



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 83458

(13) C2

(51) МПК (2006)

C12N 15/12

C12N 15/62

C12N 15/10

C07K 14/715 (2008.01)

C07K 16/28 (2008.01)

C07H 21/04 (2008.01)

C12Q 1/68

A61K 38/17

A61K 48/00

G01N 33/53

G01N 33/68

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

**(54) ВИДІЛЕНИЙ ПОЛІПЕПТИД BAFF-R (РЕЦЕПТОР ФАКТОРА АКТИВАЦІЇ В-КЛІТИН СІМЕЙСТВА TNF)**

1

2

(21) 2003043505

(22) 06.09.2001

(86) PCT/US01/28006, 06.09.2001

(31) 60/233,152

(32) 18.09.2000

(33) US

(31) 60/234,140

(32) 21.09.2000

(33) US

(31) 60/268,499

(32) 13.02.2001

(33) US

(31) 60/312,185

(32) 14.08.2001

(33) US

(46) 25.07.2008, Бюл.№ 14, 2008 р.

(72) АМБРОУЗ КРІСТІН М., ТОМПСОН ДЖЕФФРИ С.

(73) БАЙОДЖЕН АЙДЕК МА ІНК.

(56) WO A 0043032, 27.07.2000.

WO A 0112812, 22.02.2001.

SCHNEIDER P ET AL.: "BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 189, no. 11, 7 June 1999 (1999-06-07), pages 1747-1756, XP000915409 ISSN: 0022-1007.

DATABASE EMBL AOnlineU embi; 9 November 1998 (1998-11-09) NCI-CGAP: "qx03d08.x1 NCI\_CGAP\_Lym12 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2000271 3', mRNA sequence" Database accession no. AI250289 XP002206618.

DATABASE EMBL AOnlineU EMBL; 2 October 1997 (1997-10-02) CLARK G: "Human DNA sequence from clone CTA-250D10 on chromosome 22 Contains the genes for SREBF2 (sterol regulatory element binding transcription factor 2), NAGA (alpha-N-acetyl/galactosaminidase), a gene similar to neuronal-

specific septin 3, a pseudogene similar to ANT2 .. etc." Database accession no. Z99716 XP002206619  
GROSS J A ET AL.: "TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease" NATURE, vol. 404, 27 April 2000 (2000-04-27), pages 995-999, XP002140939 ISSN: 0028-0836  
THOMPSON J S ET AL.: "BAFF binds to the tumor necrosis factor receptor-like molecule B cell maturation antigen and is important for maintaining the peripheral B cell population" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 192, no. 1, 3 July 2000 (2000-07-03), pages 129-135, XP002156772 ISSN: 0022-1007

MARSTERS S A ET AL.: "Interaction of the TNF homologues BLyS and APRIL with the TNF receptor homologues BCMA and TACI" CURRENT BIOLOGY, vol. 10, no. 13, 29 June 2000 (2000-06-29), pages 785-788, XP000992744 ISSN: 0960-9822

YU G ET AL.: "APRIL and TALL-I and receptors BCMA and TACI: system for regulating humoral immunity" NATURE IMMUNOLOGY, vol. 1, no. 3, September 2000 (2000-09), pages 252-256, XP000982268 ISSN: 1529-2908

DOMINGUES H M: "Rational design strategies to improve cytokine foldability and minimization of a functional motif: The IL-4 case" THESIS UNIVERSITY OF UTRECHT, 26 May 1999 (1999-05-26), XP002159

WOOD S J ET AL.: "Prolines and amyloidogenicity in fragments of the Alzheimer's peptide beta/A4" BIOCHEMISTRY, vol. 34, no. 3, 24 January 1995 (1995-01-24), pages 724-730, XP002050228 ISSN: 0006-2960

SCHEIN C H: "Production of soluble recombinant proteins in bacteria" BIO/TECHNOLOGY, vol. 7, no. 11, 1 November 1989 (1989-11-01), pages 1141-1149, XP000068927 ISSN: 0733-222X

(13) C2

(11) 83458

(19) UA

KWON K-S ET AL.: "Single amino acid substitutions of alpha-1-antitrypsin that confer enhancement in thermal stability." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, no. 13, 1994, pages 9627-9631, XP002206613 ISSN: 0021-9258

THOMPSON J S ET AL.: "BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF." SCIENCE (WASHINGTON D C), vol. 293, no. 5537, 14 September 2001 (2001-09-14), pages 2108-2111, XP002206614 ISSN: 0036-8075

YAN M ET AL.: "Identification of a novel receptor for B lymphocyte stimulator that is mutated in a mouse strain with severe B cell deficiency." CURRENT BIOLOGY, vol. 11, no. 19, 2001, pages 1547-1552, XP002206615 ISSN: 0960-9822

SCHIEHMANN B ET AL.: "An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway." SCIENCE (WASHINGTON D C), vol. 293, no. 5537, 14 September 2001 (2001-09-14), pages 2111-2114, XP002206616 ISSN: 0036-8075

WALDSCHMIDT T J ET AL.: "Long live the mature B cell: A BAFFing mystery resolved." SCIENCE (WASHINGTON D C), vol. 293, no. 5537, 14 September 2001 (2001-09-14), pages 2012-2013, XP002206617 ISSN: 0036-8075

**(57)** 1. Виділений поліпептид BAFF-R (рецептор фактора активації В-клітин сімейства TNF), що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з:

- (a) SEQ ID NO:5;
- (b) фрагмента SEQ ID NO:5, що зв'язується з BAFF (фактор активації В-клітин сімейства TNF);
- (c) амінокислотної послідовності, яка зв'язується з BAFF і щонайменше на 70 % ідентична SEQ ID NO:5, або фрагмента SEQ ID NO:5;
- (d) амінокислотної послідовності, яка зв'язується з BAFF і щонайменше на 80 % ідентична SEQ ID NO:5, або фрагмента SEQ ID NO:5;
- (e) амінокислотної послідовності, яка зв'язується з BAFF і щонайменше на 90% ідентична SEQ ID NO:5, або фрагмента SEQ ID NO:5;
- (f) амінокислотної послідовності, яка зв'язується з BAFF і щонайменше на 95% ідентична SEQ ID NO:5, або фрагмента SEQ ID NO:5; і
- (g) SEQ ID NO:5 або фрагмента SEQ ID NO:5, модифікованих заміною однієї або декількох консервативних амінокислот, де модифікована послідовність зв'язується з BAFF.

2. Виділений поліпептид BAFF-R за п.1, де поліпептид містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з:

- (a) SEQ ID NO:10;
- (b) фрагмента SEQ ID NO:10, який зв'язується з BAFF;
- (c) амінокислотної послідовності, яка зв'язується з BAFF і щонайменше на 70 % ідентична SEQ ID NO:10, або фрагмента SEQ ID NO:10;
- (d) амінокислотної послідовності, яка зв'язується з BAFF і щонайменше на 80 % ідентична SEQ ID NO:10, або фрагмента SEQ ID NO:10;
- (e) амінокислотної послідовності, яка зв'язується з BAFF і щонайменше на 90 % ідентична SEQ ID NO:10, або фрагмента SEQ ID NO:10;
- (f) амінокислотної послідовності, яка зв'язується з

BAFF і щонайменше на 95 % ідентична SEQ ID NO:10, або фрагмента SEQ ID NO:10;

(g) SEQ ID NO:10 або фрагмента SEQ ID NO:10, модифікованих заміною однієї або декількох консервативних амінокислот, де модифікована послідовність зв'язується з BAFF.

3. Виділений поліпептид BAFF-R за п.1 або 2, де поліпептид містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з:

- (a) амінокислот 19-35 послідовності SEQ ID NO:5;
  - (b) амінокислот 19-35 послідовності SEQ ID NO:5, яка модифікована заміною однієї або декількох консервативних амінокислот, де модифікована послідовність зв'язується з BAFF;
  - (c) SEQ ID NO:13; та
  - (d) SEQ ID NO:13, яка модифікована заміною однієї або декількох консервативних амінокислот, де модифікована послідовність зв'язується з BAFF.
4. Виділений поліпептид BAFF-R за п.1, де поліпептид містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з:

- (a) SEQ ID NO:15;
- (b) SEQ ID NO:16;
- (c) SEQ ID NO:17;
- (d) SEQ ID NO:18;
- (e) SEQ ID NO:19;
- (f) SEQ ID NO:20;
- (g) SEQ ID NO:21;
- (h) SEQ ID NO:22;
- (i) SEQ ID NO:23;
- (j) SEQ ID NO:24;
- (k) SEQ ID NO:25;
- (l) SEQ ID NO:26;
- (m) SEQ ID NO:27;
- (n) SEQ ID NO:28;
- (o) SEQ ID NO:29;
- (p) SEQ ID NO:30;
- (q) SEQ ID NO:31;
- (r) SEQ ID NO:32;
- (s) фрагмента будь-якої послідовності (a)-(r), який зв'язується з BAFF; та
- (t) будь-якої послідовності (a)-(s), яка модифікована заміною однієї або декількох консервативних амінокислот, де модифікований поліпептид зв'язується з BAFF.

