, но най-често с не повече от около 5 аминокиселини, в който и да е край на

14.03.03

споменатия специфично тук домен. Съответно, BAFF-R ECD може да съдържа по избор аминокиселини 8-41 (SEQ ID NO:1).

“BAFF-R” вариант означава активен BAFF-R, който е определен по-долу, имащ поне около 80 % аминокиселинна идентичност с BAFF-R, притежаващ предсказаната аминокиселинна секвенция, показана в SEQ ID NO:1 за цялата нативна BAFF-R секвенция или с BAFF-R ECD секвенцията. Такива BAFF-R варианти включват например BAFF-R полипептиди, където са добавени или са премахнати един или повече аминокиселинни остатъка, от края или С-края на секвенцията от SEQ ID NO:1. Обикновено BAFF-R варианта, ще има поне около 80 % или 85 % идентична аминокиселинна последователност, за предпочитане поне около 90 % идентична аминокиселинна последователност, а дори още по-добре поне около 95 % идентична аминокиселинна последователност с аминокиселинната секвенция от SEQ ID NO:1.

“Процент (%) идентична аминокиселинна последователност” по отношение на BAFF-R секвенциите идентифицирани тук, се определя като процент от аминокиселинни остатъци в секвенцията кандидат, които са идентични с аминокиселинните остатъци в BAFF-R секвенцията, след съпоставяне на секвенциите и въвеждане на празни места, ако е необходимо, за да се постигне максимален процент сходство, като не се отчитат каквито и да са консервативни замествания като част от идентичната последователност. Сравняването с цел определяне процент на идентичност в аминокиселинната последователност може да се постигне по различни начини, които са познати на специалистите в областта, например, като се използва общодостъпен компютърен софтуер, като BLAST, ALIGN или Megalign (DNASTAR) софтуер. Специалистите в областта могат да определят подходящите параметри за оценка на сравнението, включвайки всички логаритми, необходими за да се постигне максимално съпоставяне на цялата дължина от секвенции, които трябва да се сравнят.

Използваният тук термин “tag епитоп” се отнася до химерен полипептид, включващ BAFF-R, или негова доменна последователност, свързана с “tag полипептид”. Tag полипептидът има достатъчно остатъци, за да осигури епитоп, срещу който може да се създаде антитяло, или който може да се идентифицира чрез някакъв друг агент, който освен това е достатъчно къс, така че той не пречи на активността на BAFF-R. За предпочитане е tag полипептидът да е сравнително уникален, така че антитялото да не може да крос-реагира с други епитопи. Подходящите tag полипептиди имат обикновено поне 6 аминокиселинни остатъка и обикновено между 8 до около 50 аминокиселинни остатъка (за предпочитане, около 10 до около 20 остатъка).

Термин “изолиран”, използван за различните полипептиди описани тук, означава полипептид, който е идентифициран и отделен/или възстановен от съединение от неговото естествено обкръжение. Контаминирани съединения от естественото му обкръжение са вещества, които биха могли да попречат за диагностиката или терапевтичното приложение на полипептида и могат да включват ензими, хормони и други белтъчни или не-белтъчни разтвори. В предпочитан вариант, полипептидът ще е пречистен (1) до степен достатъчна, за да се получат поне 15 остатъка от N-края или вътрешна аминокиселинна последователност, чрез използване на въртящ се секвенатор, или (2) до хомогенност чрез SDS PAGE, при не-редуциращи условия или при условия на редукция, като се използва Coomassie blue, или за предпочитане сребърно оцветяване. Изолираният полипептид включва полипептид *in situ* в рекомбинантни клетки, тъй като няма да присъства поне един компонент от естественото обкръжение на BAFF-R. Обикновено обаче, изолираният полипептид се получава поне чрез едно стъпало на пречистване.

Терминът “антитяло” се използва в по-широк смисъл и покрива по-специално отделни BAFF-R моноклонални антитела (включващи агонист,

антагонист и неутрализиращи антитела) и анти-BAFF-R антитяло състави с полиепитопна специфичност.

Използваният тук термин “моноклонално антитяло”, се отнася до антитяло получено от популация от фактически хомогенни антитела, т. е. отделните антитела включващи популацията са идентични, като се изключат възможни естествено срещащи се мутации, които могат да присъстват в минимални количества.

Използваният тук термин “пречистен препарат” или “фактически чист препарат” за полипептид, означава полипептид, който е отделен от други белтъци, липиди и нуклеинови киселини с които той се среща нормално. За предпочитане е, полипептидът да е отделен също така от други субстанции, например антитела, матрикси и т. н., които се използват за пречистването му.

Използваните тук термини “третиране”, “лечение” и “терапия”, се отнасят до лечебна терапия, профилактична терапия и превантивна терапия.

Термините “пептиди”, “белтъци” и “полипептиди” се използват тук като равностойни.

Използваният тук термин “биологично активен”, означава да има *in vivo* или *in vitro* активност, която може да се представи директно или индиректно. Биологично активните фрагменти на BAFF-R могат да имат например 70 % аминокиселинна хомология с активният участък от рецептора, за предпочитане е да е поне 80 %, а още по-добре е хомологията да е поне 90 % . Тук идентичност или хомология по отношение на рецептора се определя като процент аминокиселинни остатъци в секвенцията кандидат, които са идентични с аминокиселинните остатъци в BAFF-R в SEQ ID NO:1, или които са идентични с определена част от аминокиселинните остатъци в SEQ ID NO:1.

Използваният тук термин “бозайник”, се отнася до всяко животно класифицирано като бозайник, включващо хора, крави, коне, кучета,

мишки и котки. В предпочитан вариант от изобретението, бозайникът е човек.

Ако не е указано друго, за приложение на настоящото изобретение ще се използват конвенционални техники на клетъчната биология, клетъчното култивиране, молекулярната биология, трансгенната биология, микробиологията, рекомбинантната ДНК технология и имунологични техники, които са познати на специалистите в областта. Тези техники са описани в литературата.

Сега ще бъдат дадени подробни обяснения за настоящите предпочитани варианти от изобретението. Това изобретение се отнася до използването на BAFF-R и сродни на BAFF-R молекули, за повлияване растежа и зреенето на В-клетки и секрецията на имуноглобулин. Изобретението се отнася до използването на BAFF-R и сродни на BAFF-R молекули, за повлияване на отговорите на имунната система, което се налага от свързаните с имунната система нарушения. В допълнение, това изобретение включва лечение на рак и имунни нарушения, чрез използването на BAFF-R или сродни на BAFF-R гени чрез методи на генната терапия.

BAFF-R и неговите хомолози, получени от гостоприемници, трансформирани със секвенции от изобретението, така както и нативният BAFF-R, пречистен чрез методи известни в областта или получен от известни аминокиселинни секвенции, са полезни при различни методи за антираково, антитуморно и имунорегулаторно приложение. Те са полезни също така в терапията и методите насочени към други заболявания.

Друг вариант от изобретението се отнася до използването на полипептид, кодиран от изолирана нуклеинова киселина, кодираща BAFF-R в "антисенс" терапия. Използваният тук термин "антисенс" терапия, се отнася до прилагане или *in situ* получаване на олигонуклеотиди или техни производни, които хибридизират специфично при клетъчни условия с клетъчната иРНК и/или ДНК, кодиращи нужният лиганд, така че да

подтиснат експресията на кодиращия белтък, т. е. чрез подтискане на транскрипцията и/или транслацията. Свързването може да бъде чрез обичайните комплиментарни бази, или например, в случай на свързване с двойноспирални ДНК, чрез специфични взаимодействия в голямата бразда на двойната спирала. Най-общо "антисенс" терапията се отнася до обхват от техники, използвани обикновено в областта и включва всяка терапия, която се базира на специфично свързване с олигонуклеотидни секвенции.

Един антисенс конструктор от настоящото изобретение може да се направи, например като експресионен плазмид, който когато се транскрибира в клетката, продуцира РНК, която е комплиментарна поне на част от клетъчната иРНК, която кодира BAFF-R-лиганд. Съответно, антисенс конструкторът може да е олигонуклеотидна сонда, която се образува *ex vivo*. Предимно такива олигонуклеотидни сонди са модифицирани олигонуклеотиди, които са устойчиви на ендогенни нуклеази и следователно са стабилни *in vivo*. Примерни молекули от нуклеинови киселини, използвани като антисенс олигонуклеотиди са фосфорамидатни, фосфотиоатни и метилфосфонатни аналози на ДНК (Виж например 5, 176, 996; 5, 264, 564; и 5, 256, 775). В допълнение, обичайните подходи за конструиране на олигомери, приложими в антисенс терапията са разгледани, например от Van Der Krol et al., (1988) *Biotechniques*, 6:958-976; and Stein et al., (1988) *Cancer Res* 48: 2659-2668, които са включени тук в справката.

BAFF-R от изобретението, както се дискутира по-горе е член на семейството TNF рецептори. Белтъкът, фрагменти или негови хомолози могат да имат широко терапевтично или диагностично приложение.

Полипептидите от изобретението взаимодействат специфично с BAFF, полипептид описан преди това във WO 99/12964, включен тук в справката. Обаче, пептидите и методите описани тук, позволяват идентифицирането на молекули, които взаимодействат специфично с BAFF-R или негови фрагменти.

В някои варианти изобретението включва методи за използване на пептиди, получени от BAFF-R, които имат способността да се свързват с BAFF. Фрагменти от BAFF-Rs могат да се получат по няколко начина, например по рекомбинантен път, чрез PCR, протеолитично разграждане или чрез химичен синтез. Вътрешни или крайни фрагменти от полипептида могат да се получат чрез отстраняване на един или повече нуклеотида от единия или двата края на нуклеинова киселина, която кодира полипептида. Експресията на ДНК, която е резултат от мутагенезис води до получаване на полипептидни фрагменти.

В настоящото изобретение могат да се получат също така химерни молекули, като се използват техники добре познати на специалистите в областта. Настоящото изобретение предвижда използването на химерни молекули, включващи BAFF-R полипептид (или негов вариант), свързан с хетероложна аминокиселинна секвенция, такава като IgG Fc домен от имуноглобулин. За предпочитане е такива химерни молекули да са разтворими и да включват разтворим BAFF-R полипептид.

Могат да бъдат синтезирани също така по химичен път и полипептидни фрагменти, като се използват техниките добре познати в областта, такива като конвенционалната в химията Merrifield твърдо-фазова f-мос или t-мос техника. Например, пептидите и ДНК секвенциите от настоящото изобретение могат да бъдат условно разделени на фрагменти с желана дължина, без припокриване на фрагмента или разделени на припокриващи се фрагменти с желана дължина. Методите за това са описани подробно по-долу.

Получаване на разтворими форми на BAFF-R

Разтворимите форми на BAFF-R могат често да са ефективен сигнал и следователно, могат да се прилагат като лекарствен препарат, който сега напълно наподобява формата на естествената мембрана. Възможно е за

BAFF-R, за които се претендира тук, да се секретират естествено като разтворими цитокини, обаче ако това не стане, то може генът да се реконструира отново, за да се усили секрецията. За да се създаде разтворима секретирана форма на BAFF-R, на ниво ДНК трябва да се премахнат N-крайните трансмембранны области и известна част от интегралната област и те да се заменят с тип I лидерна или съответно с тип II лидерна последователност, което ще позволи ефективно протеолитично разграждане в избраната експресионна система. Специалистите в областта могат да варират количеството на интегралната област, запазена в секретирания експресионен конструктор, за да оптимизират както свойствата за свързване с лиганд, така и ефективността на секрецията. Например, конструктори съдържащи всички възможни дължини на интегралната част, т. е. скъсените N-краища, могат да се приготвят така, че да се получат белтъци започващи с аминокиселина 1 до 51. От този тип анализ, ще се получи оптималната дължина на интегралната секвенция.

В предпочитани варианти от настоящото изобретение, разтворимият BAFF-R полипептид е: изолиран BAFF-R полипептид с нативна секвенция, включваща аминокиселинни остатъци от 1 до 51 от SEQ ID NO:1 или неин фрагмент; изолиран BAFF-R полипептид, притежаващ поне 80 % (а още по-добре 90 %) аминокиселинна последователност идентична с нативната секвенция на BAFF-R полипептида, включваща аминокиселинни остатъци от 1 до 51 от SEQ ID NO:1 или неин фрагмент; или изолиран BAFF-R полипептид, включващ аминокиселинни остатъци от 8 до 41 от SEQ ID NO:1 или неин фрагмент.

Получаване на антитела реагиращи с BAFF-R

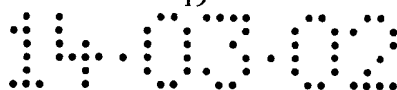
Изобретението включва също така антитела, взаимодействащи специфично с BAFF-R за който се претендира или с негови ко-рецептори. Анти-белтъчни/анти-пептидни анти-серуми или моноклонални антитела

могат да се получат чрез стандартни протоколи (Виж например, *Antibodies: A Laboratory Manual* ed. by Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). Бозайник като мишка, хамстер или заек могат да бъдат имунизирани с имуногенна форма на пептида. Техниките за предаване на имуногенността на белтък или пептид включват конюгиране с носители, или други техники, които са добре известни в областта.

Имуногенна част от BAFF-R или негови ко-рецептори могат да се прилагат в присъствие на адювант. Ходът на имунизацията може да се контролира чрез детекция на титъра от антитела в плазмата или серума. За оценка на нивата от антитела може да се използва стандартна ELISA или други имуноанализи с имуногена като антиген.

В предпочитан вариант, тези антитела са имуноспецифични за антигенните детерминанти на BAFF-R или за неговите ко-рецептори, например антигенни детерминанти на полипептид от SEQ ID NO:1, или на много сходен хомолог от човек или от бозайник различен от човека (например 70, 80 или 90 процента хомология, за предпочитане поне 95 процента хомология). В друг предпочитан вариант от настоящото изобретение, анти- BAFF-R или анти- BAFF-R-ко-рецепторните антитела фактически не могат да крос-реагират (т. е. да реагират специфично) с белтък, който има например по-малко от 80 процента хомология със SEQ ID NO:1; за предпочитане по-малко от 90 процента хомология със SEQ ID NO:1; а най-добре по-малко от 95 процента хомология с SEQ ID NO:1. Чрез термина “фактически не може да крос-реагира” се има предвид, че антитялото има афинитет за свързване с не-хомоложен белтък, който е по-малък от 10 процента, за предпочитане по-малък от 5 процента, а още по-добре по-малък от 1 процент, от свързващия афинитет за белтък от SEQ ID NO:1.

Предвижда се използваният тук термин антитяло да включва негови фрагменти, които също така взаимодействат специфично с BAFF-R или с негови рецептори. Антителата могат да бъдат фрагментирани, като се



използват обичайните техники и фрагментите могат да се скринират за използването им по същия начин, както е описано по-горе за целите на антитела. Например, $F(ab')_2$ фрагменти могат да се получат чрез третиране на антитяло с пепсин. Полученият $F(ab')_2$ фрагмент може да се третира, за да се редуцират дисулфидните мостове, за да се получат Fab' фрагменти. В настоящото изобретение освен това се предвижда антителата да включват биоспецифични и химерни молекули, притежаващи анти BAFF-R или анти-BAFF-R-ко-рецепторна активност. Следователно, моноклоналните и поликлоналните антитела (Ab) насочени срещу BAFF-R и техните ко-рецептори и фрагменти от антитела, като Fab' и $F(ab')_2$, могат да се използват за да блокират действието на BAFF-R и респективно на неговите ко-рецептори.

Могат да се направят различни форми на антитела като се използват стандартни рекомбинантни ДНК технологии, (Winter and Milstein, Nature, 349:293-299 (1991), специално включена тук в справката). Например, могат да се конструират химерни антитела, в които антиген свързващия домен от животинско антитяло е свързан с човешки константен домен (например, Cabilly et al., U. S. 4, 816, 567, включен тук в справката). Химерните антитела могат да редуцират наблюдаваните имуногенни отговори, възникнали от животинските антитела, когато се използват за клинично лечение при хора.