5. Виділений поліпептид BAFF-R за п.4, який містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

- (a) SEQ ID NO:19;
- (b) SEQ ID NO:22;
- (c) SEQ ID NO:24;
- (d) SEQ ID NO:25;
- (e) SEQ ID NO:26;
- (f) SEQ ID NO:27; і
- (g) фрагмента будь-якої послідовності (a)-(f), який зв'язується з BAFF.

6. Виділений поліпептид BAFF-R за п.1 або п.2, де поліпептид зв'язується з BAFF і має знижену здатність до агрегації у порівнянні з відповідним нативним поліпептидом BAFF-R, і де поліпептид містить:

- (a) SEQ ID NO:5 або SEQ ID NO:10, де одна або декілька неконсервативних амінокислот в ділянці C19-L27 природного поліпептиду BAFF-R замінені відповідними амінокислотами поліпептиду BAFF-R з послідовністю SEQ ID NO:9; або

(b) фрагмент (a), який зв'язується з BAFF.

7. Виділений поліпептид BAFF-R за п.6, де заміни введені в одне або декілька положень, вибраних з групи, що складається з:

- (a) V20, P21, A22 і L27 послідовності SEQ ID NO:10;
- (b) V41, P42, A43 і L48 послідовності SEQ ID NO:12; і
- (c) C19-L27 послідовності SEQ ID NO:10, яка містить амінокислоти 2-71.

8. Виділений поліпептид BAFF-R за п.7, який містить амінокислоти 2-71 послідовності SEQ ID NO:10, де змінені амінокислоти вибрані з групи, що складається з:

- (a) V20N, P21Q, A22T і L27P;
- (b) V20N і L27P;
- (c) P21Q і L27P;
- (d) L27P;
- (e) V20N і L27A; і
- (f) V20N і L27S.

9. Виділений поліпептид BAFF-R за будь-яким з пп.1-8, де поліпептид є химерним білком.

10. Виділений поліпептид BAFF-R за п.9, який містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

- (a) SEQ ID NO:12;
- (b) фрагмента SEQ ID NO:12, який зв'язується з BAFF;
- (c) амінокислотної послідовності, яка зв'язується з BAFF і щонайменше на 80 % ідентична SEQ ID NO:12, або фрагмента SEQ ID NO:12; та
- (d) SEQ ID NO: 12 або фрагмента SEQ ID NO:12, модифікованого заміною однієї або декількох консервативних амінокислот, де модифікована послідовність зв'язується з BAFF.

11. Виділений поліпептид BAFF-R за п.10, що містить амінокислоти 23-92 послідовності SEQ ID NO:12 і Fc-фрагмент IgG1 людини.

12. Виділений поліпептид BAFF-R за п.9, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з:

- (a) Fc-фрагмент антитіла;
- (b) послідовностей, отриманих з білка імуноглобуліну;
- (c) гетерологічних сигнальних послідовностей, або
- (d) глутатіон S-трансферази.

13. Виділений білок за п.9, який містить константний домен імуноглобуліну і поліпептид BAFF-R, вибраний з групи, яка складається з:

- (a) будь-якої послідовності з SEQ ID NO:13; SEQ ID NO:15; SEQ ID NO:16; SEQ ID NO:17; SEQ ID NO:18; SEQ ID NO:19; SEQ ID NO:20; SEQ ID NO:21; SEQ ID NO:22; SEQ ID NO:23; SEQ ID NO:24; SEQ ID NO:25; SEQ ID NO:26; SEQ ID NO:27; SEQ ID NO:28; SEQ ID NO:29; SEQ ID NO:30; SEQ ID NO: 31; і SEQ ID NO:32; і
- (b) фрагмента послідовності (a), який зв'язується з BAFF.

14. Виділений поліпептид BAFF-R, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з:

- (a) SEQ ID NO:9;
- (b) фрагмента SEQ ID NO:9, який зв'язується з BAFF;
- (c) амінокислотної послідовності, яка зв'язується з

BAFF і щонайменше на 70 % ідентична SEQ ID NO:9, або фрагмента SEQ ID NO:9;

(d) амінокислотної послідовності, яка зв'язується з BAFF і щонайменше на 80 % ідентична SEQ ID NO:9, або фрагмента SEQ ID NO:9;

(e) амінокислотної послідовності, яка зв'язується з BAFF і щонайменше на 90 % ідентична SEQ ID NO:9, або фрагмента SEQ ID NO:9; та

(f) SEQ ID NO:9 або фрагмента SEQ ID NO:9, модифікованих заміною однієї або декількох консервативних амінокислот, де модифікована послідовність зв'язується з BAFF.

15. Виділений поліпептид BAFF-R, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з:

- (a) SEQ ID NO:14;
- (b) фрагмента SEQ ID NO:14, який зв'язується з BAFF;
- (c) амінокислотної послідовності, яка зв'язується з BAFF і щонайменше на 70 % ідентична SEQ ID NO:14, або фрагмента SEQ ID NO:14;
- (d) амінокислотної послідовності, яка зв'язується з BAFF і щонайменше на 80 % ідентична SEQ ID NO:14, або фрагмента SEQ ID NO:14;
- (e) амінокислотної послідовності, яка зв'язується з BAFF і щонайменше на 90 % ідентична SEQ ID NO:14, або фрагмента SEQ ID NO:14; або
- (f) SEQ ID NO:14 або фрагмента SEQ ID NO:14, модифікованих заміною однієї або декількох консервативних амінокислот, де модифікована послідовність зв'язується з BAFF.

16. Молекула нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує поліпептид BAFF-R за п.14 або п.15.

17. Молекула нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує поліпептид BAFF-R за будь-яким з пп.1-13.

18. Молекула нуклеїнової кислоти за п.17, де молекула містить нуклеотидну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

- (a) SEQ ID NO:3;
- (b) SEQ ID NO:4;
- (c) SEQ ID NO:6;
- (d) SEQ ID NO:11;
- (e) нуклеотидів 67-276 послідовності SEQ ID NO:11;
- (f) нуклеотидів 67-276 і 280-960 послідовності SEQ ID NO:11;
- (g) фрагмента щонайменше зі 100 послідовних нуклеотидів будь-якої послідовності (a)-(e), що кодує поліпептид, який зв'язується з BAFF;
- (h) фрагмента будь-якої послідовності (a)-(f), що кодує поліпептид, який зв'язується з BAFF;
- (i) нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептид, який зв'язується з BAFF, і щонайменше на 70 % ідентична будь-якій послідовності (a)-(h);
- (j) нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептид, який зв'язується з BAFF, і щонайменше на 80 % ідентична будь-якій послідовності (a)-(h);
- (k) нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептид, який зв'язується з BAFF, і щонайменше на 90 % ідентична будь-якій послідовності (a)-(h).

19. Молекула нуклеїнової кислоти за п.17 або п.18, де молекула кодує поліпептид BAFF-R, який містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи,

що складається з:

(a) SEQ ID NO:5 або фрагмента SEQ ID NO:5, що зв'язується з BAFF;

(b) SEQ ID NO:10 або фрагмента SEQ ID NO:10, що зв'язується з BAFF;

(c) SEQ ID NO:13 або фрагмента SEQ ID NO:13, що зв'язується з BAFF;

(d) амінокислотної послідовності, яка зв'язується з BAFF і щонайменше на 70 % ідентична будь-якій послідовності (a)-(c);

(e) амінокислотної послідовності, яка зв'язується з BAFF і щонайменше на 80 % ідентична будь-якій послідовності (a)-(c);

(f) амінокислотної послідовності, яка зв'язується з BAFF і щонайменше на 90% ідентична будь-якій послідовності (a)-(c).

20. Молекула нуклеїнової кислоти за будь-яким з пп.17-19, де нуклеотидна послідовність кодує поліпептид, який менший від повнорозмірного BAFF-R і який зв'язується з BAFF.

21. Молекула нуклеїнової кислоти за п.17, де поліпептид, який кодується, вибраний з групи, що складається з:

(a) SEQ ID NO:19;

(b) SEQ ID NO:22;

(c) SEQ ID NO:24;

(d) SEQ ID NO:25;

(e) SEQ ID NO:26;

(f) SEQ ID NO:27; і

(g) фрагмента будь-якої послідовності (a)-(f), який зв'язується з BAFF.

22. Молекула нуклеїнової кислоти, яка містить нуклеотидну послідовність, яка:

(a) гібридується у жорстких умовах з SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, або нуклеотидами 67-276 послідовності SEQ ID NO:11; і

(b) гібридується в жорстких умовах з послідовностями, комплементарними SEQ ID NO:3 або SEQ ID NO:4; або

(c) є комплементарною нуклеотидній послідовності SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 або нуклеотидам 67-276 послідовності SEQ ID NO:11,

де жорсткі умови (a) і (b) визначаються 6X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0,02% PVP, 0,02% Ficoll, 0,02% BSA і 500 мг/мл денатурованої ДНК сперми лосося при 65 °C, а потім одним або декількома промиваннями в 0,2 x SSC, 0,1% BSA при 50 °C, і де послідовністю нуклеотидів (a), (b) та (c) не є EST A1250289, SEQ ID NO:2 або номер доступу в Genbank no.Z99716.

23. Молекула нуклеїнової кислоти за п.22, де нуклеотидна послідовність комплементарна молекулі нуклеїнової кислоти за п.18.

24. Молекула нуклеїнової кислоти за п.16, яка містить послідовність нуклеїнової кислоти, вибрану з групи, що складається з:

(a) SEQ ID NO:8;

(b) фрагмента SEQ ID NO:8, що містить щонайменше 100 послідовних нуклеотидів;

(c) послідовності нуклеїнової кислоти, яка кодує SEQ ID NO:14;

(d) послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, який щонайменше на 70 % ідентичний

SEQ ID NO:14 та зв'язується з BAFF;

(e) послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, який щонайменше на 90 % ідентичний SEQ ID NO:14 і зв'язується з BAFF; і

(f) послідовності нуклеїнової кислоти, яка комплементарна будь-якій послідовності (a)-(e).

25. Вектор, що містить молекулу нуклеїнової кислоти за будь-яким з пп.17-23.

26. Клітина, що містить вектор за п.25.

27. Клітина за п.26, де клітина являє собою клітину яєчника китайського хом'яка.

28. Клітина за п.26, що містить молекулу нуклеїнової кислоти за п.19.

29. Антитіло або поліпептид, що містить антигензв'язувальний домен антитіла, де антитіло або антигензв'язувальний домен поліпептиду специфічно зв'язуються з частиною поліпептиду за будь-яким з пп.1-15.

30. Антитіло або поліпептид за п.29, де антитіло або антигензв'язувальний домен поліпептиду специфічно зв'язуються з поліпептидом BAFF-R, амінокислотна послідовність якого вибрана з групи, яка складається з:

(a) SEQ ID NO:5;

(b) SEQ ID NO:10;

(c) SEQ ID NO:13; і

(d) фрагмента будь-якої послідовності (a)-(c), який зв'язується з BAFF.

31. Антитіло або його антигензв'язувальний домен за п.29 або 30, де антитіло або антигензв'язувальний домен поліпептиду є одним або декількома з наступних:

(a) моноклональним;

(b) поліклональним;

(c) химерним;

(d) гуманізованим;

(e) однокланцевим антитілом;

(f) фрагментом Fab; і

(g) фрагментом F(ab)<sup>2</sup>.

32. Антитіло або поліпептид за п.31, де антитіло або антигензв'язувальний домен поліпептиду специфічно зв'язується з поліпептидом за п.2 або п.3.

33. Антитіло за пп.29 або 30, яке отримане за допомогою:

(a) гібридомного клону #2.1, задепонованого як ATCC No. PTA-3689; або

(b) гібридомного клону #9.1, задепонованого як ATCC No. PTA-3688.

34. Антитіло за будь-яким з пп.29-33 або поліпептид за будь-яким з пп.29-32, де антитіло або антигензв'язувальний домен поліпептиду блокують зв'язування BAFF з BAFF-R.

35. Антитіло або поліпептид за п.34, де антитіло або антигензв'язувальний домен поліпептиду є гуманізованими.

36. Антитіло або поліпептид за п.30, де антитіло або антигензв'язувальний домен поліпептиду є гуманізованими.

37. Гібридома, яка продукує антитіло за п.29, вибрана з групи, що складається з гібридомного клону #2.1, задепонованого як ATCC No. PTA-3689, і гібридомного клону #9.1, задепонованого як ATCC No. PTA-3688.

38. Фармацевтична композиція, що містить молекулу, вибрану з групи, яка складається з:

- (a) поліпептиду за будь-яким з пп.1-13; і
- (b) антитіла або поліпептиду, що містить антигензв'язувальний домен антитіла, за будь-яким з пп.29-36.
39. Фармацевтична композиція за п.38, що містить антитіло або поліпептид, який складається з антигензв'язуючого домену антитіла за п.36.
40. Поліпептид за будь-яким з пп.1-13 або антитіло або поліпептид, що містить антигензв'язувальний домен антитіла, за будь-яким з пп.29-36, для застосування в терапії.
41. Застосування поліпептиду за будь-яким з пп.1-13 або антитіла або поліпептиду, що містить антигензв'язувальний домен антитіла, за будь-яким з пп.29-36, для виробництва лікарського засобу для лікування, профілактики або уповільнення настання стану, вибраного з групи, яка складається зі: стану, опосередкованого В-клітинами, захворювання плазматичів, аутоімунного захворювання, пухлинного захворювання, гіпертензії, серцево-судинного захворювання, захворювання нирок, захворювання, пов'язаного з порушенням проліферації В-клітин, лімфоми Беркіта, імуносупресивного захворювання, трансплантації органів, запалення або ВІЛ.
42. Застосування за п.41, де захворюванням плазматичів є множинна мієлома, макроглобулінемія Вальденстрема, хвороба важких ланцюгів, первинний амілоїдоз або амілоїдоз, асоційований з імуніцитами, або моноклональна гаммапатія не-встановленої етіології (MGUS).
43. Застосування за п.41, де аутоімунним захворюванням є ревматоїдний артрит, системний червоний вовчак, міастенія гравіс, аутоімунна гемолітична анемія, ідіопатична тромбоцитопенічна пурпура, антифосфоліпідний синдром, хвороба Чагаса, хвороба Грейва, грануломатоз Вегенера, поліартрит нодозний або гломерулонефрит.
43. Застосування за п.41, де пухлинним захворюванням є В-клітинна карцинома, лейкомія або лімфома.
45. Застосування за п.41, де фармацевтичну композицію вводять для лікування, профілактики або затримання розвитку системного червоного вовчака.
46. Застосування за п.41, де фармацевтичну композицію вводять для лікування, профілактики або затримання розвитку ревматоїдного артриту.
47. Застосування за п.41, де фармацевтична композиція містить поліпептид за п.3 або п.5 і її вводять для лікування, профілактики або затримки розвитку системного червоного вовчака.
48. Застосування за п.41, де фармацевтична композиція містить антитіло або поліпептид, що містить антигензв'язувальний домен антитіла за п.36, і її вводять для лікування, профілактики або затримки розвитку системного червоного вовчака.
49. Застосування за п.41, де фармацевтична композиція містить поліпептид за п.3 або п.5, її вводять для лікування, профілактики або затримки розвитку ревматоїдного артриту.
50. Застосування за п.41, де фармацевтична композиція містить антитіло або поліпептид, що містить антигензв'язувальний домен антитіла, за п.36, і її вводять для лікування, профілактики або

затримки розвитку ревматоїдного артриту.

51. Виділений нуклеотидний зонд, який складається з 10-50 послідовних нуклеотидів, вибраних з:

(a) послідовності, вибраної з групи, яка складається з SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 і SEQ ID NO:6;

(b) SEQ ID NO:8;

(c) послідовності, комплементарної до послідовності, вибраної з групи, яка складається з SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 і SEQ ID NO:6; і

(d) вироджених послідовностей (a) або (b), які кодують ту ж амінокислотну послідовність.

52. Спосіб отримання поліпептиду BAFF-R, який передбачає стадії:

(a) отримання клітини за будь-яким з пп.26-28;

(b) культивування клітини в умовах, прийнятних для експресії поліпептиду BAFF-R; і

(c) виділення поліпептиду BAFF-R.

53. Спосіб ідентифікації функціонально активного мутантного поліпептиду BAFF-R за будь-яким з пп.1-15, де спосіб включає оцінку мутанту BAFF-R на одну або декілька наступних активностей:

(a) на здатність зв'язуватися з BAFF;

(b) на здатність зв'язуватися з внутрішньоклітинним білком-мішенню або з його біологічно активною частиною;

(c) на здатність специфічно зв'язуватися з анти-BAFF-R антитілом,

де наявність однієї або декількох цих активностей вказує на те, що такий мутант BAFF-R є функціонально активним.

54. Спосіб ідентифікації сполуки, яка модулює активність поліпептиду BAFF-R, який передбачає стадії:

(a) контактування поліпептиду BAFF-R за пп.1-15 із сполукою; і

(b) визначення чи була змінена активність BAFF-R.

55. Спосіб отримання поліпептиду BAFF-R із зниженою здатністю до агрегації у порівнянні з відповідним природним поліпептидом BAFF-R, який передбачає стадії:

(a) трансформування клітини-хазяїна нуклеїновою кислотою, що кодує поліпептид BAFF-R за будь-яким з пп.1-15, в якому одна або декілька неконсервативних амінокислот у ділянці C19-L27 замінені відповідними амінокислотами поліпептиду BAFF-R послідовності SEQ ID NO:9;

(b) культивування клітини в умовах, прийнятних для експресії поліпептиду BAFF-R з замінами амінокислот(и); і

(c) виділення поліпептиду BAFF-R за (b).

56. Спосіб за п.55 де неконсервативна амінокислота є неполярною амінокислотою.

57. Спосіб за п.56, де неполярна амінокислота замінена амінокислотою, вибраною з групи, що складається з проліну, серину або аланіну.

58. Трансгенна тварина, яка не є людиною, в геном якої введені екзогенні послідовності нуклеїнової кислоти, що кодують поліпептид BAFF-R за будь-яким з пп.1-15, або в якій змінені ендогенні послідовності нуклеїнової кислоти, що кодують поліпептид BAFF-R.