В допълнение, могат да се синтезират рекомбинантни "наподобяващи човешките антитела", които разпознават BAFF-R или неговите ко-рецептори. Антителата наподобяващи човешките са химерни, включващи главно човешки IgG секвенции, в които са вмъкнати областите, отговорни за специфично антигенно свързване. Животните се имунизират с желания антиген, изолират се съответните антитела и се отделя частта от секвенциите във вариабилната област, които са отговорни за специфичното свързване с антигена. Получените от животните антиген-свързващи области след това се клонират в подходяща позиция на гени за човешко

антитяло, в които антиген-свързващите области са премахнати. Антителата наподобяващи човешките, намаляват използването на хетероложни (т. е. междувидови) секвенции в човешки антитела и следователно е по-малко вероятно да предизвикват имунни отговори в лекуваните обекти.

Може да се постигне конструиране на различни класове рекомбинантни антитела, чрез създаване на химерни или наподобяващи човешките антитела, включващи вариабилни домени и човешки константни домени (CH1, CH2, CH3), изолирани от различни класове имуноглобулини. Например, антитела с увеличени антиген свързващи валентни места, могат да се получат по рекомбинантен път чрез клониране на антиген-свързващото място във вектори, носещи човешките константни области от веригата (Arulanandam et al., J. Exp. Med., 177:1439-1450 (1993), включена тук в справката).

В допълнение, могат да се използват стандартни рекомбинантни ДНК техники, за да се промени свързващият афинитет на рекомбинантните антитела с техните антигени, чрез промяна на аминокиселинните остатъци в близост до антиген-свързващите места. Антиген свързващия афинитет на наподобяващите човешки антитела, може да се повиши чрез мутагенезис на базата на молекулно моделиране (Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 86:10029-33 (1989), включена тук в справката).

Получаване на аналози: получаване на променена ДНК и пептидни секвенции

Аналозите на BAFF-R могат да се различават от естествено срещания се BAFF-R по аминокиселинна секвенция, или по критерии, които не включват секвенцията, или и по двете. Модификации, които не се отнасят до различия в аминокиселинната секвенция, включват *in vivo* или *in vitro* химична дериватизация на BAFF-R. Модификациите включват, но

не се ограничават до, промени в ацетилиране, метилиране, фосфорилиране, карбоксилиране или гликозилиране.

Предпочитани аналози включват биологично активни фрагменти на BAFF-R, чиито секвенции се различават от секвенцията дадена в SEQ ID NO:1, чрез една или повече консервативни аминокиселинни замествания, или чрез една или повече не-консервативни аминокиселинни замествания, делеции или инсерции, които запазват активността на BAFF-R-лиганда. Консервативните замествания включват по същество заместване на една аминокиселина с друга, със сходни характеристики, например замествания в следните групи: валин, глицин; глицин, аланин; валин, изолевцин, левцин; аспартова киселина, глутамова киселина; аспаргин, глутамин; серин, треонин; лизин, аргинин; и фенилаланин, тирозин.

Приложение

Пълната дължина на BAFF-R гена (SEQ ID NO:2) или на негови части, могат да се използват като хибридационни сонди за кДНК библиотека, за изолиране, например на други гени, които имат нужната идентична секвенция с тази на BAFF-R секвенцията, описана в SEQ ID NO:2. Нуклеотидните секвенции кодиращи BAFF-R могат да се използват също така за конструиране на хибридационни сонди за картиране на гени, които кодират BAFF-R и за генетичен анализ на индивиди с генетични нарушения. Може да се направи скрининг анализ, за да се открият водещите съединения, които имитират биологичната активност на BAFF-R. Такъв скрининг анализ ще включва анализи отговорни за широко-машабно скриниране на химични библиотеки, правейки ги особено подходящи за идентифициране на кандидати за лекарствени препарати с малка молекула. Предполагаемите малки молекули включват синтетични органични или неорганични съединения. Нуклеиновите киселини, които кодират BAFF-R или неговите модифицирани форми могат да се използват

също така, за създаване или на трансгенни животни или "нокаут" животни, които от своя страна са полезни за разработването и скринирането на реагенти с терапевтично приложение.

Както е описано тук, в един вариант от изобретението, се осигуряват методи за стимулиране на В-клетъчния растеж, на индуциран от дендритни клетки В-клетъчен растеж и зреене или получаване на имуноглобулин в животни, като се използва BAFF-R полипептид, или ко-стимулиране на В-клетъчен растеж, индуциран от дендритни клетки В-клетъчен растеж и зреене или получаване на имуноглобулин в животни, като се използва BAFF-R полипептид и анти-Т антитяло, CD40 лиганд или анти-CD40 лиганд. Включени са също така методи за подтискане на В-клетъчен растеж, на индуциран от дендритни клетки В-клетъчен растеж и зреене или получаване на имуноглобулин в животни, като се използва BAFF-R полипептид.

В друг вариант, изобретението осигурява методи за използване на BAFF-R за лечение на автоимунни заболявания, хипертензия, сърдечносъдови нарушения, бъбречни нарушения, В-клетъчни лимфо-пролиферативни нарушения, имуносупресивни заболявания, органна трансплантация, възпаление и HIV. Включени са също така методи за използване на средства за лечение, супресия или промяна на имунен отговор, включващи сигналния път между BAFF-R и неговия лиганд.

В един вариант, изобретението осигурява фармацевтични състави, включващи BAFF-R полипептид и фармацевтично приемлив ексципиент. Подходящи носители за BAFF-R полипептида, например и техни препарати са описани в Remington' Pharmaceutical Sciences, 16th ed., 1980, Mack Publishing Co., edited by Oslo et al. Обикновено се използва подходящо количество от фармацевтично приемлива сол, за да се направи препаратът изотоничен. Примери за носител включват буфери, такива като физиологичен разтвор, Рингеров разтвор и разтвор на декстроза. Предимно рН на разтвора е от около 5 до около 8, за предпочитане е да е от около 7.4

до около 7.8. Други носители включват препарати с продължително освобождаване, такива като полупропускливи матрикси от твърди хидрофобни полимери, които матрикси са под формата на кръгли структури, например липозоми, филми или микрочастици. Ясно е за специалистите в областта, че някои носители могат да бъдат по-предпочитани, в зависимост например от курса на прилагане и концентрацията на BAFF-R полипептида, който ще бъде приложен.

Прилагането може да бъде осъществено чрез инжекция (например интравенозно, интраперитонеално, подкожно, интрамускулно) или чрез други методи, такива като инфузия, които осигуряват доставянето на препарата в кръвния поток, в ефективна форма.

За практическото приложение на настоящото изобретение ще се използват, ако не е указано нещо друго, конвенционални техники на клетъчната биология, клетъчното култивиране, молекулярната биология, микробиологията, рекомбинантната ДНК технология, белтъчната химия и имунологичните техники, които са известни на специалистите в областта. Такива техники са описани в литературата. Виж например, **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2nd edition. (Sambrook, Fritsch and Maniatis, eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; **DNA Cloning**, Volumes I and II (D. N. Glover, ed), 1985; **Oligonucleotide Synthesis**, (M. J. Gait, ed), 1984; U. S. Patent No. 4, 683, 195 (Mullis et al.); **Nucleic Acid Hybridization** (B. D. Hames and S. J. Higgins, eds.), 1984; **Transcription and Translation** (B. D. Hames and S. J. Higgins, eds.), 1984; **Culture of Animal Cells** (R. I. Freshney, ed). Alan R. Liss, Inc., 1987; **Immobilized Cells and Enzymes**, IRL Press, 1986; **A Practical Guide to Molecular cloning** (B. Perbal), 1984; **Methods in Enzymology**, Volumes 154 and 155 (Wu et al., eds), Academic Press, New York; **Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells**, (J. H. Miller and M. P. Calos, eds.), 1987, Cold Spring Harbor Laboratory; **Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology** (Mayer and Walker, eds), Academic Press, London, 1987; **Handbook of Experimental Immunology**, Volumes I-IV

(D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds), 1986; **Manipulating the Mouse Embryo**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986.

Следващите Примери са представени, за да илюстрират настоящото изобретение и те не трябва да се считат като ограничаващи.

ПРИМЕРИ ЗА ИЗПЪЛНЕНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Пример 1: Определяне свързването на BAFF с BAFF-R, като се използва анализ върху плака

В този пример е описано свързването на BAFF с BAFF-R трансфектирани клетки, като се използва анализ върху плака.

Пълната дължина на човешки BAFF-R се получава от BJAB poly A+ РНК, като се използва Superscript II preamplification kit (Life Technologies), за да се получи кДНК матрица и се амплифицира с Pfu 1, като се използват праймери комплиментарни на 5' и 3' кодиращите секвенции от BAFF-R. PCR продуктът се клонира в CH269, произведен на pCER4 (Invitrogen). Полученият клон се нарича pJST535. Човешки ембрионални клетки от бъбрек, съдържащи EBNA-1 гена (293 EBNA) се посяват в 6 ямкови плаки, покрити с фибронектин и се трансфектират с липофектамин (Life Technologies) или с pJST535 при различни разреждания, или с CH269 като основна контрола. На 48 час след трансфекцията, трансфектираните клетки се анализират за способността им да свързват разтворим flag-hBAFF (аминокиселини L83-L285) както следва. Всички инкубации се провеждат на стайна температура. Средата в която се отглеждат клетките се аспирира от ямките и клетките се измиват с ВНА буфер (20 mM HEPES, pH 7.0, 0.5 mg/ml BSA, 0.1 % NaN₃) и се инкубират с 0.5 µg/ml FLAG-hBAFF, разреден с PBS, съдържащ 1mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ и 0.1 % NaN₃. Един час след инкубацията BAFF разтворът се отстранява и клетките се измиват с ВНА. След това клетките се инкубират за 30 минути в PBS разтвор, съдържащ 1

$\mu\text{g/ml}$ анти-FLAG моноклонално антитяло, M2 (Sigma). Този разтвор се аспирира и клетките се измиват с ВНА. След това клетките се инкубират за 30 минути с 1:3000 разредена алкална фосфатаза, конюгирана с козе-анти-мишо IgG F(ab)'2 (Jackson Immuno Research). Този разтвор се аспирира и клетките се измиват с ВНА. За да се редуцира количеството на фоновото оцветяване, дължащо се на ендогенна алкална фосфатаза, клетките се инкубират за 15 минути в 2.5 mM levamisol (Vector Laboratories), разреден в 100 mM NaCl, 100 mM Tris-Cl pH 9.5 и 5 mM MgCl₂. За хромогенна детекция на алкалната фосфатаза, инхибиторният разтвор се изтегля и клетките се инкубират с разтвор от fast red и нафтол фосфат (Pierce). Оцветяването се наблюдава и се снима под микроскоп.

Отлаганията от fast red оцветяването се наблюдават във всички ямки трансфектирани с BAFF-R експресияция плазмид, pJST535. Честотата на сигнала намалява с намаляване на количеството плазмид трансфектиран в клетките. Не се наблюдава оцветяване при клетки, трансфектирани с контролния експресионен вектор CH269. Не се наблюдава оцветяване също така при всички трансфектирани клетки, когато от протокола за оцветяване отпадне FLAG-hBAFF или когато друг лиганд, представител от семейството на TNF, FLAG-tagged LIGHT замества flag-hBAFF. Следователно, оцветяването на BAFF-R трансфектирани клетки с BAFF е специфично.

**Пример 2: Свързване на BAFF с BAFF-R трансфектирани клетки,
определено чрез FACS анализ**

Примерът описва детекция на BAFF с BAFF-R трансфектирани клетки, като се използва FACS анализ.

Плазмидът кодиращ пълната дължина на BAFF-R, pJST535 се трансфектира в 293EBN клетки, като се използва FuGene6 (Boehringer Mannheim). На 24 или 48 час след трансфекцията, клетките се отстраняват от плаките, като се използва 5 mM EDTA в PBS и се преброяват. Клетките се измиват два пъти с FACS буфер (PBS, съдържащ 10 % фетален говежди серум, 0.1 % NaN₃ и 10 µg/ml hIgG (Jackson Immuno Research) и след това се инкубират 2.5×10^5 клетки за 1 час върху лед с FLAG-hBAFF, разреден с FACS буфер, при концентрации вариращи от 9 µg/ml до 0.037 µg/ml. Клетките се измиват с FACS буфер и се инкубират с анти-FLAG моноклонално антитяло, M2 при 5 µg/ml за 30 минути върху лед. Клетките се измиват с FACS буфер и се инкубират за 30 минути върху лед в разтвор, съдържащ 1: 100 разредено F(ab')₂ магарешко-анти мишо IgG конюгирано с R-фикоеритрин, и 10 µg/ml 7-AAD. След като клетките се измият с FACS буфер, те се ресуспендират с FACS буфер, съдържащ 1% параформалдехид. Следва FACS анализ, като 7-AAD положителните (мъртви) клетки се отстраняват.

Резултатите от FACS анализа показват, че фракцията от клетки, които са били трансфектирани с BAFF-R са способни да се свързват с BAFF. При концентрация на BAFF от 9 µg/ml, около 28 % от клетките свързват BAFF, при средна стойност на флуоресцентния интензитет (MFI) от 366. Като се използва само PE-белязан магарешки анти-миши реагент, няма значимо изместване на клетки. Само 1.3 % от клетките имат MFI 23.5, като средната стойност за всички клетки е 5.5. Сигналят за BAFF-R трансфектираните клетки намалява с намаляване на количеството на BAFF. При 100 ng/ml, 8.76 % от клетките имат MFI 78.9.

Пример 3: FACS анализ на BAFF/ BAFF-R взаимодействие,
включващо GFP маркер

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

Клетките 293EBN се трансфектират с pJST535 и GFP репортерен плазмид, както е описано в Пример 2. Репортерният плазмид кодира мембранно закотвена GFP молекула. Като използвахме ко-трансфекция с два плазида, ние анализирахме процента на трансфектираните клетки, които са способни да се свързват с BAFF. Клетките се отстраняват от плаките и се подлагат на BAFF свързване и детекция, както е описано в Пример 2. Отново се включва 7-AAD, с цел да се отхвърлят мъртвите клетки. Пробите се анализират чрез FACS и се прави диаграма. Горният десен квадрат показва клетки със свързан BAFF (фикоеритрин позитивни) и експресиращи GFP.

Въпреки че не всички GFP трансфектирани клетки свързват BAFF, значителна част от клетките са в горния десен квадрат в сравнение с контролата. Трийсет и три процента от трансфектираните клетки са в горния десен квадрат, в сравнение с 8 процента. Може би известно ниво на BAFF-R експресия е необходимо за BAFF, за да се свърже с клетките. Възможно е също така да е необходим ко-рецептор за високо афинитетно взаимодействие и този рецептор да е ограничен върху 293EBN клетки.

Пример 4: Имунореципитация на flag-hBAFF чрез свързване на
BAFF-R-Fc

Този пример описва специфично взаимодействие на flag-hBAFF с BAFF-R-Fc, молекула съставена от богат на цистеин домен (CRD) на BAFF-R свързан с Fc домен от човешки IgG1.

CRD на BAFF-R е получен чрез RT-PCR от BJAB poly A+ РНК както в Пример 1, като се използва като 3' праймер олиго комплиментарността към нуклеотиди 132-152 от hBAFF-R кодиращата секвенция. Полученият PCR фрагмент се клонира в CH269, надолу от мишата IgG-каппа сигнална секвенция и нагоре от Fc частта на човешкия IgG. Този конструкт е наречен pJST538. Конструктът pJST538 или CH269 се трансфектира в 293EBNA чрез липофектамин. На 20 час след трансфекцията се събира средата, в която се намират клетките и клетъчните екстракти. Клетките се разтварят в 20 mM Tris pH 7.5/50 mM NaCl/ 0.5 % NP 40/ 0.5 % дезоксихолинова киселина и остатъците се центрофугират. Аликвота от средата в която се намират клетките и клетъчни екстракти се смесват с еднакъв обем 2 x SDS редуциращ буфер, варят се и се разделят чрез SDS-PAGE и се прехвърлят чрез Western трансфер. За да се докаже експресията, мембраната се инкубира с 1:3000 разредено мишо анти-човешко IgG, конюгирано с пероксидаза от хрян (HRP) в 5 % обезмаслено сухо мляко в TBST, на стайна температура за 30 минути и се измива с TBST. Блотовете се проявяват с ECL (Amersham) и се експонират.