59. Набір, що містить щонайменше одне антитіло за будь-яким з пп.29-36 і контроль.

60. Спосіб ідентифікації клітин або тканин з пору-

шеною експресією BAFF-R, що включає:

(а) контактування олігонуклеотидного зонда, що містить щонайменше 10 послідовних нуклеотидів послідовності, вибраних з: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, і послідовностей, які комплементарні будь-якій послідовності SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 і SEQ ID NO:6, з біологічним зразком індивідуума; і

(б) вимірювання рівня нуклеїнової кислоти, що кодує BAFF-R, у біологічному зразку за визначенням рівнів мРНК BAFF-R; або

(с) визначення чи була мutowана або делетована нуклеїнова кислота BAFF-R у біологічному зразку.

61. Діагностичний набір для ідентифікації клітин або тканин з порушеною експресією BAFF-R, який містить ізотопнопомітний зонд, що включає щонайменше 10 послідовних нуклеотидів послідовності, вибраної з: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, і послідовності, які комплементарні будь-якій послідовності SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 і SEQ ID NO:6.

62. Набір для визначення присутності BAFF-R у біологічному зразку, який містить:

мічену сполуку або агент, здатний виявляти поліпептид BAFF-R за будь-яким з пп.1-15 або мРНК, що кодує поліпептид BAFF-R за будь-яким з пп.1-15, у біологічному зразку; пристрій для визначення кількості BAFF-R у зразку; і пристрій для порівняння кількості BAFF-R у зразку зі стандартом.

63. Спосіб діагностики захворювання, опосередкованого В-клітинами, у індивідуума, який передбачає стадії:

(а) взяття біологічного зразка у індивідуума;

(б) вимірювання кількості поліпептиду BAFF-R за будь-яким з пп.1-15 або нуклеїнової кислоти BAFF-R, що кодує поліпептид BAFF за будь-яким з пп.1-15, у зразку, який був взятий у індивідуума; і

(с) порівняння кількості поліпептиду BAFF-R або нуклеїнової кислоти BAFF-R у зразку, який був взятий у індивідуума, з кількістю поліпептиду BAFF-R або нуклеїнової кислоти BAFF-R контрольного зразка,

де відмінність кількості поліпептиду BAFF-R або нуклеїнової кислоти BAFF-R у зразку, який був взятий у індивідуума, і кількості поліпептиду BAFF-R або нуклеїнової кислоти BAFF-R контрольного зразка вказує на захворювання, опосередковане В-клітинами, в індивідуума.

64. Застосування поліпептиду за будь-яким з пп.1-13 для отримання діагностичного агента для діагностики захворювання, опосередкованого В-клітинами.

65. Поліпептид BAFF-R, отриманий способом:

(а) культивування клітини-хазяїна, яка містить молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид за будь-яким з пп.1-13 в умовах, достатніх для експресії поліпептиду BAFF-R;

(б) виділення експресованого поліпептиду.

66. Химерний поліпептид, отриманий способом:

(а) культивування клітини-хазяїна, що містить молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує химерний поліпептид BAFF-R за будь-яким з пп.9-13; і

(б) виділення експресованого химерного поліпеп-

тиду BAFF-R.

67. Поліпептид BAFF-R за п.65 або химерний поліпептид за п.66, де поліпептид BAFF-R містить амінокислоти 2-71 SEQ ID NO:10 або його фрагмент, який зв'язується з BAFF.

68. Поліпептид BAFF-R за п.65 або химерний поліпептид за п.66, де поліпептид BAFF-R містить амінокислоти 2-71 SEQ ID NO:10.

69. Химерний поліпептид BAFF-R за будь-яким з пп.66-68, де поліпептид не-BAFF-R містить домен Fc людського IgG.

70. Поліпептид BAFF-R за п.65 або химерний поліпептид за будь-яким з пп.66-68, де клітина-хазяїн є клітиною ссавця.

71. Поліпептид за п.70, де клітина ссавця є клітиною яєчника китайського хом'яка.

72. Поліпептид за п.70, де клітина ссавця є клітиною 293 EBNA.

73. Спосіб детектування BAFF-R в біологічному зразку, взятому в індивідуума, що включає:

(а) отримання біологічного зразка в індивідуума;

(б) детекцію поліпептиду BAFF-R за будь-яким з пп.1-15 у зразку, взятому в індивідуума, використовуючи антитіло або поліпептид, що містить антигензв'язувальний домен антитіла, за будь-яким з пп.29-36.

74. Спосіб за п.73, де антитіло або антигензв'язувальний домен поліпептиду є одним або декількома з наступних:

(а) моноклональним;

(б) поліклональним;

(с) химерним;

(д) гуманізованим;

(е) одноланцюговим антитілом;

(ф) фрагментом Fab; та

(г) фрагментом F(ab)<sub>2</sub>.

75. Спосіб визначення чи є геномна полідовність BAFF-R мutowаною або делетованою, що включає:

(а) отримання біологічного зразка в індивідуума; та

(б) визначення чи є геномна послідовність BAFF-R мutowаною або делетованою, використовуючи молекулу нуклеїнової кислоти, здатної до гібридизації в жорстких умовах з геномними послідовностями BAFF-R людини (SEQ ID NO:10) або BAFF-R миші (SEQ ID NO:9);

де жорсткі умови визначаються 6X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 0,02 % PVP, 0,02 % Ficoll, 0,02% BSA і 500 мг/мл денатурованої ДНК сперми лосося при 65 °C, а потім одним або декількома промиваннями в 0,2 x SSC, 0,1 % BSA при 50 °C.

76. Застосування молекули нуклеїнової кислоти за будь-яким з пп.17-23 для отримання діагностичного агента для діагностики захворювання, опосередкованого В-клітинами.

77. Застосування антитіла за будь-яким з пп.29-36 для отримання діагностичного засобу для діагностики захворювання, опосередкованого В-клітин.

78. Застосування зонда за п.51 для отримання діагностичного засобу для діагностики захворювання, опосередкованого В-клітинами.

Даний винахід забезпечує новий рецепторний білок. Даний винахід відноситься, загалом, до нуклеїнових кислот і поліпептидів. Більш конкретно, даний винахід відноситься до нуклеїнових кислот, які кодують поліпептиди, що відносяться до рецептора BAFF, фактора активації В-клітин, що належить до сімейства Факторів Некрозу Пухлин («TNF»), який пов'язаний з експресією В-клітин і імуноглобулінів. Цей рецептор може бути використаний для лікування раків, лімфом, аутоімунних захворювань або спадкових генетичних порушень, в яких беруть участь В-клітини.

Даний винахід відноситься до нового рецептора в сімействі TNF. Новий рецептор ідентифікований як BAFF-рецептор («BAFF-R»).

Сімейство TNF складається з пар лігандів і їх специфічних рецепторів, названих лігандами сімейства TNF і рецепторами сімейства TNF [Bazzoni and Beutler (1996) *N.Engl. J.Med.* 334(26): 1717-1725]. Це сімейство бере участь у регуляції імунної системи і, можливо, інших неімунологічних систем. Ця регуляція часто знаходиться на рівні «основного перемикачання», так що передача сигналу сімейства TNF може приводити до великого числа подальших подій, найкраще визначених для TNF. TNF може ініціювати загальну захисну запальну реакцію організму на чужорідну інвазію, яка включає в себе змінене представлення молекул адгезії, що беруть участь в переміщенні клітин, продукування хемокинів для переміщення специфічних клітин в специфічні компартменти і примування (сенситілізацію) різних ефекторних клітин. Як така регуляція цих шляхів має клінічний потенціал.

Вважається, що індукція різних клітинних реакцій, опосередкована такими цитокинами сімейства TNF, ініціюється їх скріпленням зі специфічними клітинними рецепторами. Були ідентифіковані, щонайменше, два TNF-рецептори, що розрізняються, приблизно 55кДа (TNFR1) і 75кДа (TNFR2) [Hohman et al. (1989) *J.Biol. Chem.* 264: 14927-14934; and Brockhaus et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3127-3131]. Широкий поліморфізм був асоційований з генами обох TNF-рецепторів. Обидва TNFR мають загальну типову структуру рецепторів клітинної поверхні, що включає позаклітинний, трансмембранний і внутрішньоклітинний домени. Позаклітинна частина TNFR типу 1 і типу 2 містить картину амінокислотної послідовності, що повторюється, з чотирьох багатих цистеїнами доменів (CDR). Схожа картина CDR, що повторюється, існує в декількох інших білках клітинної поверхні, в тому числі рецепторі фактора зростання нервів p75, антигені CD40 В-клітин, нарівні з іншими.

Ці рецептори є могутніми інструментами для з'ясування біологічних шляхів внаслідок легкості і перетворення в злиті з імуноглобулінами білки. Ці димерні форми розчинного рецептора є хорошими інгібіторами подій, опосередкованих або секретованими, або пов'язаними з поверхнею лігандами.

За допомогою скріплення з такими лігандами вони перешкоджають взаємодії цього ліганду з пов'язаними з клітинами рецепторами, які можуть передавати сигнал. Ці злиті білки рецептор-Fc не тільки застосовні в експериментальному значенні, але вони були успішно використані клінічно у вигляді TNF-R-Fc для лікування запалення кишечника, ревматоїдного артрити і гострого клінічного синдрому, супутнього введенню ОКТЗ (антигенного маркера популяції зрілих периферичних Т-лімфоцитів у людини) [Eason et al. (1996) *Transplantation* 61 (2): 224-228; Feldmann et al. (1996) *Int. Arch. Allergy Immunol.* 111 (4): 362-365; i van Dulleman et al. (1995) *Gastroenterol* 109 (1): 129-135]. Можна передбачити, що маніпулювання багатьма подіями, опосередкованими передачею сигналів через сімейство TNF-рецепторів, буде мати широкі застосування для лікування захворювань, в основі яких лежить порушення імунної системи, а також великого діапазону захворювань людини, які мають патологічні ускладнення внаслідок участі імунної системи. Розчинна форма нещодавно описаного рецептора, остеопротегерину, може блокувати втрату кісткової маси (остеопорозу), і, отже, події, регульовані передачею сигналу рецептором TNF-сімейства, необов'язково обмежуються тільки регуляцією імунної системи [Simonet et al. (1997) *Cell* 89 (2): 309-319]. Антитіла до цього рецептора можуть блокувати скріплення ліганду і, отже, можуть також мати клінічне застосування. Такі антитіла часто є дуже довго живучими і можуть мати переваги над злитими білками розчинний рецептор-Fc, які мають більш короткі півперіоди існування в крові.

Хоча інгібування опосередкованого рецептором шляху представляє терапевтичне застосування цих рецепторів, що найбільш використовується, застосуванням, що спочатку використовувалось, була активація TNF-рецепторів, яка виявила клінічну перспективу [Aggarwal and Natarajan (1996) *Eur Cytokine Netw.* 7 (2): 93-124]. Активація TNF-рецепторів може ініціювати загибель клітин в клітинах-мішенях, і, отже, застосування до пухлин було і все ще залишається привабливим [Eggemont et al. (1996) *Ann. Surg.* 224 (6): 756-765]. Цей рецептор може активуватися або введенням ліганду, тобто природним шляхом, або деякими антитілами, які можуть зшивати рецептор і є також сильними агоністами. Антитіла могли б мати перевагу в онкології, оскільки вони можуть зберігатися в крові протягом тривалих періодів, тоді як ліганди звичайно мають коротку тривалість життя в крові. Оскільки багато які з цих рецепторів можуть експресуватись більш селективно в пухлинах або вони можуть тільки передавати сигнал загибелі клітин або диференціювання в пухлинах, агоністичні антитіла могли б бути хорошою зброєю для лікування раку. Подібним чином, численні позитивні імунологічні події опосередковуються через рецептори TNF-сімейства, наприклад, запальні реакції хазяїна, продукування антитіл і т.д., і, отже,

агоністичні антитіла могли б мати корисні ефекти в інших, неонкологічних застосуваннях.

Парадоксально, інгібування шляху може мати клінічну користь при лікуванні пухлин. Наприклад, деякими пухлинами експресується Fas-ліганд, і ця експресія може приводити до загибелі Fas-позитивних лімфоцитів, полегшуючи тим самим здатність пухлини ухилятися від дії імунної системи. У цьому випадку інгібування Fas-системи могло б потім дозволити імунній системі реагувати з пухлиною іншими шляхами тепер, коли доступ є можливим [Green and Ware (1997) *Proc. Natl( Acad. Sci. USA* 94 (12): 5986-90].

Ліганд BAFF TNF-сімейства, також відомий як TALL-1, THANK, BLyS і zTNF4 [Schneider et al. (1999) *J. Exp. Med.* 189 (11): 1747-1756; Shu et al. (1999) *J. Leukoc. Biol.* 65 (5): 680-683; Mukhopadhyay et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274 (23): 15978-15981; Moore et al. (1999) *Science* 285 (5425): 260-263; Gross et al. (2000) *Nature* 404 (6781): 995-999] посилює виживання В-клітин *in vitro* [Batten et al. (2000) *J. Exp. Med.* 192 (10): 1453-1466] і стає ключовим регулятором популяції периферичних В-клітин *in vivo*. Миші, які понадекспресують BAFF, виявляють гіперплазію зрілих В-клітин і симптоми системного червоного вовчака (SLE) [Mackay et al. (1999) *J. Exp. Med.* 190 (11): 1697-1710]. Деякі пацієнти з SLE мають також значуще збільшені рівні BAFF в їх сироватці [Zhang et al. (2001) *J. Immunol.* 166 (1): 6-10]. Таким чином, було зроблене припущення, що аномально високі рівні цього ліганду можуть сприяти патогенезу аутоімунних захворювань за допомогою посилення виживання аутореактивних В-клітин [Batten et al. (2000) *J. Exp. Med.* 192 (10): 1453-1466].

BAFF, мембранний білок типу 2, продукується клітинами мієлоїдного походження [Schneider et al. (1999) *J. Exp. Med.* 189 (11): 1747-1756; Moore et al. (1999) *Science* 285 (5425): 260-263] і експресується або на клітинній поверхні, або знаходиться в розчинній формі [Schneider et al. (1999) *J. Exp. Med.* 189 (11): 1747-1756]. Раніше було показано, що два члени сімейства TNF-рецепторів, BCMA і TACI, взаємодіють з BAFF [Gross et al. (2000) *Nature* 404: 995-999; Thompson et al. (2000) *J. Exp. Med.* 192 (1): 129-135; Xia et al. (2000) *J. Exp. Med.* 192: 137-143; Marsters et al. (2000) *Curr. Biol.* 10 (13): 785-788; Shu et al. (2000) *J. Leukoc. Biol.* 65 (5): 680-683; Wu et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 35478-35485].

Даний винахід оснований, частково, на виявленні "BAFF-R", рецепторного білка BAFF, полінуклеотидних послідовностей BAFF-R і поліпептидів BAFF-R, що кодуються цими послідовностями нуклеїнових кислот.

В одному аспекті даний винахід забезпечує ізольовану молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує BAFF-R-поліпептид, або її фрагмент або похідне. Ця нуклеїнова кислота може включати в себе, наприклад, послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид, щонайменше, на 50% ідентичний, або, щонайменше, на 90% ідентичний поліпептиду, що включає амінокислотну послідовність Фіг.2D (SEQ ID NO:5).

Даний винахід забезпечує також по суті чисту молекулу нуклеїнової кислоти, що містить послідовність, яка гібридизується при жорстких умовах з гібридизаційним зондом, причому послідовність нуклеїнової кислоти цього зонда складається з кодуючої послідовності Фіг.2A (SEQ ID NO:3), Фіг.2C (SEQ ID NO:4) або комплекменту вказаної кодуючої послідовності.

У деяких варіантах послідовність нуклеїнової кислоти кодує поліпептид, що має послідовність Фіг.2D (SEQ ID NO:5) з, щонайменше, однією консервативною заміною амінокислоти.

У деяких варіантах послідовність нуклеїнової кислоти кодує поліпептид, який зв'язує BAFF.

Нуклеїнова кислота може включати в себе, наприклад, нуклеїнову кислоту, що включає в себе нуклеотидну послідовність, показану на Фіг.1A (SEQ ID NO:1), Фіг.1B (SEQ ID NO:2), Фіг.2A (SEQ ID NO:3), Фіг.2C (SEQ ID NO:4) і Фіг.3 (SEQ ID NO:6).

Нуклеїнова кислота може бути, наприклад, фрагментом геномної ДНК, або вона може бути молекулою кДНК. У даний винахід включені також вектор, що містить одну або декілька з описаних тут нуклеїнових кислот, і клітина, що містить описані тут вектори або нуклеїнові кислоти.

В іншому аспекті даний винахід забезпечує по суті чисту молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує злитий білок, що включає, щонайменше, два сегменти, де один з цих сегментів включає поліпептид або його фрагмент, описані в амінокислотних послідовностях, приведених у вказаних вище варіантах даного винаходу. Даний винахід забезпечує також злитий білок, що включає, щонайменше, два або три сегменти, де перший сегмент включає гетерологічний сигнальний поліпептид, другий включає поліпептид або його фрагмент, описані в амінокислотних послідовностях BAFF-R, вказаних в приведених вище варіантах даного винаходу, і третій сегмент включає поліпептид імуноглобуліну. Альтернативно, перший сегмент включає фрагмент поліпептиду імуноглобуліну, що містить сигнальну послідовність, а другий сегмент включає фрагмент поліпептиду BAFF-R.

В інших аспектах даний винахід забезпечує по суті чистий зв'язувальний агент, який специфічно зв'язується з поліпептидом вищезгаданих варіантів даного винаходу.

Даний винахід відноситься також до клітин-хазяїв, трансформованих рекомбінантним експресуючим вектором, що містить будь-яку з вищеописаних молекул нуклеїнових кислот.

В іншому аспекті даний винахід включає в себе фармацевтичну композицію, яка включає в себе нуклеїнову кислоту BAFF-R і фармацевтично прийнятний носій або розріджувач.

У наступному аспекті даний винахід включає в себе по суті очищений поліпептид BAFF-R, наприклад, будь-який з поліпептидів, що кодуються нуклеїновою кислотою BAFF-R.