Имунопреципитацията се провежда чрез инкубиране на 25 ng или от flag-hBAFF или от flag-hTWEAK с 0.5 ml от средата на 293 EBNA трансфектирани или с pJST538, или с CH269, при 4° C за 1 час при разклащане, последвано от добавяне на 30 µl Protein A-Sepharose (Pharmacia), като разклащането продължава цяла нощ. Гранулите на ProteinA-Sepharose се измиват два пъти с PBS и се ресуспендират в 2 x SDS редуциращ буфер за пробата. След SDS-PAGE и western трансфер, блотовете се инкубират с 5µg/ml анти-flag моноклонално антитяло M2 (Sigma) в 5 % обезмаслено сухо мляко в TBST, на стайна температура за 1 час. Блотовете се измива с TBST и се инкубират с 1:3000 разредено козе анти-мишо IgG, конюгирано с пероксидаза от хрян (HRP) (Jackson Immunoresearch), в 5 % обезмаслено сухо мляко в TBST, на стайна

температура за 30 минути. Блотовете се проявяват с ECL (Amersham) и се експонират.

След трансфекцията на 293EBNA клетки с pJST538, се детектира експресия на белтък, приблизително 43 kDa и в клетъчния екстракт и в клетъчната среда, чрез Western блот анализ с мишо анти-човешко IgG (Jackson ImmunoResearch), което показва, че рекомбинантният BAFF-R-Fc се експресира и секретира ефективно.

При имунопреципитатите се наблюдава ивица като резултат от инкубирането на BAFF-R-Fc и flag-hBAFF. Тази ивица директно комигрира с нанесената проба от flag-hBAFF. Нито един от другите стартове не дава сигнал, което показва, че взаимодействието между BAFF-R-Fc и flag-hBAFF е специфично.

Пример 5: Получаване на разтворими рецепторни форми:

За да се получи рецепторен инхибитор приложим при човек е необходима човешка рецепторна кДНК секвенция от извънклетъчния домен. Ако е известна мишата форма, тогава се скринират човешки кДНК библиотеки, като се използва мишата кДНК секвенция и тези манипулации се провеждат рутинно в тази област. С човешка кДНК секвенция, могат да се конструират олигонуклеотидни праймери за PCR амплифициране на извънклетъчния домен от рецептора в отсъствие на трансмембранен и вътреклетъчен домен. Типично е да се включи по-голяма част от аминокиселините между последния дисулфидно свързан "TNF домен" и трансмембранный домен. Може да варира количеството на включената "интегралната" област, за да се оптимизира афинитет на получения разтворим рецептор. Тази амплифицирана част ще е конструирана така, че да включва подходящи рестриктазни места, които ще позволят клониране в различни вектори на С-крайния Ig рекомбинантен химер. Съответно, може да се вмъкне стоп сигнал в 3' края и разтворимата форма на рецептора да

се направи без да се прибегва до използването на Ig рекомбинантен химерен подход. Получените вектори могат да се експресират в повечето използвани системи в биотехнологията, включващи дрожди, клетки на насекоми, бактерии и клетки на бозайници, като съществуват достатъчно примери за всички видове експресия. Ако е необходимо могат да се свързват различни човешки Fc домени, за да се оптимизира или елиминира FcR и взаимодействията с комплемента. Съответно, могат да се използват мутантни форми на тези Fc домени, за да се премахне избирателно FcR или взаимодействията с комплемента, или свързването на N-свързани захари с Fc домена, което има известни предимства.

Пример 6: Получаване на агонистични или антагонистични антитела:

По-горе описаните разтворими форми на рецептора могат да се използват за имунизирание на мишки и за получаване на моноклонални антитела чрез конвенционалните методи. Получените mAbs, които се идентифицират чрез ELISA методи, могат да се скринират след това за агонистична активност или като разтворими антитела или като имобилизирани върху пластмаса в различни *in vitro* клетъчни анализи. Често пъти смъртността на клетъчната линия HT29 е удобна система, тъй като е чувствителна към TNF рецепторна сигнализацията. Ако тази клетъчна линия не притежава желанния рецептор, тогава пълната дължина на рецептора може да се трансфектира стабилно в линията HT29, за да се даде възможност да се извърши цитотоксичния анализ. Съответно, тези клетки могат да се използват в Cytosensor апарат, за да се оцени дали активирането на рецептора може да причини промяна в pH, което е индикация за сигнално събитие. Семейството на TNF рецептори сигнализира добре в този диапазон и този метод не изисква познаването на действителните биологични събития, насочени от рецептора. За клинично използване, агонистичните mAbs трябва да са "наподобяващи човешките". Този метод

може да се използва също така за определяне на антагонистични mAbs. Такива mAbs ще се определят по липсата на агонистична активност и по способността да подтискат рецептор-лигандни взаимодействия, които могат да се проследят чрез ELISA, класическо свързване или BIAcore техники. Най-накрая, индукцията на хемокинова секреция от различни клетки в отговор на агонистично антигено може да се използва за скрининг анализ.

Пример 7: Скриниране на инхибитори за рецептор-лигандно взаимодействие:

Като се използва рецепторен-Ig рекомбинантен белтък, могат да се скринират всички комбинаторни библиотеки за молекули, които могат да се свързват с рецептора директно. Тези молекули след това могат да се анализират чрез ELISA анализ върху плака, като се използва рецепторен-IgG рекомбинантен белтък и разтворима форма на лиганда, за способността да инхибират рецептор-лигандното взаимодействие. Методът ELISA може да се използва директно, за скриниране на различни библиотеки от естествени продукти, и т. н. за инхибиторни съединения. Рецепторът може да се трансфектира в клетъчна линия, като линия HT29 за да се направи биологичен анализ (в този случай цитотоксичен), който след това може да се използва за скрининг анализ.

Пример 8: BAFF-R-IgG води до намаляване на броя на В-клетки в нормални мишки

Женски BALB/c мишки, на възраст осем седмици са доставени от The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Мишките (3/група) получават i. p. или PBS, или 400 µg човешки BAFF-R-huIgG1 (hBAFF-R-Ig) рекомбинантен белтък (доставен от Teresa Cachero, Biogen), или 400 µg пречистен човешки

IgG (HulgoG) (Sandoz, Basel, Switzerland) на ден - 8, - 5, - 1 и + 2. Мишките получават 100 μ l 10 % червени кръвни клетки от овца (SRBC) (Colorado Serum Company, Denver, CO) на ден 0.

В деня на убиване чрез сърдечна пункция се взема кръв в епруветки, съдържащи EDTA и червените кръвни клетки се лизират в хипотоничен буфер. Събира се също така кръв без EDTA за получаване на серум. От клетките на далака и мезентериалните лимфни възли (MLN) се приготвят клетъчни суспензии, и червените кръвни клетки се лизират в хипотоничен буфер. Провежда се поточна цитометрия, като се използва PE-конюгирано анти- CD45R/B220, анти-syndecan/CD138 и анти-B7.2, и FITC-конюгирано анти-IgM и анти-CD45R/B220. Всички mAbs са закупени от Pharmingen (San Diego, CA). Накратко, Fc рецепторите се блокират с 10 μ g/ml Fc Block (Pharmingen) за 15 минути върху лед, последвано от добавяне на PE- и FITC-конюгирани mAbs и се инкубират върху лед за 20-30 минути. Клетките се измиват 1 x и се суспендират в 0.5 % параформалдехид. Данните от клетъчната флуоресценция се получават чрез FACSCaliburTM поточен цитометър (Becton Dickinson, San Jose, CA) и се анализират като се използва CELLQuestTM софтуер (Becton Dickinson).

След третиране с hBAFF-R-Ig се наблюдава около 50 % намаляване на броя на В-клетките в периферната кръв и в изследваните периферни лимфоидни органи. B220^{high} и IgM^{low} В клетки отговарят на 23.4 % и 21.5 % от клетките при мишки, третирани респективно с PBS и анти-HuIgG, докато тази популация представлява само 9.9 % от клетките при мишки третирани с hBAFF-R-Ig. Плазматичните клетки (syndecan/CD138+) са също леко понижени с 5.7 % и 4.8 % в кръвта на мишки, третирани респективно с PBS и HuIgG, в сравнение с 3.9 % при мишки, третирани с hBAFF-R-Ig. Увеличена е експресията на B7.2 молекулата на 3.1 % и 4.5 % при B220+ клетки при мишки, третирани респективно с PBS и HuIgG, в сравнение с 1.9 % при мишки, третирани с hBAFF-R-Ig.

В далака B220^{high} В клетките намаляват значително при мишки, третирани с hBAFF-R-Ig, представляващи 18.8 %, в сравнение с 36.7 % и 40 % респективно при мишки, третирани с PBS и HuIgG. Това спадане се наблюдава и за двете IgM^{high} и IgM^{low} субпопулации (виж Таблица 8А). Не се наблюдават промени в новоформирания В клетъчен компартмент в далака, B220^{low} IgM^{high} (данните не са показани). Плазматичните клетки (syndecan/CD138+) също така леко намаляват, респективно с 3.3 % и 3.4 % присъстващи в далака при мишки третирани респективно с PBS и HuIgG, в сравнение с 2.4 % при мишки третирани с hBAFF-R-Ig.

MLN показва спадане на B220+ В клетки, като 14.1 % присъстват при мишки третирани с hBAFF-R-Ig мишки, в сравнение с 26.7 % и 35.8 % респективно при мишки третирани с PBS и HuIgG. Данните са сумирани в Таблица 8А.

Таблица 8А. В клетъчни популации от мишки¹, третирани с hBAFF-R-Ig, PBS и HuIgG

Кръв	<u>B220^{high}</u> <u>IgM^{low}</u>	Syndecan	<u>B7.2/ B220^{low}</u>
PBS	23.4 ± 5.7	5.7 ± 1.5	3.1 ± 0.5
HuIgG	21.5 ± 4.5	4.8 ± 0.9	4.5 ± 1.0
hBAFF-R-Ig	9.9 ± 1.8	3.9 ± 0.6	1.9 ± 0.5
Далак	<u>B220^{high}</u> <u>IgM^{low}</u>	<u>B220^{high}</u> <u>IgM⁺</u>	Syndecan
PBS	27.8 ± 1.6	11.9 ± 1.6	3.3 ± 0.8
HuIgG	30.5 ± 2	11.8 ± 1.0	3.4 ± 0.7

HBAFF-R-Ig	10.6 ± 0.2	8.4 ± 0.2	2.4 ± 0.2
MLN	B220 ⁺		
PBS	26.7		
HuIgG	35.8 ± 3.3		
HBAFF-R-Ig	14.1 ± 5.9		

¹ Мишките са третирани както е описано в раздел Материали и методи и данните са дадени като процент ± стандартно отклонение.

Намаленият процент на B7.2⁺ В клетки в кръвта и плазматичните клетки в кръвта и далаците hBAFF-R-Ig-третирани мишки след имунизация с SRBCs, допуска че има подтискане на В клетъчното активиране и/или зреене и възможно увеличено елиминиране на активирани В клетки. Много малък процент от антиген-специфични В клетки ще се активират и ще отговарят на всеки антиген, в случай на SRBC. Тъй като hBAFF-R-Ig третирането води до това драматично намаляване на процента на В клетките във всички изследвани тъкани, ~ 50%, то вероятно активността на hBAFF-R-Ig повлиява също така и останалите, зрели В клетки.

Следователно се счита, че BAFF-R рекомбинантният белтък може да се използва като терапевтично лекарство с клинично приложение при В-клетъчно медирани заболявания. Заболяванията включват тези, които са с автоимунна природа, като системен лупус еритематозис, myasthenia gravis, автоимунна хемолитична анемия, идиопатична тромбоцитопения пурпура, анти-фосфолипиден синдром, болест на Chaga, болест на Grave, Wegener's грануломатозис, полиартеритис нодоза и бърз прогресивен гломерулонефрит. Терапевтичното средство има също така приложение при нарушения на плазматичните

клетки, като мултитипна миелома, Waldenstrom's макроглобулинемия, Heavey-chain заболяване, първична или имуноцит-асоциирана амилоидоза и моноклонална гамопатия с неопределена значимост (MGUS). Онкологичните насоки включват В клетъчни карциноми, левкемии и лимфоми.

Пример 9: Блокиране на BAFF индуцирана В клетъчна пролиферация in vitro, чрез използване на разтворим BAFF-R

В този пример ние показваме, че разтворимият BAFF-R-hIgG1 рекомбинантен белтък е способен да блокира BAFF индуцираната В клетъчна пролиферация в миши спленоцити.

Изолят се миши спленоцити (5×10^5 клетки/ml) от Balb/c мишки и се култивират в 96 ямкови плаки в 100 μ l RPMI (Life Technologies), като е добавен 10 % фетален телешки серум (JRH), 2 mM глутамин, 100 единици/ml пеницилин и 100 mg/ml стрептомицин (Life Technologies). След това се добавят различни количества от човешки BAFF, 10 μ g/ml човешки BAFF-R; hIgG1 или човешки Ig, както и 10 μ g/ml анти-мишо антитяло, разпознаващо тежката μ верига (Jackson Immuno Research). След 48 часа култивиране, при 37° C, клетките се бележат пулсово за 24 часа с 1 μ Ci/ямка [methyl-³H] тимидин (Dupont NEN) и се събират, като се използва Tomtec (Orange, CT) клетъчен апарат за събиране. Радиоактивността се измерва в Betaplate течен сцинтилационен брояч (Pharmacia Bitech).

Фигура 8 показва резултатите от пролиферативния анализ на спленоцитите. Показани са броя (CPM) за минута включени в миши спленоцитни клетки, спрямо количеството добавен човешки BAFF реагент. Нивото на анти- μ или на рекомбинантния белтък или на контролния hIgG се поддържа константно 10 μ g/ml. Запълнените квадратчета показват нивото на пролиферация, индуцирана само от BAFF. Запълнените кръгчета показват пролиферация на клетки с BAFF и анти- μ . Кривата с празните

триъгълничета представя подтискането, което се наблюдава когато се добави BAFF-R:hIgG1BAFF с анти- μ плюс BAFF-R:hIgG1. Празните ромбчета показват подтискането, което се наблюдава при използване на човешко Ig като контрола.

Добавянето на BAFF плюс анти- μ води до пролиферация на миши спленоцити *in vitro*. Нивото на включения ^3H тимидин в клетките е значително по-високо, отколкото нивото получено при добавяне само на BAFF, или само на анти- μ към спленоцитите. Третирането на спленоцитите само с BAFF води до включване на ^3H тимидин само при много високи концентрации. Добавянето само на анти- μ не води до пролиферация. Когато се добави 10 $\mu\text{g/ml}$ човешко Ig като контрола към спленоцити с повишаващи се количества от BAFF и 10 $\mu\text{g/ml}$ анти- μ , се наблюдава умерено спадане на нивото на пролиферацията. Обратно, когато при анализа, при едни и същи условия, се добави 10 $\mu\text{g/ml}$ човешки BAFF-R:hIgG1 рекомбинантен белтък, степента на пролиферация се редуцира до нивото, наблюдавано само при BAFF третирането. Това означава, че BAFF-R:hIgG1 рекомбинантният белтък е способен да подтиска пролиферацията на спленоцитите, индуцирана от BAFF и анти- μ .