Даний винахід включає в себе також фармацевтичну композицію, яка включає в себе поліпептид BAFF-R і фармацевтично прийнятний носій або розріджувач.



Ще в одному варіанті даний винахід забезпечує антитіло, яке зв'язується специфічно з поліпептидом BAFF-R. Це антитіло може бути, наприклад, моноклональним або поліклональним антитілом. Даний винахід включає в себе також фармацевтичну композицію, що включає в себе BAFF-R-антитіло і фармацевтично прийнятний носій або розріджувач. Даний винахід відноситься також до виділених антитіл, які зв'язуються з епітопом на поліпептиді, що кодується будь-якою з молекул нуклеїнових кислот, описаних вище.

Далі, даний винахід відноситься до наборів, що містять антитіла, які зв'язуються з поліпептидом, що кодується будь-якою з молекул нуклеїнових кислот, описаних вище, і антитіло негативного контролю.

Даний винахід забезпечує, далі, спосіб для одержання поліпептиду BAFF-R. Цей спосіб передбачає забезпечення клітини, що містить нуклеїнову кислоту BAFF-R, наприклад, вектора, який включає в себе нуклеїнову кислоту BAFF-R, і культивування цієї клітини в умовах, достатніх для експресії поліпептиду BAFF-R, що кодується цією нуклеїноювю кислотою. Потім експресований поліпептид BAFF-R витягують з даної клітини. Переважно, клітина продукує мало ендogenousного поліпептиду BAFF-R або взагалі не продукує ендogenousний поліпептид BAFF-R. Ця клітина може бути, наприклад, прокариотичною клітиною або еукариотичною клітиною.

Даний винахід забезпечує спосіб індукції імунної відповіді у ссавця проти поліпептиду, що кодується будь-якою з описаних вище молекул нуклеїнових кислот, введенням цьому ссавцеві кількості поліпептиду, достатньої для індукції імунної відповіді.

Даний винахід відноситься також до способів ідентифікації сполуки, яка зв'язується з поліпептидом BAFF-R, за допомогою контактування поліпептиду BAFF-R зі сполукою і визначення, чи зв'язується ця сполука з поліпептидом BAFF-R.

Даний винахід відноситься також до способів ідентифікації сполуки, яка зв'язується з молекулою нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид BAFF-R, за допомогою контактування нуклеїнової кислоти BAFF-R зі сполукою і визначення, чи зв'язується ця сполука з цією молекулою нуклеїнової кислоти.

Даний винахід забезпечує також способи ідентифікації сполуки, яка модулює активність поліпептиду BAFF-R, за допомогою контактування поліпептиду BAFF-R зі сполукою і визначення, чи модифікована активність цього поліпептиду BAFF-R.

Даний винахід відноситься також до сполук, які модулюють активність поліпептиду BAFF-R, ідентифікованих за допомогою контактування поліпептиду BAFF-R зі сполукою і визначення, чи модифікує ця сполука активність поліпептиду BAFF-R, зв'язується з поліпептидом BAFF-R або зв'язується з молекулою нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид BAFF-R.

В іншому аспекті даний винахід забезпечує спосіб діагностики опосередкованого В-клітинами стану, наприклад, аутоімунного порушення або раку, у суб'єкта. Цей спосіб передбачає забезпе-

чення проби білка з суб'єкта і вимірювання кількості поліпептиду BAFF-R в цій пробі суб'єкта. Потім кількість BAFF-R в пробі суб'єкта порівнюють з кількістю поліпептиду BAFF-R в контрольній пробі білка. Зміна в кількості поліпептиду BAFF-R в пробі білка суб'єкта відносно кількості поліпептиду BAFF-R в контрольній пробі білка вказує на те, що суб'єкт має опосередкований В-клітинами стан. Контрольну пробу переважно беруть з відповідного індивідуума, тобто індивідуума схожого віку, тієї ж статі або іншого загального стану, але в якому не передбачається наявності цього стану. Альтернативно, контрольна проба може бути взята з суб'єкта в той час, коли в цьому суб'єкті не передбачали наявності даного порушення. У деяких варіантах, поліпептид BAFF-R детектують з використанням BAFF-R-антитіла.

У наступному аспекті даний винахід включає в себе спосіб діагностики опосередкованого В-клітинами стану, наприклад, аутоімунного порушення у суб'єкта. Цей спосіб передбачає забезпечення проби нуклеїнової кислоти, наприклад, РНК або ДНК, або обох, з суб'єкта і вимірювання кількості цієї нуклеїнової кислоти BAFF-R в пробі нуклеїнової кислоти суб'єкта.

Потім цю кількість нуклеїнової кислоти BAFF-R в пробі нуклеїнової кислоти суб'єкта порівнюють з кількістю нуклеїнової кислоти BAFF-R в контрольній пробі. Зміна в кількості нуклеїнової кислоти BAFF-R в даній пробі відносно кількості нуклеїнової кислоти BAFF-R в контрольній пробі вказує на те, що даний суб'єкт має аутоімунний стан.

У наступному аспекті даний винахід включає в себе спосіб діагностики онкогенного або аутоімунного стану у суб'єкта. Цей спосіб передбачає забезпечення проби нуклеїнової кислоти з суб'єкта та ідентифікацію, щонайменше, частини нуклеотидної послідовності нуклеїнової кислоти BAFF-R в пробі нуклеїнової кислоти суб'єкта. Потім цю кількість нуклеотидної послідовності BAFF-R в пробі суб'єкта порівнюють з нуклеотидною послідовністю BAFF-R контрольної проби. Зміна в нуклеотидній послідовності BAFF-R в пробі відносно нуклеотидної послідовності BAFF-R у вказаній контрольній пробі вказує, що суб'єкт має такий стан.

У ще одному аспекті даний винахід забезпечує спосіб лікування або попередження або сповільнення опосередкованого В-клітинами стану. Цей спосіб включає в себе введення суб'єкту, для якого бажане таке лікування або попередження або сповільнення, нуклеїнової кислоти BAFF-R, поліпептиду BAFF-R або aHTH-BAFF-антитіла в кількості, достатній для лікування, попередження або сповільнення онкогенного або імунорегуляторного стану у суб'єкта.

Стани, що діагностуються, які піддаються лікуванню, попереджаються або сповільнюються з використанням молекул нуклеїнових кислот BAFF-R, поліпептидів BAFF-R або BAFF-R-антитіл, можуть бути раком або імунорегуляторним захворюванням. Ці захворювання включають в себе захворювання, які є аутоімунними за природою, такі як системний червоний вовчак, ревматоїдний артрит, важка псевдопаралітична міастенія, аутоімун-

на гемолітична анемія, ідіопатична тромбоцитопенічна пурпура, антифосфоліпідний синдром, хвороба Шагаса, хвороба Грейвса, гранулематоз Вегенера, нодозний поліартеріїт і швидко прогресуючий гломерулонефрит. Цей терапевтичний агент має також застосування в порушеннях плазматичних клітин, таких як множинна мієлома, макроглобулінемія Вальденстрема, хвороба з ураженням важких ланцюгів імуноглобуліну, первинний або імуноцит-асоційований амілоїдоз і моноклональна гаммапатія невстановленої етіології (MGUS). Онкологічні мішені включають в себе В-клітинні карциноми, лейкоз і лімфоми.

Композиції і способи лікування з використанням нуклеїнових кислот, поліпептидів і антитіл даного винаходу можуть застосовуватися при будь-якому стані, пов'язаному з небажаною проліферацією клітин. Зокрема, даний винахід може бути використаний для лікування пухлинних клітин, які експресують BAFF і/або BAFF-R.

Композиції даного винаходу, що містять агоністи BAFF-R (такі як антитіла, які зв'язуються з BAFF-R і імітують BAFF), також можуть бути використані для лікування імунної недостатності, наприклад, пов'язаних з низькими кількостями В-клітин. Такі порушення можуть бути зумовлені, наприклад, опроміненням і/або хіміотерапією.

В іншому аспекті даного винаходу забезпечений спосіб зменшення агрегації рекомбінантно експресованого білка. Цей спосіб передбачає порівняння гомологів білка або його злитого білка для визначення консервативних доменів і неідентичних амінокислот в консервативних доменах. Звичайно, щонайменше, одну неполярну амінокислоту замінюють на незаряджену полярну амінокислоту, або на пролін, аланін або серин.

Якщо немає інших вказівок, всі технічні і наукові терміни, що використовуються тут, мають те ж саме значення, яке розуміється фахівцями з кваліфікацією в області, до якої відноситься цей винахід. Хоча способи і матеріали, схожі з описаними тут або еквівалентні описаним тут, можуть бути використані на практиці або при тестуванні даного винаходу, відповідні способи і матеріали описані нижче. Всі публікації, патентні заявки, патенти та інші посилання, що згадуються тут, включені як посилання в їх повному вигляді. У разі суперечності, контролем буде даний опис, в тому числі і відносно визначень. Крім того, матеріали, способи і приклади є тільки ілюстративними і не призначені для обмеження даного винаходу.

Інші ознаки і переваги даного винаходу будуть очевидними з наступного докладного опису і формули винаходу.

Фіг.1А показує ДНК-послідовність кДНК BJAB (SEQ ID NO:1), клоновану в рJST576.