Пример 10: Блокиране на BAFF свързването към Raji клетки, чрез използване на BAFF-R:hIgG1

В този пример е описана, предварителната инкубация на BAFF с BAFF-R:hIgG1 рекомбинантен белтък, водеща до намаляване на BAFF свързването с Raji В клетъчна лимфомна линия.

В този FACS анализ, 200 ng/ml FLAC-tagged човешки BAFF се инкубира предварително или с човешки BAFF-R:hIgG1 или с човешки LT β R:hIgG1 при две разреждания, вариращи от 20 $\mu\text{g/ml}$ до 39 ng/ml или без рекомбинантен белтък, за 30 минути върху лед. Инкубацията се извършва във FACS буфер, съдържащ PBS без Ca^{2+} или Mg^{2+} плюс 10 %

FCS (JRH) и 0.05 % натриев азид. След предварителната инкубация BAFF-рекомбинантната белтъчна смес се добавя към 5×10^6 Raji (ATCC) клетки/ml. Тази инкубация продължава 30 минути върху лед и след това клетките се измиват с 2 ml FACS буфер при 4° C. За да се детектира свързания BAFF, към клетките се добавя 5 µg/ml анти-FLAG антитяло M2 (Sigma) и те се инкубират за 30 минути върху лед. Клетките се измиват отново както по-горе и след това се инкубират с 1:100 разредено PE конюгирано магарешко анти-мишо Ig (Jackson Immuno Research) за 30 минути върху лед. След като клетките се измият отново с FACS буфер, те се фиксират с 1 % параформалдехид и се отчитат чрез FACS ® (Becton Dickinson and Co.).

Фигура 9 показва резултатите от блокиращия BAFF анализ. Показани са MFI стойностите (средните стойности на флуоресцентния интензитет), получени от FACS ® анализа за свързването на BAFF с Raji клетки. Запълнените квадратчета показват данните, при които човешки BAFF-R:hIgG1 е инкубиран предварително с BAFF, преди да се свърже с клетките. Кръгчетата показват крива, получена от добавяне на неспецифичен рекомбинантен белтък, човешки LTβR:hIgG1 към BAFF. X-осите представят количеството рекомбинантен белтък, добавен към 200 ng/ml BAFF преди инкубация с клетките.

Когато не се прави предварителна инкубация на рекомбинантен белтък с човешки BAFF, средната стойност на флуоресцентния интензитет (MFI) от пробите е 80. Когато се инкубира предварително човешки LTβR:hIgG1 с BAFF, дори при 20 µg/ml, детекцията на BAFF свързването с Raji клетки е непроменено. Когато обаче човешки BAFF-R:hIgG1 се инкубира предварително с BAFF, има значително намаляване в MFI, пониско от 20-25 дори при 625 ng/ml рекомбинантен белтък. Фоновото значение на MFI за този експеримент е 7. Следователно BAFF-R:hIgG1 е много ефективен за блокиране на BAFF свързването с Raji B - клетки.

Пример 11: BAFF-R-IgG намалява лупус - подобните автоимунни нарушения в трансгенни мишки

Този пример описва ефектите на BAFF-R-Ig да намалява периферния В-клетъчен пул и да подтиска развитието на спленомегалия и нефрити.

Пет месечни BAFF трансгенни (Tg) мишки (C57BL/6) и мишо котило се използват в експеримента. BAFF Tg мишките показват лимфоцитни нарушения и автоимунен фенотип сходен за системен лупус еритематозус (Maskay et al., 1999). Този фенотип включва увеличени периферни В клетъчни популации, включващи транзитни 1 (T1) и 2 (T2), зрели (M), клетки от маргинална зона (MZ) и CD1^{high}/IgM^{high} В клетки.

Мишките получават i. p. PBS, 400 µg пречистен човешки IgG (hIg) (Sandoz, Basel, Switzerland) (3/група) или 400 µg, получени от CHO, човешки BAFF-R-huIgG1 (hBCMA-Ig) рекомбинантен белтък (2/група) в ден 0, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25, 28, 32, 35 и се убиват на 40-ия ден.

В деня на убиване, се измерват теглата на далаците и се приготвят клетъчни суспензии след лизиране на червените кръвни клетки в хипотоничен буфер. Провежда се поточна цитометрия, като се използва FITC-конюгирано анти-CD21/CD35, PE-конюгирано анти- IgD и анти-CD1, cychrom-конюгирано анти CD45R/B220 и биотин-конюгирано анти-IgM. Всички mAbs са закупени от Pharmingen (San Diego, CA). Накратко, Fc рецепторите се блокират с 10 µg/ml FC Block (Pharmingen) за 10 минути върху лед, последвано от добавяне на биотин-конюгирани mAbs за 30 минути върху лед, клетките се измиват 1 x, последвано от добавяне на FITC, PE, Cychrome-конюгирани Abs, стрептавидин APC и 10 µg/ml Fc Block. Клетките се инкубират за 30 минути върху лед, измиват се 1 x и се суспендират в 0.5 % параформалдехид. Данните от клетъчната флуоресценция се получават от FACSCalibur (поточен цитометър (Becton Dickinson, San Jose, CA) и се анализират чрез използване на CELLQuest (софтуер Becton Dickinson).

Присъствието на белтъци в мишата урина се измерва чрез използването на Multistix 10 SG реагентни стрипчета за анализ на урина (Bayer Corp., Diagnostics Division).

Резултатите са показани в Таблици 11А и 11Б по-долу.

Таблица 11А

Анализ на спленоцити от 3 месечни мишки

Общ брой клетки за далак ($\times 10^6$)

BAFF Tg Мишки	<u>T1</u>	<u>T2</u>	<u>MZ</u>	<u>Зрели</u>
816E23	9.4	18	9	91
816E33	14	30	19	170
816E99	<u>14</u>	<u>24</u>	<u>19</u>	<u>150</u>
Средна стойност	13 +/-2.6	24 +/-6	16+/-5.7	140+/-41
Котило Контроли				
816E2	5.3	5.8	3.1	73
816E4	<u>2.4</u>	<u>3.7</u>	<u>1.9</u>	<u>44</u>
Средна стойност	3.9+/-2	4.8+/-1.5	2.4+/-1	59+/-20

Далаците от 3 месечни Baff Tg мишки (n=3) и от мишо котило (n=2), се изолират и се подлагат на FACS анализ, както е описано в Материали и методи. T1, T2, M и MZ клетките са определени чрез експресия на следните повърхностни маркери (hi:high, lo:low., int:intermediate):

T1:IgD⁻, IgM^{high}, CD21^{lo}

MZ:IgD⁻, IgM^{hi}, CD21

T2:IgD⁺, IgM^{hi}, CD21^{hi}

14-03-02⁴⁰

M:IgD⁺, IgM^{lo}, CD21^{int}

Таблица 11Б

Анализ на спленоцити от 10 месечни мишки

Общ брой клетки за далак (x 10⁶)

BAFF Tg Мишки	<u>T1</u>	<u>T2</u>	<u>MZ</u>	<u>Зрели</u>
802-39	13	100	34	630
823-3-11	7.5	43	6.6	200
823-3-13	<u>3.1</u>	<u>50</u>	<u>15</u>	<u>180</u>
Средна стойност	7.9 +/-4.9	64 +/-30	19+/10	340+/-250
Котило Контроли				
823-3-22	0.7	6.5	1.4	56
802-64	0.28	5.4	1.3	38
823-14-13	<u>0.45</u>	<u>3.4</u>	<u>0.16</u>	<u>38</u>
Средна стойност	0.48+/-0.21	5.1+/-1.5	0.95+/-0.65	44+/-10

Далаците от 10 месечни Baff Tg мишки (n=3) и от мишо котило (n=3), се подлагат на FACS анализ, както е описано в Таблица 1.

След прилагане на hBAFF-R-Ig към Baff Tg мишки, популациите T1, T2, M, MZ и CD1^{high}/ IgM^{high} В клетките в далака намаляват значително, в сравнение с Baff Tg мишки, третирани с PBS и hIg, като общият брой на T1, T2, M, MZ и CD1^{high}/ IgM^{high} В клетките намалява до ниво сходно, или по-ниско от това на котилото – контроли, третирани с PBS (Фигури 10а, 10б, 10в).

BAFF-R-Ig третирането на Baff Tg мишки води до намаляване на Baff медираното автоимунно заболяване, което се вижда от наблюдението, че BAFF-R третираните мишки имат далаци с нормален размер, докато контролно-третираните Baff Tg мишки показват спленомегалия (Фигура 11). В допълнение, развитието на протеинурия, като индикатор за бъбречна дисфункция, се подтиска в BAFF-R-Ig третирани мишки, докато контролно-третираните Baff Tg мишки развиват нефрити, което е определено чрез увеличените нива на протеинурия (Фигура 12).

Baff трансгенните мишки имат силно увеличен брой периферни В клетки и нашите следващи анализи разкриха увеличение предимно на T1, T2, MZ В клетъчни субпопулации в тези мишки. Временният етап на В клетъчното развитие (T1 и T2) е контролна точка в която автореактивните В клетки предимно се елиминират. $CD1^{hi}/IgM^{high}$ В клетките, които се стремят да останат в маргиналната зона, също така се увеличават значително в Baff Tg мишки. Показано е, че тази последна популация от В клетки е главният източник на продукция на автоантитела в NZB/NZW лупусни мишки. Третирането на Baff Tg мишки с BAFF-R-Ig води до намаляване на T1, T2, MZ и $CD1^{hi}$ В клетъчни популации, до нива сходни с, или по-ниски от тези, намерени за див тип котило - контроли.

BAFF-R-Ig функционира, за да редуцира периферният В клетъчен пул и подтиска развитието на спленомегалия и нефрити. Следователно, в допълнение към неговото приложение за системен лупус еритематозис лупус нефритис, действието на BAFF-R-Ig е полезно също така за В клетъчно медираните заболявания, които по природа са автоимунни, такива като *myasthenia gravis*, автоимунна хемолитична анемия, идиопатична тромбоцитопения пурпура, анти-фосфолипиден синдром, болест на Chaga, болест на Grave, Wegener's грануломатозис, полиартеритис нодоза и бърз прогресивен гломерулонефрит. Терапевтичното средство има също така приложение при нарушения в плазматичните клетки, като мултитипна миелома, Waldenstrom's макроглобулинемия,

Heavy-chain заболяване, първична или имуноцит-асоциирана амилоидоза и моноклонална гамопатия с неопределена значимост (MGUS). Онкологичните насоки включват В клетъчни карциноми, левкемии и лимфоми.

Пример 12: Средно артериално налягане в BAFF трансгенни мишки

Този пример описва измерването на кръвно налягане в BAFF трансгенни мишки. Наблюденията проведени по време на фенотипна оценка на BAFF трансгенни мишки показва възможност за хипертензия в мишките.

Baff Tg мишки, както е описано по-горе са анестезират с кетамин. Използва се лявата каротидна артерия, като се прави разрез във врата. В каротидната артерия се вмъква катетър за измерване на кръвното налягане и честотата на сърдечната дейност. Катетърът е свързан с предавател за налягане и кръвното налягане се измерва, като се използва Gould система за приемане на данните (Po-Ne-Mah Data Acquisition system and Gould polygraph). От пулсиращата вълнообразна крива на налягането се получават систолично налягане, диастолично налягане, средно налягане и честотата на сърдечната дейност. Използвани са две групи мишки: BAFF трансгенни (n=8) и Див-тип контроли (n=9).

Фигура 13 показва средната стойност на артериално налягане (MAP, в mmHg) за двете групи. Както се вижда, BAFF трансгенните мишки имат средно MAP от 102 ± 8 mmHg. Контролните мишки имат средно MAP от 92 ± 6 mmHg. Следователно BAFF мишките показват 10 mmHg увеличение в MAP над контролите, въпреки че не се достига статистическа значимост (ANOVA).

По-подробен анализ на тези данни е представен на Фигура 14. В тази фигура, са показани резултатите при отделните животни. В дивия тип контроли (BAFF -), разпределението на данните следва типичното биномно

разпределение. Обратно, налягането в BAFF трансгенните мишки (BAFF+) изглежда че е разпределено в две групи, в една група в обхвата 120-130 mmHg и в една група в обхвата 80-90 mmHg.

Като популация BAFF трансгенните мишки имат тенденция към хипертензия, в сравнение с мишките от негативната контрола. Анализът на отделните нива на артериално налягане показва, че BAFF трансгенните мишки са разпределени в две суб-популации, една с високо кръвно налягане и една с нормално кръвно налягане. Съответно, прилагането на разтворим BAFF-R, рекомбинантен белтък или хомолог на анти тяло може да подобри ефектите на хипертензията.

Пример 13: Третиране с BAFF-R-Ig на SNF₁ мишки с установено заболяване показва развитие на тежък нефрит

Женски предразположени към лупус (SWR x NZB)F₁(SF₁) мишки, на възраст 21 седмици и с развит нефрит в средна степен (30-100 mg/dl протеинурия), получават i.p. 200 µg рекомбинантен човешки белтък BAFF-R-hIgG1 (hBCMA-Ig), човешки IgG (HuIgG) (Sandoz), или 200 µl PBS седмично за 8 седмици. Урината на всяка мишка се контролира седмично за протеинурия чрез използване на Albustix (Bayer Corp., Terrytown, NY). Протеинурия над 100 mg/dl се отчита като тежък нефрит. BAFF-R-Ig се получава от временно трансфектирани EBNA 293 клетки. Средата на 293 клетките свръхекспресиращи hBCMA-Ig се нанася в протеин А колона. Белтъкът се елуира чрез използване на 25 mM фосфат, 100 mM NaCl pH 2.8, след което се неутрализира с 1/20 обем от 0.5 M NaPO₄ pH 8.6. Избрани фракции въз основа на OD280 се използват за разделяне в SDS-PAGE гелове при редуциращи и не-редуциращи условия и за Western блот, за идентифициране на пречистения белтък.

Три седмици по-късно, третирането завършва и 50 % от мишките третирани с BAFF-R-Ig показват нефрити в тежка степен, в сравнение с 75

% и 87.5 % от мишките, които са получавали hIgG и PBS респективно (виж Фигура 15). Тези данни показват, че разтворимият BAFF рецептор, BCMA-Ig, може да функционира като блокира В клетъчно-медираното аутоимунно заболяване, като лупус нефритис, което води до забележително забавяне в развитието на болестта.

Пример14: BAFF-R-Ig третиране на нормални мишки, води до намаляване на броя на дендритните клетки(DC) в далак и до атипична локализация в далака

На женски BALB/c мишки, на възраст седем седмици (3/група) i. p. се дава или 20 µg или 50 µg BAFF-R-IgG1 (hBCMA-Ig), 50 µg човешки IgG (hIgG) или 100 µl PBS 1 път седмично за 4 седмици. Рекомбинантният белтък hBCMA-Ig се пречиства от културалната супернатанта на стабилно трансфектирана CHO клетъчна линия. Далаците се получават на 8 ден след последната инжекция и се смилат с колагеназа (Sigma cat. # C-5138) за един час, при 37° C. Приготвя се клетъчна суспензия и RBCs се лизират в хипотоничен буфер и клетките се измиват 3 пъти с PBS. Приготвят се спленоцити за поточен цитометричен анализ, чрез оцветяване на клетките с анти-CD11c-биотин, последван от стрептавидин-APC, анти-CD8a-cychrom и анти-CD4-FITC за оценка на DC популациите.

В отделен експеримент на женски BALB/c (N=3) i. p. се дава 100 µg hBCMA-Ig 1 път седмично за 4 седмици, след което далаците се замразяват в OCT, като се използва 2-метил бутан, охладен на CO₂. Правят се криосрези и се фиксират в ацетон. Срезите се инкубират с анти-CD11c-биотин, последван от стрептавидин-AP и субстрат BCIP (Pierce), за визуализиране на DCs, mAb MOMA-1, последвано от анти-плъщо IgG-HRP (Jackson Immuno Research) и субстрат 3,3' диаминобензидин (Sigma, St. Louis MO, Cat. # D-1293), за визуализиране на металофилни макрофаги и анти-CD35-биотин, последван от стрептавидин AP и субстрат (Alkaline

Phosphatase Substrate Kit I, Vector cat # SK-5100), за визуализиране на фоликулярните дендритни клетки (FDC).

Мишките третирани *in vivo* или с 20 μg или с 50 μg BCMA-Ig един път седмично за 4 седмици показват значително отклонение ($p < 0.05$ чрез Student's test) в далачните CD11c⁺ DCs, в сравнение с HuIgG и PBS третираните контроли. Това отклонение се вижда при всички изследвани CD11c⁺ DC популации: CD8a-CD4⁻, CD8a⁺CD4⁻ и CD8a-CD4⁺ (Фигура 16, Таблица 14A).

Таблица 14A. Третирането с BAFF-R-Ig води до намаляване на броя на далачните DCs

	PBS	HuIgG	20 μg BCMA-Ig	50 μg BCMA-Ig
	Среден брой CD11 ⁺ DCs ($\times 10^6$) $\pm$ SD			
CD8a-CD4 ⁺	0.81 $\pm$ 0.15	0.49 $\pm$ 0.07	0.26 $\pm$ 0.04	0.35 $\pm$ 0.05
CD8a ⁺ CD4 ⁻	0.36 $\pm$ 0.02	0.35 $\pm$ 0.07	0.16 $\pm$ 0.02	0.2 $\pm$ 0.02
CD8a-CD4 ⁺	0.92 $\pm$ 0.02	0.84 $\pm$ 0.15	0.4 $\pm$ 0.06	0.55 $\pm$ 0.04

Това отклонение в далачните DCs, които са критични антиген представящи клетки, може да повлияе В клетъчното активиране, зрееенето и хуморалния имунитет.

Правят се срези от замразени далаци от мишки, както е описано в Материали и методи. BCMA-Ig-третираните мишки показват модел на атипична DC локализация, когато се оцветяват с анти-CD11c. DCs нормално се локализируют в Т клетъчната област на бялата пулпа и в маргиналната зона, като се концентрират в каналите, свързани с

маргиналната зона. Обаче е намерено, че DCs от BCMA-Ig третираните мишки обкръжаващи периметъра на маргиналната зона и част от тях, вероятно са способни да мигрират по-нататък в бялата пулпа (данните не са показани). Следователно, блокирането на BAFF/BAFF-R взаимодействието с разтворим BAFF рецептор, изглежда може да възпрепятства локализацията на DCs, което може да повлияе на тяхната способност да функционират като антиген представящи клетки, като по този начин повлияват В клетъчното активиране, зреене и хуморален имунитет. Освен това, в далаците на BCMA-Ig третираните мишки липсват CD35⁺ FDCs, което е определено имунохистохимично (данните не са посочени). Тъй като FDCs функционират за да представят антигена до В клетките в зародишните центрове (GC), липсата на такива клетки може да има пагубен ефект върху структурата на GC и афинитета на В клетъчното зреене.

За специалистите в областта е ясно, че могат да се правят различни модификации и различни варианти в полипептидите, съставите и методите от настоящото изобретение, без да се отклоняват от духа и обхвата на изобретението. Следователно, има се пред вид, че настоящото изобретение покрива модификациите и вариациите от това изобретение са осигурени в обхвата на приложените претенции и техните еквиваленти.

ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Метод за подтискане на В клетъчен растеж в животни, характеризиращ се с това, че включва етап на прилагане на терапевтично ефективно количество от състав, избран от групата съставена от:

- а) BAFF-R полипептид или негов фрагмент;
- б) химерна молекула, включваща BAFF-R-полипептид или негов фрагмент, свързан с хетероложна аминокиселинна секвенция; и
- в) хомолог на анти-BAFF-R антитяло.

2. Метод за подтискане на продукцията на имуноглобулин в животно, характеризиращ се с това, че включва етап на прилагане на терапевтично ефективно количество от състав, избран от групата съставена от:

- а) BAFF-R полипептид или негов фрагмент;
- б) химерна молекула, включваща BAFF-R-полипептид или негов фрагмент, свързан с хетероложна аминокиселинна секвенция; и
- в) хомолог на анти-BAFF-R антитяло.

3. Метод за подтискане на индуциран от дендритни клетки В клетъчен растеж и зреене в животно, характеризиращ се с това, че включва етап на прилагане на терапевтично ефективно количество от състав, избран от групата съставена от:

- а) BAFF-R полипептид или негов фрагмент;
- б) химерна молекула, включваща BAFF-R-полипептид или негов фрагмент, свързан с хетероложна аминокиселинна секвенция; и
- в) хомолог на анти-BAFF-R антитяло.

4. Метод за лечение на автоимунно заболяване, характеризиращ се с това, че включва етап на прилагане на терапевтично ефективно количество от състав, избран от групата съставена от:

- а) BAFF-R полипептид или негов фрагмент;
- б) химерна молекула, включваща BAFF-R-полипептид или негов фрагмент, свързан с хетероложна аминокиселинна секвенция; и
- в) хомолог на анти-BAFF-R антитяло.

5. Метод за лечение на хипертензия в животно, характеризиращ се с това, че включва етап на прилагане на терапевтично ефективно количество от В клетъчен растежен инхибитор, избран от групата съставена от:

- а) BAFF-R полипептид или негов фрагмент;
- б) химерна молекула, включваща BAFF-R-полипептид или негов фрагмент, свързан с хетероложна аминокиселинна секвенция; и
- в) хомолог на анти-BAFF-R антитяло.

6. Метод за лечение на бъбречни нарушения в животно, характеризиращ се с това, че включва етап на прилагане на терапевтично ефективно количество от В клетъчен растежен инхибитор, избран от групата съставена от:

- а) BAFF-R полипептид или негов фрагмент;
- б) химерна молекула, включваща BAFF-R-полипептид или негов фрагмент, свързан с хетероложна аминокиселинна секвенция; и
- в) хомолог на анти-BAFF-R антитяло.

7. Метод за лечение на В-клетъчни лимфо-пролиферативни нарушения, характеризиращ се с това, че включва етап на прилагане на терапевтично ефективно количество от В клетъчен растежен инхибитор, избран от групата съставена от:

- а) BAFF-R полипептид или негов фрагмент;
- б) химерна молекула, включваща BAFF-R-полипептид или негов фрагмент, свързан с хетероложна аминокиселинна секвенция; и

в) хомолог на анти-BAFF-R антитяло.

8. Метод съгласно Претенции от 1 до 7, характеризиращ се с това, че BAFF-R полипептида е разтворим.

9. Метод съгласно Претенция 8, характеризиращ се с това, че разтворимия BAFF-R полипептид включва BAFF-R извънклетъчен домен.

10. Метод съгласно Претенция 9, характеризиращ се с това, че BAFF-R извънклетъчният домен е свързан с имуноглобулин.

11. Метод съгласно Претенции от 1 до 7, характеризиращ се с това, че BAFF-R полипептидът е избран от групата съставена от :

а) изолирана нативна BAFF-R полипептидна секвенция, включваща аминокиселинни остатъци от 1 до 184 от SEQ ID NO:1 или неин фрагмент;

б) изолиран BAFF-R-полипептид, притежаващ поне 80 % идентична аминокиселинна последователност с нативната секвенция на BAFF-R-полипептида, включващ аминокиселинни остатъци от 1 до 184 от SEQ ID NO:1 или неин фрагмент;

в) изолиран BAFF-R-полипептид, притежаващ поне 90 % идентична аминокиселинна последователност с нативната секвенция на BAFF-R-полипептида, включващ аминокиселинни остатъци от 1 до 184 от SEQ ID NO:1 или неин фрагмент;

г) изолиран BAFF-R-полипептид, включващ аминокиселинни остатъци от 1 до 51 от SEQ ID NO:1 или неин фрагмент; и

д) изолиран BAFF-R-полипептид, включващ аминокиселинни остатъци от 8 до 41 от SEQ ID NO:1 или неин фрагмент;

12. Метод съгласно Претенции от 1 до 7, характеризиращ се с това, че хомологът на анти-BAFF-R антитяло е моноклонално антитяло.

13. Метод съгласно Претенции от 1 до 7, характеризиращ се с това, че хомологът на анти-BAFF-R антитяло включва BCMA-IgG.

14. Метод съгласно Претенции от 1 до 7, характеризиращ се с това, че животното е бозайник.

15. Метод съгласно Претенция 14, характеризиращ се с това, че бозайникът е човек.

16. Метод за лечение, супресия или промяна на имунен отговор, включващ сигнален път между BAFF-R и BAFF, характеризиращ се с това, че включва етап на прилагане на терапевтично ефективно количество от средство, способно да възпрепятства свързването между BAFF-R и BAFF.

17. Метод за подтискане на възпаление, характеризиращ се с това, че включва етап на прилагане на терапевтично ефективно количество от анти тяло, специфично за BAFF-R или негов активен фрагмент.

18. Метод за подтискане на възпаление, характеризиращ се с това, че включва етап на прилагане на терапевтично ефективно количество от анти тяло, специфично за BAFF-R или негов епитоп.

19. Фармацевтичен състав, характеризиращ се с това, че включва терапевтично ефективно количество от изолиран BAFF-R полипептид или негов фрагмент и фармацевтично приемлив носител.

20. Фармацевтичен състав съгласно Претенция 19, характеризиращ се с това, че изолираният BAFF-R полипептид е избран от групата, съставена от:

а) изолирана нативна BAFF-R полипептидна секвенция, включваща аминокиселинни остатъци от 1 до 184 от SEQ ID NO:1 или неин фрагмент;

б) изолиран BAFF-R-полипептид, притежаващ поне 80 % идентична аминокиселинна последователност с нативната секвенция на BAFF-R-полипептида, включващ аминокиселинни остатъци от 1 до 184 от SEQ ID NO:1 или неин фрагмент;

в) изолиран BAFF-R-полипептид, притежаващ поне 90 % идентична аминокиселинна последователност с нативната секвенция на BAFF-R-полипептида, включващ аминокиселинни остатъци от 1 до 184 от SEQ ID NO:1 или неин фрагмент;

г) изолиран BAFF-R-полипептид, включващ аминокиселинни остатъци от 1 до 51 от SEQ ID NO:1 или неин фрагмент; и

14-03-00

д) изолиран BAFF-R-полипептид, включващ аминокиселинни остатъци от 8 до 41 от SEQ ID NO:1 или неин фрагмент;

21. Фармацевтичен състав съгласно Претенция 19, характеризиращ се с това, че BAFF-R полипептидният фрагмент включва BAFF-R извънклетъчен домен свързан с имуноглобулин.

14.03.02

A080pct.txt

СПИСК НА СЕКВЕНЦИТЕ

<110> MacKay, Fabienne
Browning, Jeffrey
Ambrose, Christine
Tschopp, Jurg
Schneider, Pascal
Thompson, Jeffrey
Biogen, Inc.
Apotech R&D S.A.

<120> Вaф рецептор (BCMA),
имунорегулаторно средство.

<130> A080PCT

<140> PCT/US00/22507

<141> 2000-08-16

<150> 60/149,378

<151> 1999-08-17

<150> 60/181,684

<151> 2000-02-11

<150> 60/183,536

<151> 2000-02-18

<160> 8

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 184

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 1

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	

14.03.02

A080pct.txt

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	Leu	Ser	Ala	Thr	Glu	
				165					170					175	
Ile	Glu	Lys	Ser	Ile	Ser	Ala	Arg								
			180												

<210> 2

<211> 552

<212> DNA

<213> homo sapien

<400> 2

```

atgttgcaga tggctgggca gtgctcccaa aatgaatatt ttgacagttt gttgcatgct
60
tgcatacctt gtcaacttcg atgttcttct aatactcctc ctctaacatg tcaggttatt
120
gtaatgcaag tgtgaccaat tcagtgaag gaacgaatgc gattctctgg acctgtttgg
180
gactgagctt aataatttct ttggcagttt tcgtgcta gtttttgcta aggaagataa
240
gctctgaacc attaaaggac gagtttaaaa acacaggatc aggtctcctg ggcattggcta
300
acattgacct ggaaaagagc aggactggtg atgaaattat tctccgagag gcctcgagta
360
cacggtggaa gaatgcacct gtgaagactg catcaagagc aaaccgaagg tcgactctga
420
ccattgcttt ccaactcccag ctatggagga aggcgcaacc attctgtcac cacgaaaacg
480
aatgactatt gcaagagcct gccagctgct ttgagtgcta cggagataga gaaatcaatt
540
tctgctaggt aa
552

```

<210> 3

<211> 207

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 3

Met	Asp	Thr	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Pro	Gly	Ser
1				5				10					15		
Thr	Gly	Met	Leu	Gln	Met	Ala	Gly	Gln	Cys	Ser	Gln	Asn	Glu	Tyr	Phe
			20					25					30		
Asp	Ser	Leu	Asp	Val	Thr	Met	Leu	Gln	Met	Ala	Gly	Gln	Cys	Ser	Gln

14.03.02

A080pct.txt

Asn	Glu	Tyr	Phe	Asp	Ser	Leu	Leu	His	Ala	Cys	Ile	Pro	Cys	Gln	Leu
50						55					60				
Arg	Cys	Ser	Ser	Asn	Thr	Pro	Pro	Leu	Thr	Cys	Leu	His	Ala	Cys	Ile
65					70					75					80
Pro	Cys	Gln	Leu	Arg	Cys	Ser	Ser	Asn	Thr	Pro	Pro	Leu	Thr	Cys	Gln
				85					90					95	
Arg	Tyr	Cys	Asn	Ala	Ser	Val	Thr	Asn	Ser	Val	Lys	Gly	Gln	Arg	Tyr
			100					105					110		
Cys	Asn	Ala	Ser	Val	Thr	Asn	Ser	Val	Lys	Gly	Val	Asp	Lys	Thr	His
		115					120					125			
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
	130					135					140				
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
145					150					155					160
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu
				165				170						175	
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
			180					185					190		
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Tyr	Val	Val	Ser	Val	
		195					200						205		

<210> 4
 <211> 540
 <212> DNA
 <213> homo sapien

<400> 4
 atggagacag acacactcct gttatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccactggt
 60
 gacgtcacga tggtgcagat ggctgggcag tgctcccaaa atgaatattt tgacagtttg
 120
 ttgcatgctt gcataccttg tcaacttcga tggtcttcta atactcctcc tctaacatgt
 180
 cagcgttatt gtaatgcaag tgtgaccaat tcagtgaaag gagtcgacaa aactcacaca
 240
 tgccccaccgt gccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttctt cttcccccca
 300
 aaaccaagg acaccctcat gatctcccg gaccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac
 360
 gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat
 420
 aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc
 480
 ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac
 540

<210> 5
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> homo sapien

14.03.02
A080pct.txt

<400> 5

```

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

```

<210> 6

<211> 369

<212> DNA

<213> homo sapien

<400> 6

```

aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa
 60
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg
120
acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg
180
cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgttgg actccgacgg ctctttcttc
240
ctctacagca agctcacctg ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc
300
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccc
360
gggaaatga
369

```

<210> 7

<211> 184

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 7

```

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

```


14.03.00

A080pct.txt

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> 8
 <211> 995
 <212> DNA
 <213> Homo Sapien