Фіг.1В показує повну ДНК-послідовність кДНК клону IMAGE 2000271 (EST A1250289) (SEQ ID NO:2).

Фіг.2А показує нуклеотидну послідовність JST576 з видаленим інтроном, передбачену програмою GENESCAN (SEQ ID NO:3).

Фіг.2В показує 1% агарозний гель ПЛР-продуктів, одержаних для BAFF-R з використанням або кДНК першого ланцюга, генерованої з

РНК BJAB або IM-9, або на кДНК JST576. Доріжка 1. Продукт HindIII-розщеплення лямбда-ДНК. Доріжка 2. Оліго-dT-праймований продукт BAF-225/BAF-191 BJAB. Доріжка 3. Оліго-dT-праймований продукт BAF-226/BAF-191 BJAB. Доріжка 4. Випадково праймований продукт BAF-225/BAF-191 BJAB. Доріжка 5. Випадково праймований продукт BAF-226/BAF-191 BJAB. Доріжка 6. Оліго-dT-праймований продукт BAF-225/BAF-191 IM-9. Доріжка 7. Оліго-dT-праймований продукт BAF-226/BAF-191 IM-9. Доріжка 8. Випадково праймований продукт BAF-225/BAF-191 IM-9. Доріжка 9. Випадково праймований продукт BAF-226/BAF-191 IM-9. Доріжка 10. В BAF-225/BAF-191 кДНК JST576. Доріжка 11. BAF-226/BAF-191 кДНК JST576. Доріжка 12. BAF-225/BAF-191 без матриці. Доріжка 13. BAF-226/BAF-191 без матриці.

Фіг.2С показує послідовність зрілого JST576 (BAFF-R) (SEQ ID NO:4) (також номер доступу GenBank AF373846), визначену секвенуванням маси ПЛР-продукту, що фланкує передбачений інтрон з кДНК першого ланцюга BJAB.

Фіг.2D показує амінокислотну послідовність BAFF-R (JST576) (SEQ ID NO:5). Залишок А (Ala) (жирний шрифт) вказує послідовність, що утворюється внаслідок використання альтернативного акцепторного сайту сплайсингу. Передбачений трансмембранний домен взятий в блок, а передбачуваний сигнал зупинки транспорту є підкресленим.

Фіг.3 показує сплайсовану версію JST576 (SEQ ID NO:6), що містить 5'-UTR-послідовність, одержану ОТ-ПЛР з кДНК першого ланцюга селезінки людини, і виведену амінокислотну послідовність (SEQ ID NO:7). Ця послідовність містить стоп-кодон зліва в рамці зчитування з АТС.

Фіг.4А показує послідовність кДНК мишачого BAFF-R (SEQ ID NO:8) (також номер доступу GenBank AF373847).

Фіг.4В показує амінокислотну послідовність мишачого BAFF-R (SEQ ID NO:9). Залишки Cys надруковані жирним шрифтом і підкреслені, а передбачений трансмембранний район взятий в блок.

Фіг.4С показує гомологію між послідовностями білків BAFF-R людини (SEQ ID NO:10) і миші (SEQ ID NO:9).

Фіг.5 зображає скріплення BAFF людини з трансфікованими JST576 клітинами. Клітини 293EBNA котрансфікували рJST576 або CA336 (huTACI) і репортерною конструкцією GFP. Клітини аналізували на скріплення BAFF з 1мкг/мл біотинізованого тус-huBAFF з подальшим додаванням SAV-PE.

Фіг.6 показує скріплення BAFF людини і миші з JST576-трансфікованими клітинами. Клітини 293EBNA котрансфікували рJST576 і репортерною конструкцією GFP. Клітини аналізували через 24 години на скріплення BAFF з 5мкг/мл flag-huBAFF або flag-muBAFF з подальшим додаванням моноклонального антитіла M2 проти flag і мавпячого антимишачого IgG-PE.

Фіг.7 показує, що APRIL не зв'язується з JST576-трансфікованими клітинами. Клітини 293EBNA котрансфікували рJST576 або CA336

(huTACI) і репортерною, конструкцією GFP. Клітини аналізували на скріплення APRIL з 1мкг/мл мус- $\mu$ APRIL з подальшим додаванням анти- $\mu$ APRIL щурячого IgG, біотинільованого анти-щурячого FcG2b і SAV-PE.

Фіг.8 показує, що BAFF осаджує білок з JST576-трансфікованих клітин. Клітини 293EBNA котрансфікували або BAFF-R (pJST576), тільки вектором (CH269), або huTACI (CA336) і короткочасно мітили  $^{35}$ S-цистеїном і метіоніном. Екстракти імунопреципітували з використанням flag-huBAFF і піддавали електрофорезу в відновлювальних умовах на ДСН-ПААГ. Маркери молекулярної маси вказані зліва.

Фіг.9 зображає послідовність нуклеїнової кислоти (SEQ ID NO:11) і виведену з неї амінокислотну послідовність (SEQ ID NO:12) гена, що кодує злитий білок huBAFF-R:Fc: нуклеотиди 1-63 кодують сигнальну послідовність мишачого IgG-каппа; нуклеотиди 64-66 використали для введення сайту рестриктази, нуклеотиди 67-276 кодують частину позаклітинного домену BAFF-R, нуклеотиди 277-279 використали для введення сайту рестриктази і нуклеотиди 280-960 кодують Fc-район IgG1 людини.

Фіг.10 зображає результати Нозерн-блот-аналізу з використанням EcoNI-фрагмента JST576 як зонд. Всі експозиції становили 4 дні. 10A: Clontech human Immune II blot; 10B; Clontech human 12 lane multi-tissue blot; 10C: Clontech human multi-tissue II blot.

Фіг.11 показує результат Нозерн-блот-аналізу 20мкг тотальної РНК, виділеної з різних клітинних ліній. Цей блот зондували фрагментом рестрикції EcoNI JST576 і експонували протягом 4 днів. Здатність цих клітинних ліній зв'язувати BAFF, визначена FACS-аналізом, вказана нижче доріжки.

Фіг.12 показує результати імунопреципітації з використанням BAFF-R:Fc. BAFF людини імунопреципітується за допомогою BAFF-R:Fc або BCMA:Fc, але не Fn14-Fc. Контрольний білок BAFF показаний в доріжці 1.

Фіг.13 показує, що злитий білок BAFF-R людини:Fc блокує скріплення BAFF людини з клітинами BJAB. Результати FACS-аналізу показані на Фіг.13A. Крива E представляє скріплення біотинільованого BAFF з клітинами BJAB у відсутності BAFF-R:Fc. Криві B-D представляють здатність BAFF зв'язуватися з клітинами BJAB в присутності 5мкг/мл, 1мкг/мл або 0,2мкг/мл., відповідно. Крива A є єдиною кривою другої стадії. Фіг.13B ілюструє здатність різних концентрацій BAFF-R:Fc (квадрати) в порівнянні з TACI:Fc (трикутники) або неспецифічного злитого білка LT\_R:Fc (кружки) блокувати скріплення BAFF з експресуючими рецептор клітинами BJAB.

Фіг.14 показує здатність BAFF-R:Fc блокувати BAFF-індуковану ко-стимуляцію В-клітин селезінки. Показаний графік включення [ $^3$ H]-тимідину (імп/хв.) в залежності від кількостей hBAFF (нг/мл), що збільшуються.

Фіг.15 показує, що обробка BAFF-R:FcI приводить до втрати периферичних В-клітин у здорової миші.

Фіг.16 показує, що обробка мишей злитим білком BAFF-R:Fc людини і миші знижує число B220+ В-клітин селезінки.

Фіг.17 показує, що введення BAFF-R:Fc мишам знижує процент B220+ В-клітин лімфатичних вузлів.

Фіг.18 показує, що введення BAFF-R:Fc мишам знижує процент B220+ В-клітин периферичної крові.

Фіг.19A показує дані FACS для супернатантів чотирьох клонів, які продукують антитіла, які зв'язують BAFF-R. Показаний також контрольний супернатант, який не містить антитіл, що зв'язують BAFF-R.

Фіг.19B показує гістограму, яка показує, що два клони блокують скріплення BAFF з BAFF-R. (a) показує контроль без BAFF; (b) показує блокуючу активність антитіла з клону 2; (c) показує блокуючу здатність антитіла з клону 9; (d) показує криву для контрольного антитіла, яке не зв'язує BAFF-R.

Фіг.20 показує зіставлення амінокислотних послідовностей позаклітинних доменів BAFF-R:Fc людини (hBAFF-R) і BAFF-R:Fc миші (mBAFF-R) і процент агрегації, що спостерігається при експресії злитих з Fc білків, що містять вказані послідовності. Пронумеровані клони JST представляють амінокислотні послідовності, що виявляють мутації (підкреслені) у вихідних послідовностях і одержану агрегацію експресованого білка. Показані часткові послідовності для BAFF-R людини (амінокислоти 2-71 послідовності SEQ ID NO:10; SEQ ID NO:13) і миші (амінокислоти 2-66 послідовності SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:14); і відповідні частини наступних клонів: JST659 (SEQ ID NO:15), JST660 (SEQ ID NO:16), JST661 (SEQ ID NO:17), JST662 (SEQ ID NO:18), JST663 (SEQ ID NO:19), JST673 (SEQ ID NO:20), JST674 (SEQ ID NO:21), JST675 (SEQ ID NO:22), JST672 (SEQ ID NO:23), JST676 (SEQ ID NO:24), JST671 (SEQ ID NO:25), JST677 (SEQ ID NO:26) JST678 (SEQ ID NO:27), JST664 (SEQ ID NO:28), JST668 (SEQ ID NO:29), JST665 (SEQ ID NO:30), JST666 (SEQ ID NO:31) і JST667 (SEQ ID NO:32).