<400> 8
 aagactcaaa cttagaaact tgaattagat gtggtattca aatccttacg tgccgcgaag
 60
 acacagacag cccccgtaag aaccacgaa gcaggcgaag ttcattgttc tcaacattct
 120
 agtgctctt gctgcatttg ctctggaatt cttgtagaga tattacttgt ccttccagge
 180
 tgttctttct gtagctccct tgttttcttt ttgtgatcat gttgcagatg gctgggcagt
 240
 gctcccaaaa tgaatatttt gacagtttgt tgcattgctt cataccttgt caacttcgat
 300
 gttcttctaa tactcctcct ctaacatgtc agcgttattg taatgcaagt gtgaccaatt
 360
 cagtgaaagg aacgaatgcg attctctgga cctgtttggg actgagctta ataatttctt
 420
 tggcagtttt cgtgctaatt tttttgctaa ggaagataag ctctgaacca ttaaaggacg
 480
 agtttaaaaa cacaggatca ggtctcctgg gcatggctaa cattgacctg gaaaagagca
 540
 ggactggtga tgaaattatt cttccgagag gcctcgagta cacggtggaa gaatgcacct
 600
 gtgaagactg catcaagagc aaaccgaagg tcgactctga ccattgcttt cactcccag
 660
 ctatggagga aggcgcaacc attcttgtca ccacgaaaac gaatgactat tgcaagagcc

14.03.02

A080pct.txt

720

tgccagctgc ttgagtgct acggagatag agaaatcaat ttctgctagg taattaacca
780

tttcgactcg agcagtgcca ctttaaaaat cttttgtcag aatagatgat gtgtcagatc
840

tctttaggat gactgtattt ttcagttgcc gatacagctt ttgtcctct aactgtggaa
900

actctttatg ttagatatat ttctctaggt tactgttggg agcttaatgg tagaaacttc
960

cttggtttca tgattaaagt cttttttttt cctga
995

14.03.00

1 / 19

Фигура 1

```

SER 121 1 ATG TTG CAG ATG GCT GGG CAA TGC TCC CAA AAT GAA TAT TTT GAC AGT TTG TTG CAT GCT
Seq 1 1 M L Q M A G Q C S Q N E Y F D S L L H A
61 TGC ATA CCT TGT CAA CTT CGA TGT TCT TCT AAT ACT OCT OCT CTA ACA TGT CAG CGT TAT
21 C I P C Q L R C S S N T P P L T C Q R Y
121 TGT AAT GCA AGT GTG ACC AAT TCA GTG AAA GGA ACG AAT GCG ATT CTC TGG ACC TGT TTG
41 C N A S V T N S V K G T N A I L W T C L
181 GGA CTG AGC TTA ATA ATT TCT TTG GCA GTT TTC GTG CTA ATG TTT TTG CTA AGG AAG ATA
61 G L S L I I S L A V F V L M F L L R K I
241 AGC TCT GAA OCA TTA AAG GAC GAG TTT AAA AAC ACA GGA TCA GGT CTC CTG GGC ATG GCT
81 S S E P L K D E F K N T G S G L L G M A
301 AAC ATT GAC CTG GAA AAG AGC AGG ACT GGT GAT GAA ATT ATT CTT CCG AGA GGC CTC GAG
101 N I D L E K S R T G D E I I L P R G L E
361 TAC ACG GTG GAA GAA TGC ACC TGT GAA GAC TGC ATC AAG AGC AAA CCG AAG GTC GAC TCT
121 Y T V E E C T C E D C I K S K P K V D S
421 GAC CAT TGC TTT OCA CTC OCA GCT ATG GAG GAA GGC GCA ACC ATT CTT GTC ACC ACG AAA
141 D H C F P L P A M E E G A T I L V T T K
481 ACG AAT GAC TAT TGC AAG AGC CTG OCA GCT GCT TTG AGT GCT ACG GAG ATA GAG AAA TCA
161 T N D Y C K S L P A A L S A T E I E K S
541 ATT TCT GCT AGG TAA
181 I S A R .

```

Фигура 2

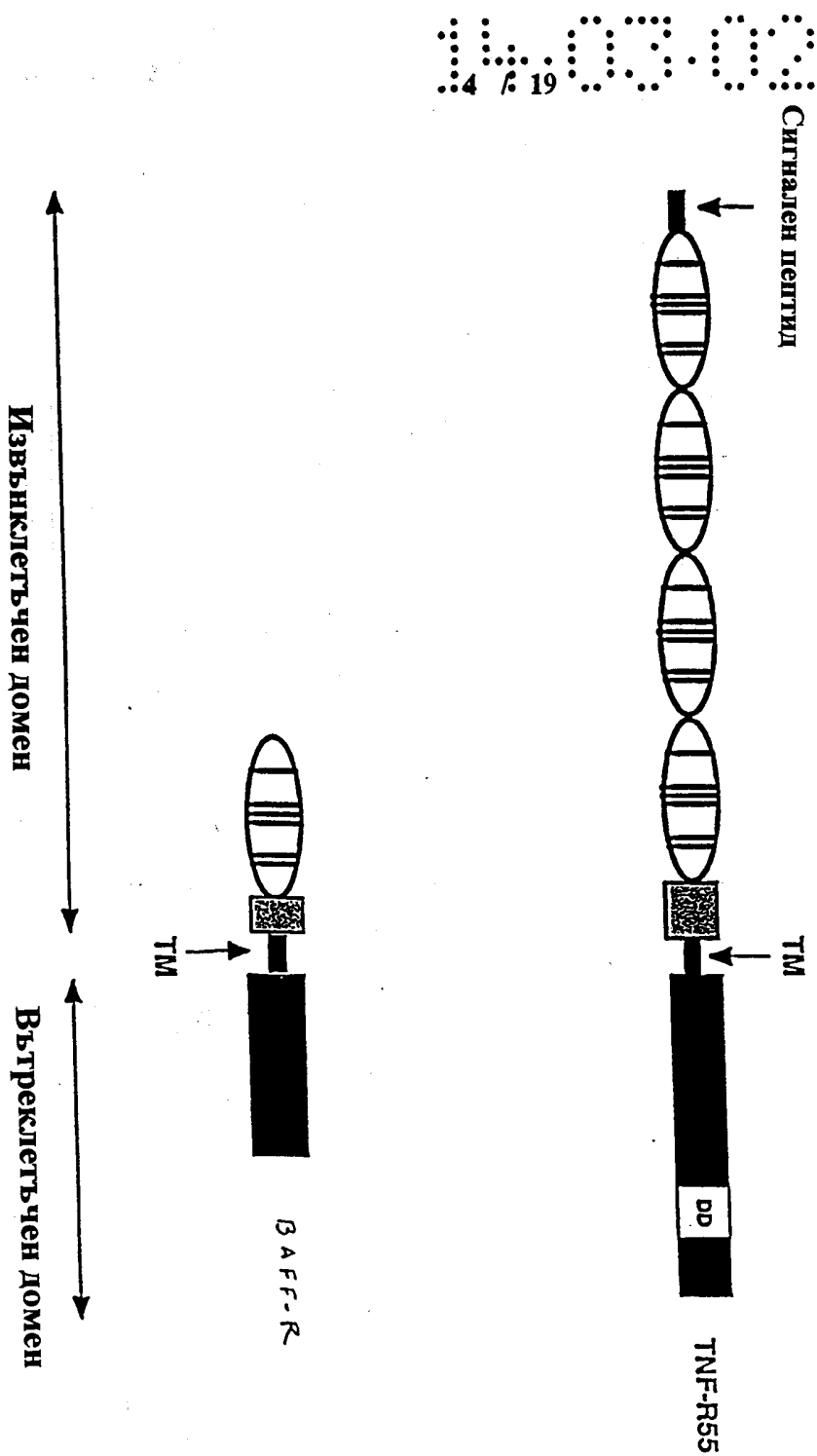
1 ATG GAG ACA GAC ACA CTC CAG TTA TGG GTG CTG CTG CTC TGG GTT CCA GGT TOC ACT GGT
1P
50P 1P M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
2P 3 61 GAC GTC ACG ATG TTG CAG ATG GCT GGG CAG TGC TOC CAA AAT GAA TAT TTT GAC AGT TTG
1P M L Q M A G Q C S Q N E Y F D S L
21P D V T M L Q M A G Q C S Q N E Y F D S L
121 TTG CAT GCT TGC ATA CCT TGT CAA CTT CGA TGT TCT TCT AAT ACT CCT OCT CTA ACA TGT
18P L H A C I P C Q L R C S S N T P P L T C
41P L H A C I P C Q L R C S S N T P P L T C
181 CAG CGT TAT TGT AAT GCA AGT GTG ACC AAT TCA GTG AAA GGA GTC GAC AAA ACT CAC ACA
38P Q R Y C N A S V T N S V K G
61P Q R Y C N A S V T N S V K G V D K T H T
241 TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA
81P C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P
301 AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TOC CCG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC
101P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D
361 GTG AGC CAC GAA GAC OCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT
121P V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H
421 AAT GCC AAG ACA AAG CCG CCG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC
141P N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V
481 CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TOC AAC
161P L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N
541 AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TOC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA
181P K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E
601 CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TOC CCG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG
201P P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L
661 ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG
221P T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G
721 CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG OCT CCC GTG TTG GAC TOC GAC GGC TOC TTC TTC
241P Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F
781 CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC
261P L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C
841 TOC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TOC CTG TCT CCC
281P S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P
901 GGG AAA TGA
301P G K .

Фигура 3.

1 CTTAGAAACT TGAATTAGA _____ AT GTGGTATTCA AATCCTTAGG TGGGOGAAG
 2 OOOOOGTAAG AACCCAAGG _____ AAA GCAGGOGAAG TTCATTGTTC TCAACATTCT
 EcoRI _____ RI
 3 GCTGCATTG CTTCTGGAAT _____ TT CTGTAGAGA TATTACTTGT CCTTCCAGGC
 fcl _____ BclI
 4 GTAGCTCOCT TGTTTTCTT _____ TTT TTGTGATCAT GTTGCAGATG GCTGGGCAGT
 1 M L Q M A G Q
 SspI SphI HincII
 5 TGAATATTTT GACAGTTTG _____ TTT TGCATGCTTG CATACTTGT CAACTTCGAT
 V E Y F D S L L H A C I P C Q L R
 PclI
 AIIII
 6 TACTOCTOCT CTAACATGT _____ TTT AGCGTTATTG TAATGCAAGT GTGAACAATT
 N T P P L T C Q R Y C N A S V T N
 BsmFI
 7 AAGGAATGOG ATTCTCTGG _____ GGA CCTGTTTGGG ACTGAGCTTA ATAATTTCTT
 G T N A I L W T C L G L S L I I S
 T CGTGCTAATG TTTTGTCTA _____ GAA GGAAGATAAG CTCTGAACCA TTAAGGAGC
 F V L M F L L R K I S S E P L K D
 AlwI BsaI
 8 CACAGGATCA GGTCTOCTG _____ GGG GCATGGCTAA CATTGACCTG GAAAAGAGCA
 N T G S G L L G M A N I D L E K S
 XmnI S: StuI XhoI
 9 TGAATTTATT CTTCCGAGG _____ GAG GCCTCGAGTA CAAGGTGGAA GAATGCACCT
 D E I I L P R G L E Y T V E E C T
 Sall
 HincII
 AccI
 10 CATCAAGAGC AAAOOGAAG _____ GGG TGGACTCTGA CCATTGCTTT CCACTCCCAG
 C I K S K P K V D S D H C F P L P
 A AGGOGCAACC ATTCTGTG _____ GCA CCAAGAAAAC GAATGACTAT TGCAAGAGCC
 E G A T I L V T T K T N D Y C K S
 11 TTTGAGTGCT ACGGAGATA _____ TAG AGAAATCAAT TTCTGCTAGG TAATTAACCA
 A L S A T E I E K S I S A R
 I DraI BglII
 12 AGCAGTGCCA CTTTAAAAA _____ AAT CTTTGTGTCAG AATAGATGAT GTGTGAGATC
 T GACTGTATTT TTCAGTTGC _____ GGC GATACAGCTT TTTGTCTCT AACTGTGGAA
 Styl
 13 TTAGATATAT TTCTCTAGG _____ GGT TACTGTGGG AGCTTAATGG TAGAAACTTC
 14 TGATTAAAGT CTTTPTTTT _____ TTT CCTGA

Фигура 4

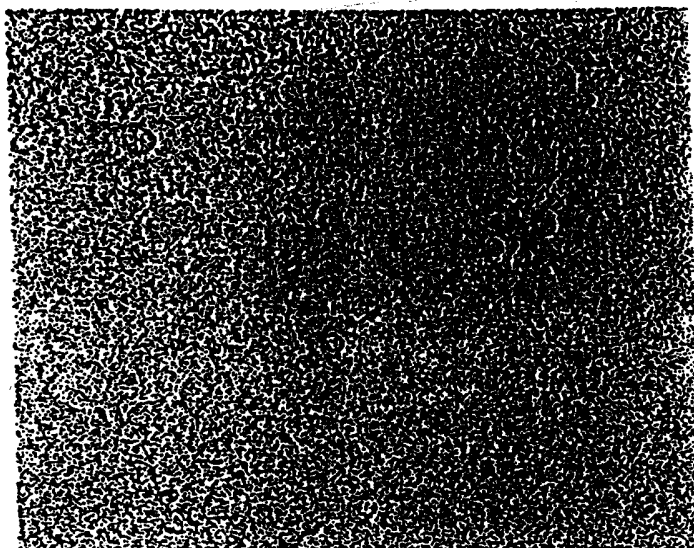
Структурно сравнение между TNF-R55 и BAFF-R



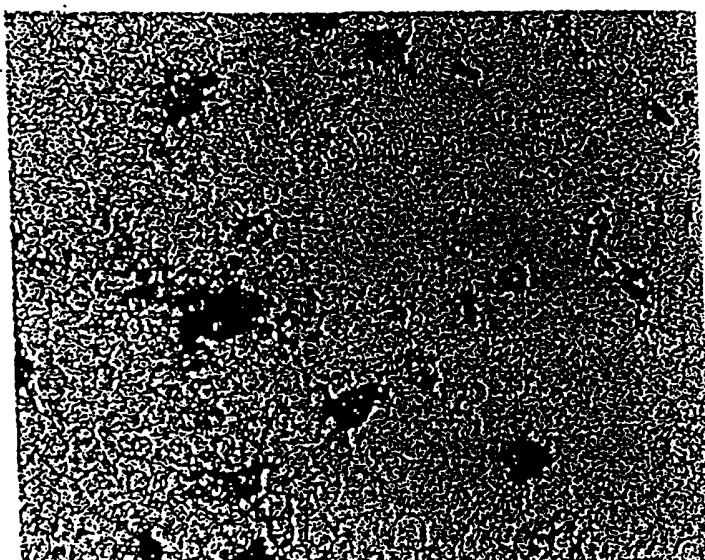
14.03.02
..5 19

Фигура 5

A

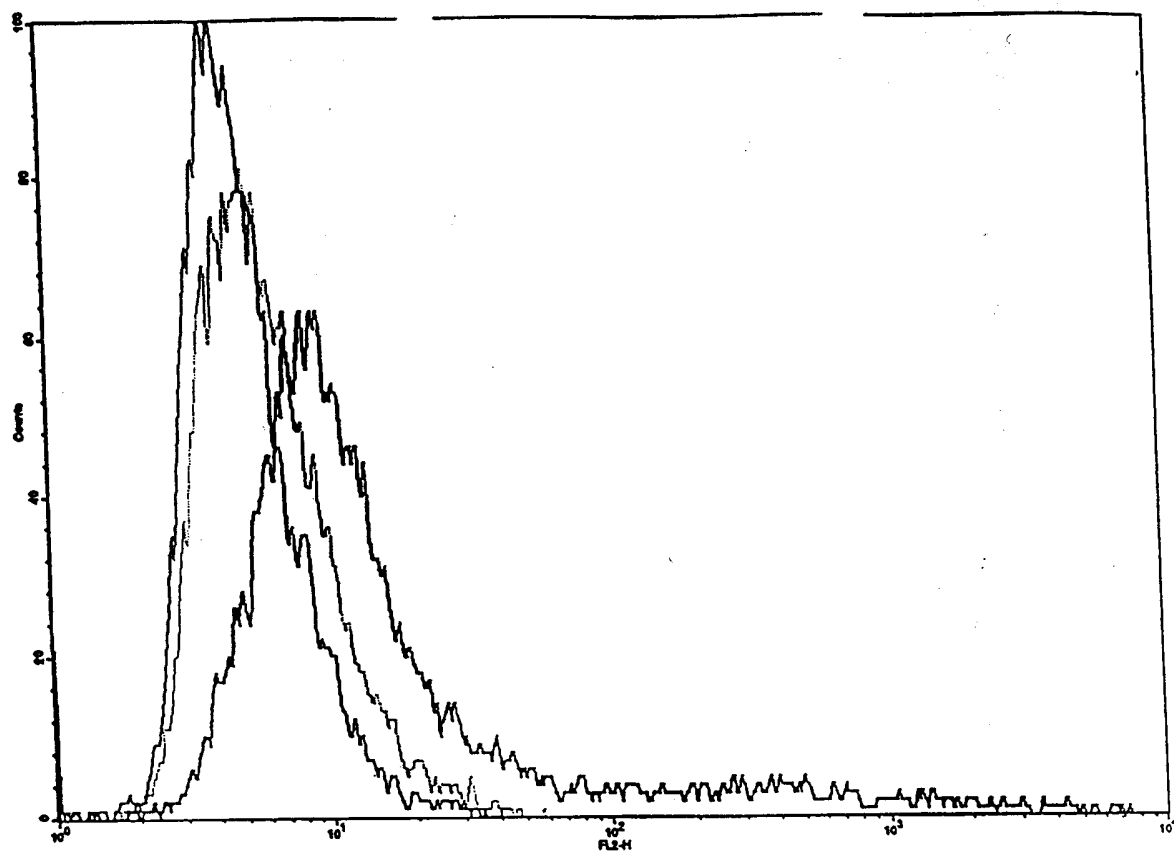


B



14.03.02
6 / 19

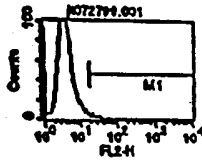
Фигура 6а



14-03-03

7 / 19

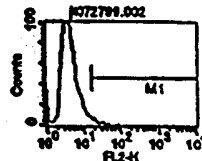
Фигура 66



File: J072799.001
Acquisition Date: 27-Jul-99
Gated Events: 10000
X Parameter: FL2-H (Log)

Histogram Statistics
Data Units: Linear Values
Gate: No Gate
Total Events: 10000

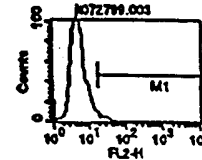
Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median
M1	1	9910	10000	100.00	100.00	4.26	3.80	61.34	3.65
M1	17	9910	65	0.65	0.65	23.23	22.44	30.37	20.35



File: J072799.002
Acquisition Date: 27-Jul-99
Gated Events: 10000
X Parameter: FL2-H (Log)

Histogram Statistics
Log Data Units: Linear Values
Gate: No Gate
Total Events: 10000

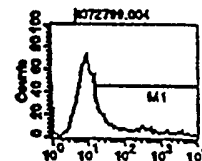
Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median
M1	1	9910	10000	100.00	100.00	4.61	4.11	61.38	3.80
M1	17	9910	70	0.70	0.70	22.88	21.96	34.34	19.63



File: J072799.003
Acquisition Date: 27-Jul-99
Gated Events: 10000
X Parameter: FL2-H (Log)

Histogram Statistics
Log Data Units: Linear Values
Gate: No Gate
Total Events: 10000

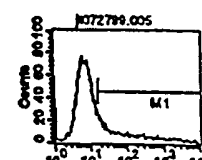
Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median
M1	1	9910	10000	100.00	100.00	5.51	4.83	68.41	4.06
M1	17	9910	130	1.30	1.30	23.55	22.96	23.39	22.57



File: J072799.004
Acquisition Date: 27-Jul-99
Gated Events: 10000
X Parameter: FL2-H (Log)

Histogram Statistics
Log Data Units: Linear Values
Gate: No Gate
Total Events: 10000

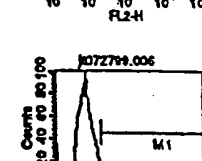
Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median
M1	1	9910	10000	100.00	100.00	108.24	15.40	458.27	10.27
M1	17	9910	2785	27.85	27.85	306.10	85.21	243.61	45.32



File: J072799.005
Acquisition Date: 27-Jul-99
Gated Events: 10000
X Parameter: FL2-H (Log)

Histogram Statistics
Log Data Units: Linear Values
Gate: No Gate
Total Events: 10000

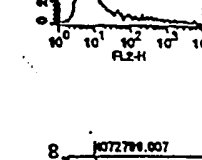
Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median
M1	1	9910	10000	100.00	100.00	72.53	11.42	516.47	7.34
M1	17	9910	2054	20.54	20.54	324.52	68.36	239.37	61.80



File: J072799.006
Acquisition Date: 27-Jul-99
Gated Events: 10000
X Parameter: FL2-H (Log)

Histogram Statistics
Log Data Units: Linear Values
Gate: No Gate
Total Events: 10000

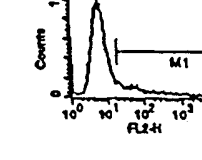
Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median
M1	1	9910	10000	100.00	100.00	51.15	9.41	566.88	6.57
M1	17	9910	1673	16.73	16.73	272.40	81.87	244.63	54.25



File: J072799.007
Acquisition Date: 27-Jul-99
Gated Events: 10000
X Parameter: FL2-H (Log)

Histogram Statistics
Log Data Units: Linear Values
Gate: No Gate
Total Events: 10000

Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median
M1	1	9910	10000	100.00	100.00	25.58	7.74	576.94	5.94
M1	17	9910	1313	13.13	13.13	161.35	60.77	246.67	42.94



File: J072799.008
Acquisition Date: 27-Jul-99
Gated Events: 10000
X Parameter: FL2-H (Log)

Histogram Statistics
Log Data Units: Linear Values
Gate: No Gate
Total Events: 10000

Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median
M1	1	9910	10000	100.00	100.00	12.39	6.54	405.32	5.47
M1	17	9910	476	4.76	4.76	76.84	43.41	145.84	23.06



File: J072799.009
Acquisition Date: 27-Jul-99
Gated Events: 10000
X Parameter: FL2-H (Log)

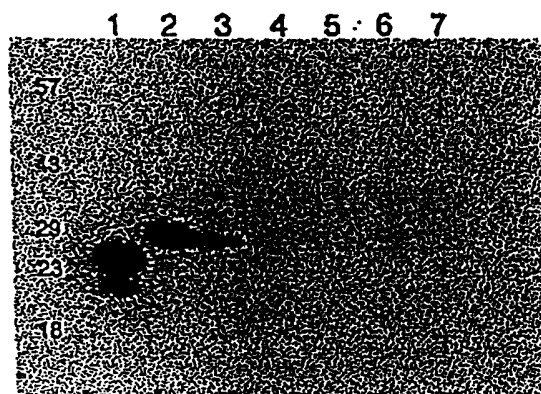
Histogram Statistics
Log Data Units: Linear Values
Gate: No Gate
Total Events: 10000

Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median
--------	------	-------	--------	---------	---------	------	----------	----	--------

14.03.02

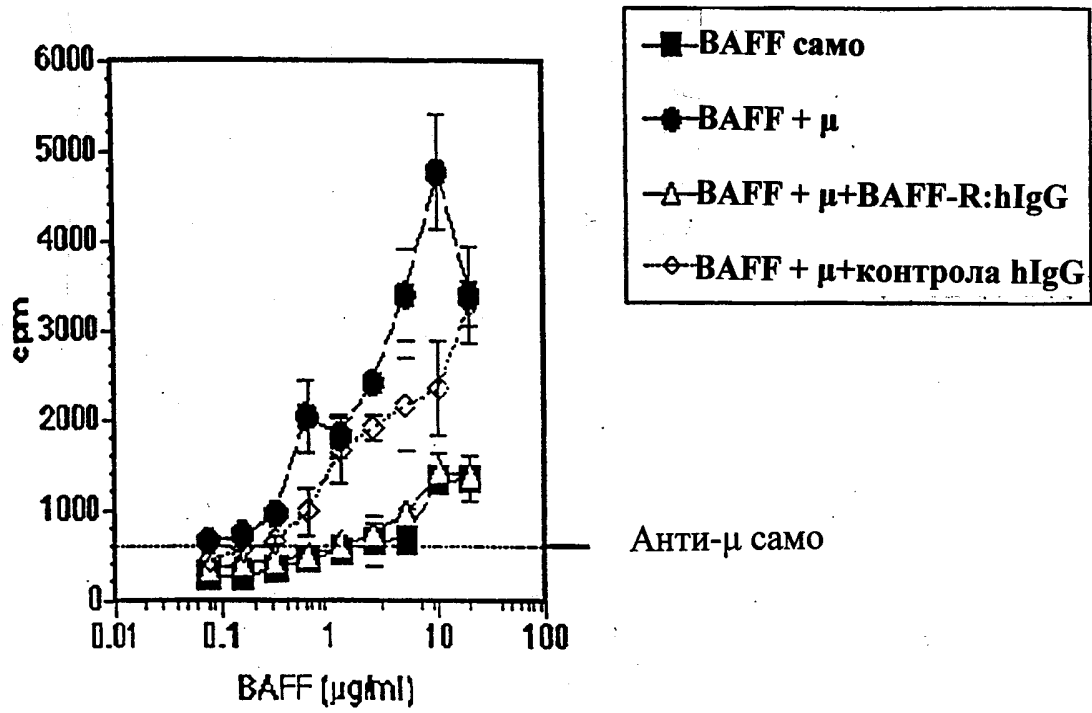
8 / 19

Фигура 7



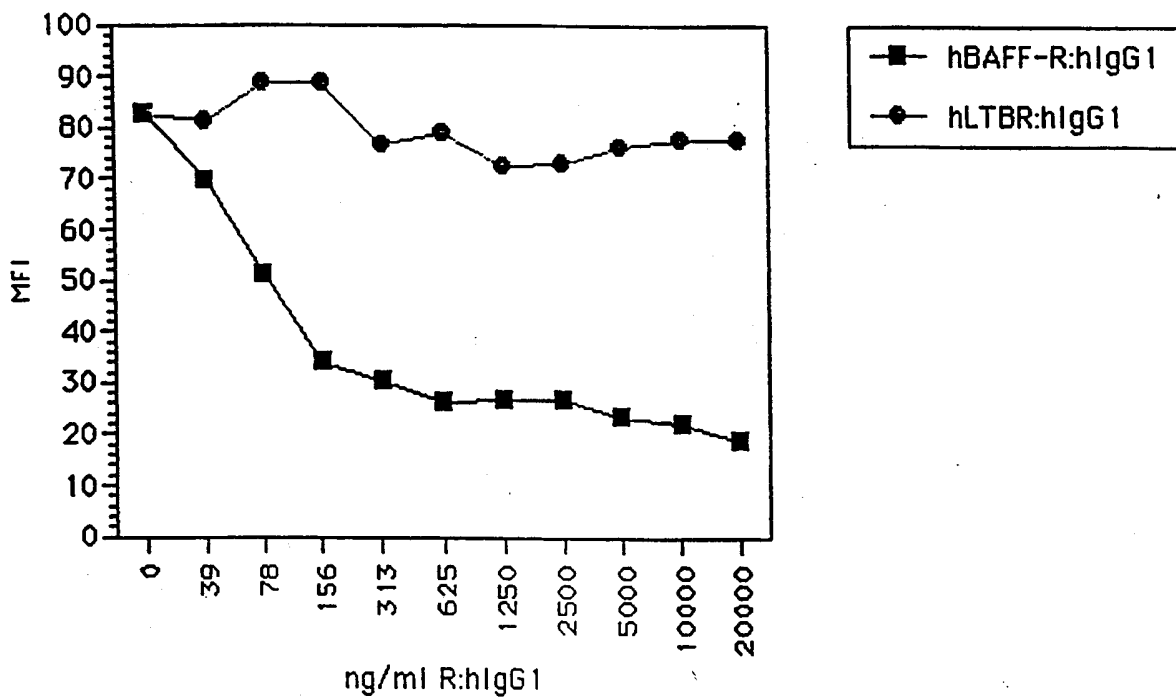
14 / 19:03:02

Фигура 8



10.03.02

Фигура 9

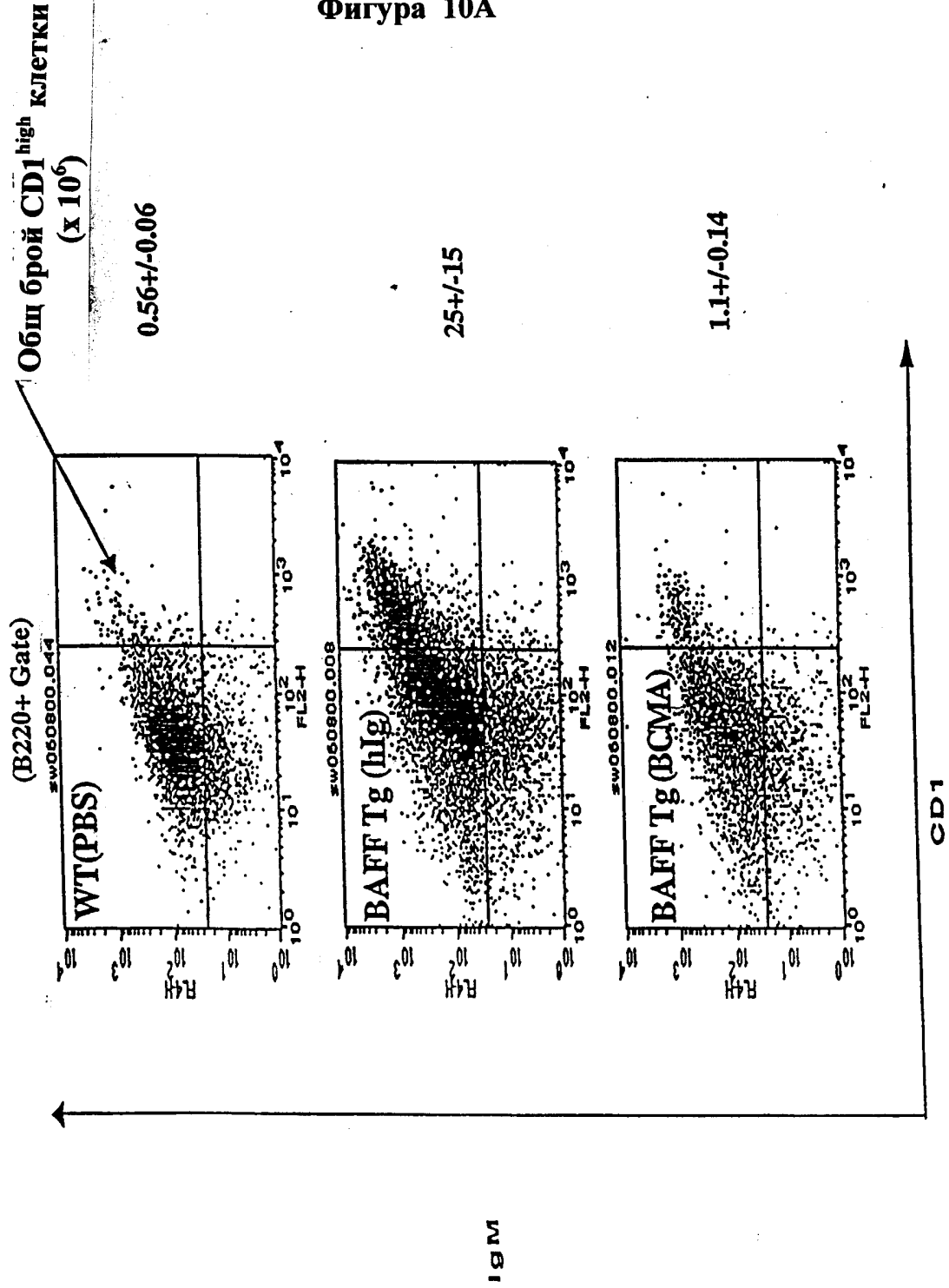


14.03.02

11 / 19

Фигура 10А

BCMA-Ig третирането редуцира тотално CD1^{hi}/IgM^{hi}
В клетъчни популации в далаци от Baff Tg мишки

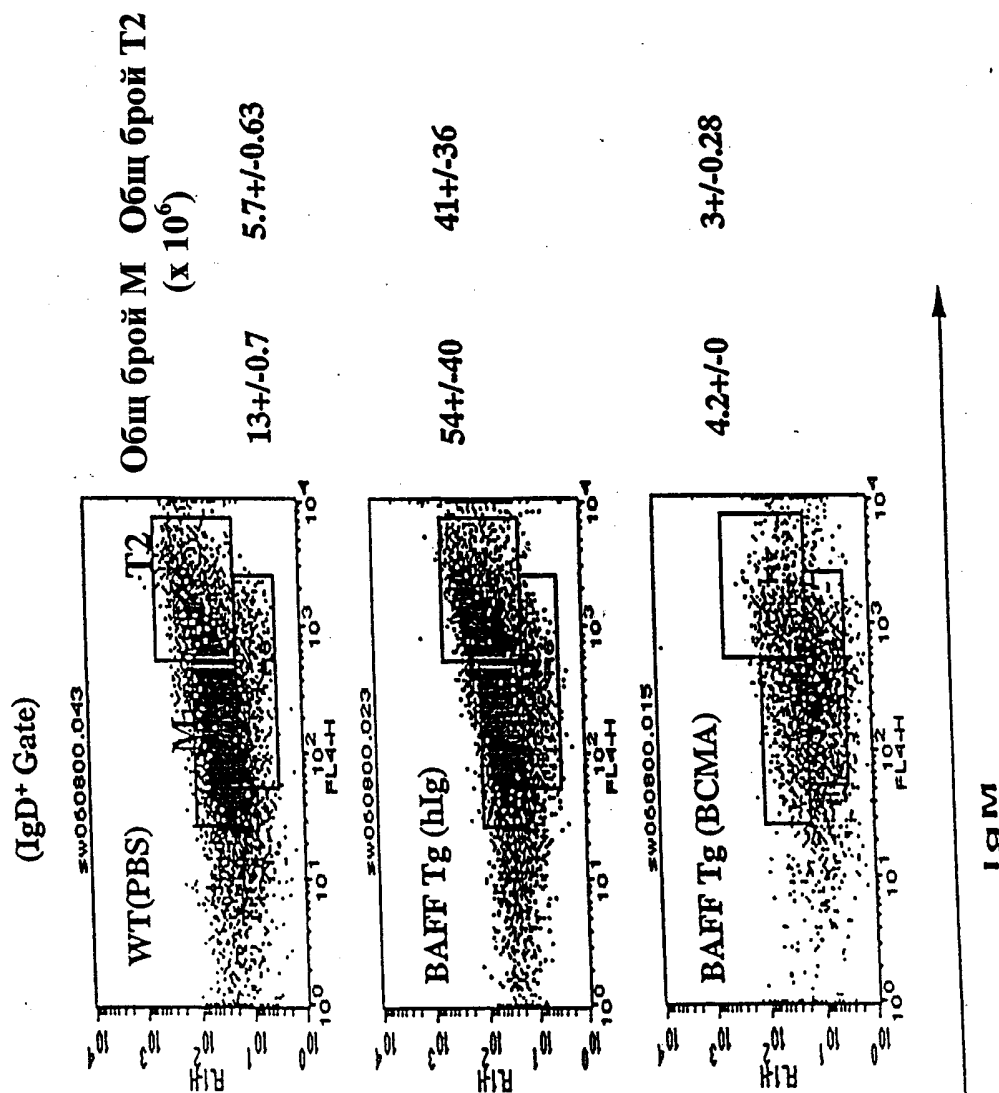


14.03.00

12 / 19

Фигура 10Б

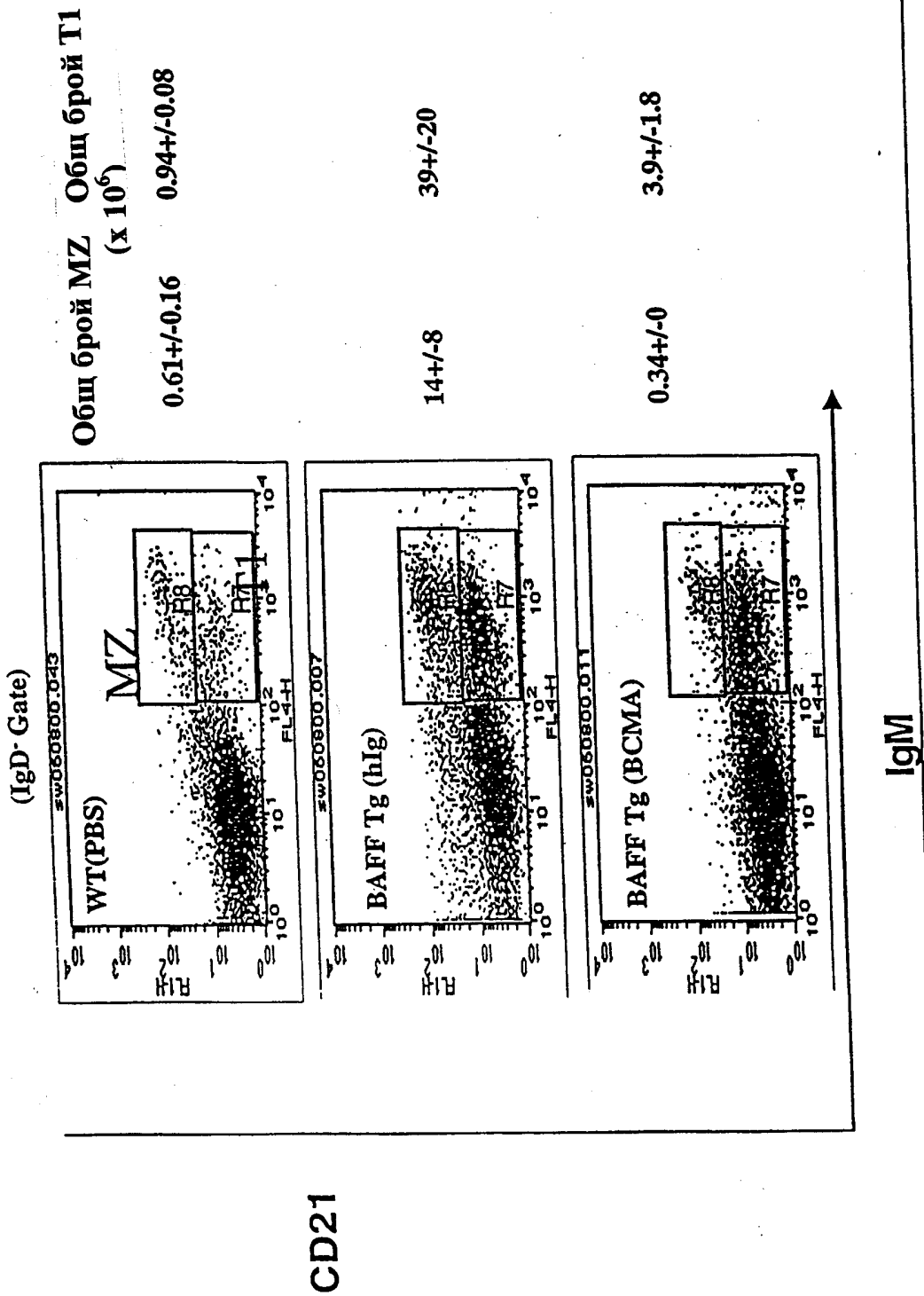
BCMA-Ig третирането редуцира общо зрели В и Т2 В клетъчни популации в далаци от Baff Tg мишки



CD21

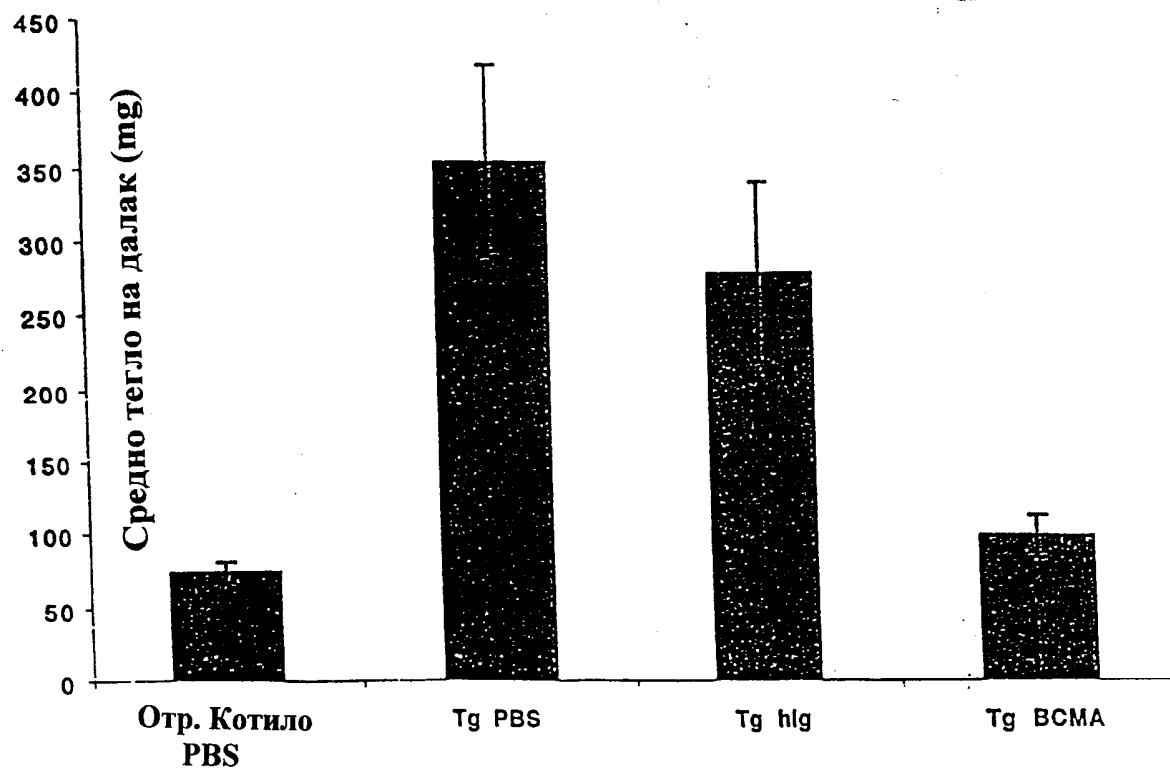
Фигура 10В

BCMA-Ig третирането редуцира общо популации от маргиналната зона и T1 B клетъчни популации в далаци от Baff Tg мишки



Фигура 11

**hBCMA-hIg третирането редуцира теглото на далаците
на Baff Tg мишки**



Брой инъекции	BCMA BAFF Tg	BCMA BAFF Tg	hlgG BAFF Tg 3	hlgG BAFF Tg 4	hlgG BAFF Tg 5	PBS BAFF Tg 6	PBS BAFF Tg 7	PBS WT 1	PBS WT 2
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
6	100	100	100	100	100	100	100	100	100
9	100	100	100	100	100	100	100	100	100
11	5	5	5	5	5	100	100	100	100

Фигура 13

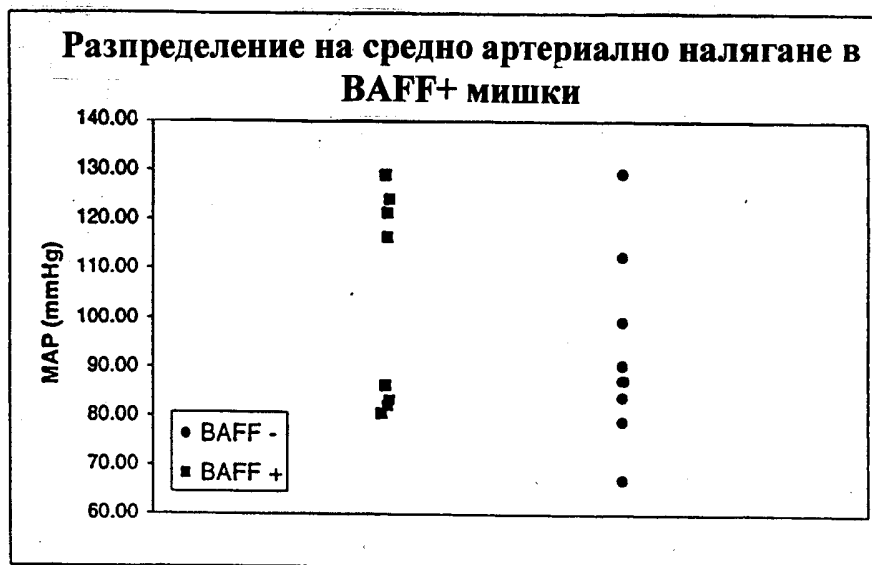
Средна стойност на артериално налягане в BAFF трансгенни (BAFF+) и див-тип контроли (BAFF-)



14.03.02
17 / 19

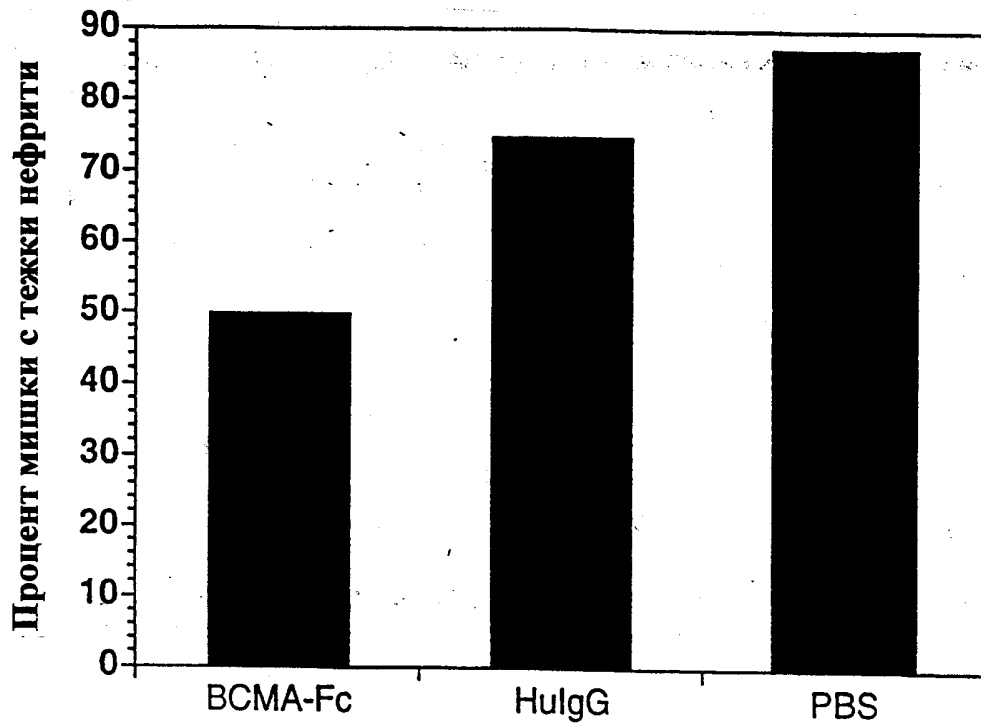
Фигура 14

Отделна стойност на артериално налягане в BAFF трансгенни (BAFF+) и див-тип контроли (BAFF-)



Фигура 15

BCMA-Ig третиране на SNF1 мишки със средна степен на нефрит забавя развитието на тежки нефрити



14.03.02

19 / 19

Фигура 16