Фіг.21 показує радіоавтограф білків, імунопреципітованих з використанням лізатів, приготованих з клітин, трансфікованих BAFF-R-i.c.d. (внутрішньоклітинний домен BAFF-R) (доріжка 1), або трансфікованих контрольним вектором клітин (доріжка 2). Приблизно  $6 \times 10^6$  клітин 293 Е трансфікували конструкцією, що кодує BAFF-R-i.c.d. або псевдо- («пустою») плазмідом. Через 48 годин клітини метаболічно мітили  $^{35}$ S протягом 24 годин, лізували буфером для лізису, заздалегідь освітлювали і імунопреципітували антитілом anti-мус mAB, 9E10. Імунопреципітати розділяли електрофорезом на 10-20% ПААГ-ДСН при відновлювальних умовах.

Посилальні роботи, патенти, патентні заявки і наукова література, в тому числі номери доступу для послідовностей бази даних GenBank, на які даються посилання тут, доводять знання їх фахівцями з кваліфікацією в даній області і включені тут як посилання в їх повному об'ємі тією ж самою мірою, як якщо б кожна з них була конкретно і індивідуально вказана як включена як посилання. Будь-

яка суперечність між будь-яким цитованим тут посиланням і конкретними описами даної заявки повинні вирішуватися на користь останньої. Подібно цьому, будь-яка суперечність між визначенням слова, що визнається в даній області, або фрази і визначенням слова або фрази, що конкретно даються в даному описі, повинно вирішуватися на користь останнього.

Стандартні посилальні роботи, що викладають загальні принципи технології рекомбінантних ДНК, відомі фахівцям з кваліфікацією в даній області, включають в себе [Ausubel et al. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York (1998); Sambrook et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2D ED., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York (1989); Kaufman et al., Eds., HANDBOOK OF MOLECULAR AND CELLULAR METHODS IN BIOLOGY AND MEDICINE, CRC Press, Boca Raton (1995); McPherson, Ed., DIRECTED MUTAGENESIS: A PRACTICAL APPROACH, IRL Press, Oxford (1991)].

Даний винахід описує нуклеїнові кислоти BAFF-R, ізолювані нуклеїнові кислоти, які кодуєть поліпептид BAFF-R або його частину, поліпептиди BAFF-R, вектори, що містять ці нуклеїнові кислоти, клітини-хазяї, трансформовані цими нуклеїновими кислотами BAFF-R, антитіла проти BAFF-R і фармацевтичні композиції. Описані також способи одержання поліпептидів BAFF-R, а також способи скринінгу, діагностики, лікування станів з використанням цих сполук і способи скринінгу сполук, які модулюють активність поліпептиду BAFF-R.

Нуклеїнові кислоти і поліпептиди BAFF-R, а також BAFF-R-антитіла, а також фармацевтичні композиції, що обговорюються тут, застосовні, *inter alia*, для лікування раку і/або імунорегуляторних станів. Ці порушення включають в себе, наприклад, опосередковані В-клітинами захворювання, які є аутоімунними за природою, такі як системний червоний вовчак, ревматоїдний артрит, важка псевдопаралітична міастенія, аутоімунна гемолітична анемія, ідіопатична тромбоцитопенічна пурпура, антифосфоліпідний синдром, хвороба Шагаса, хвороба Грейвса, гранулематоз Вегенера, нодозний поліартеріт і швидко прогресуючий гломерулонефрит. Цей терапевтичний агент має також застосування при порушеннях плазматичних клітин, таких як множинна мієлома, макроглобулінемія Вальденстрема, хвороба з ураженням важких ланцюгів імунoglobulinу, первинний або імуніцит-асоційований амілоїдоз і моноклональна гаммапатія невстановленої етіології (MGUS). Онкологічні мішені включають в себе В-клітинні карциноми, лейкоз і лімфоми.

Нуклеїнові кислоти BAFF-R

Один аспект даного винаходу відноситься до ізолюваних молекул нуклеїнових кислот, які кодуєть білки BAFF-R або їх біологічно активні частини. Включені також фрагменти нуклеїнових кислот, достатні для їх використання як гібридизаційних зондів для ідентифікації BAFF-R-кодуєчих нуклеїнових кислот (наприклад, мРНК BAFF-R), або фрагменти для використання як праймерів полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для ампліфікації або

мутації молекул нуклеїнових кислот BAFF-R. У застосуванні тут термін «молекула нуклеїнової кислоти» включає в себе молекули ДНК (наприклад, кДНК або геномну ДНК), молекули РНК (наприклад, мРНК), аналоги ДНК або РНК, що генеруються з використанням аналогів нуклеотидів, і їх похідні, фрагменти і гомологи. Молекула нуклеїнової кислоти може бути одноланцюговою або дволанцюговою, але переважно є дволанцюговою ДНК.

Термін «зонди» відноситься до послідовностей нуклеїнових кислот варіабельної довжини, переважно між, щонайменше, 10 нуклеотидами (нт) або приблизно, наприклад, 6000нт, в залежності від застосування. Зонди використовують для детектування ідентичних, схожих або комплементарних послідовностей нуклеїнових кислот. Зонди більшої довжини звичайно одержують з природного або рекомбінантного джерела, вони є високоспецифічними і гібридизуються набагато повільніше, ніж олігомери. Зонди можуть бути одно- або дволанцюговими і конструюються таким чином, щоб вони мали специфічність в ПЛР, способах гібридизації на основі мембрани або ELISA-подібних способах.

«Ізолюваною» молекулою нуклеїнової кислоти називають молекулу, яка відділена від інших молекул нуклеїнових кислот, які присутні в природному джерелі даної нуклеїнової кислоти. Приклади ізолюваних молекул нуклеїнових кислот включають в себе, але не обмежуються ними, рекомбінантні молекули ДНК, що містяться у векторі, рекомбінантні молекули ДНК, що підтримуються в гетерологічній клітині-хазяїні, частково або по суті очищені молекули нуклеїнових кислот і синтетичні ДНК- або РНК-молекули. Переважно, «ізолювана» молекула нуклеїнової кислоти не містить послідовностей, які природно фланкують цю нуклеїнову кислоту (тобто послідовностей, локалізованих на 5'- і 3'-кінцях цієї нуклеїнової кислоти) в геномній ДНК організму, з якого одержана дана нуклеїнова кислота. Наприклад, в різних варіантах ізолювана молекула нуклеїнової кислоти BAFF-R може містити менше ніж приблизно 50т.п.н., 25т.п.н., 5т.п.н., 4т.п.н., 3т.п.н., 2т.п.н., 1т.п.н. 0,5т.п.н. або 0,1т.п.н. нуклеотидних послідовностей, які природно фланкують дану молекулу нуклеїнової кислоти в геномній ДНК клітини, з якої одержана ця нуклеїнова кислота. Крім того, «ізолювана» молекула нуклеїнової кислоти, така як молекула кДНК, може по суті не містити іншого клітинного матеріалу або культурального середовища при одержанні рекомбінантними способами або при одержанні з хімічних попередників при хімічному синтезі.

Молекула нуклеїнової кислоти даного винаходу, наприклад, молекула нуклеїнової кислоти, що має нуклеотидну послідовність Фіг.1А (SEQ ID NO:1), Фіг.1В (SEQ ID NO:2), Фіг.2А (SEQ ID NO:3), Фіг.2С (SEQ ID NO:4) і Фіг.3 (SEQ ID NO:6) або компонент будь-якої з цих нуклеотидних послідовностей, може бути ізолювана з використанням стандартних способів молекулярної біології і забезпеченої тут інформації про послідовності. З використанням повних послідовностей або частини послідовностей нуклеїнових кислот Фіг.1А, В,

2A, C і 3 як гібридизаційного зонда, послідовності нуклеїнових кислот BAFF-R можуть бути ізольовані з використанням стандартної гібридизації і стандартних способів клонування [наприклад, як описано в Sambrook et al., Eds., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL 2ND ED., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989; і Ausubel, et al., Eds., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, NY, 1993].

Нуклеїнова кислота даного винаходу може бути ампліфікована з використанням кДНК, мРНК або, альтернативно, геномної ДНК як матриці і відповідних олігонуклеотидних праймерів згідно зі стандартними способами ПЛР-ампліфікації. Ампліфікована таким чином нуклеїнова кислота може бути клонована у відповідний вектор і охарактеризована аналізом секвенування ДНК. Крім того, олігонуклеотиди, відповідні нуклеотидним послідовностям BAFF-R, можуть бути одержані стандартними синтетичними способами, наприклад, з використанням автоматичного ДНК-синтезатора.

У застосуванні тут термін «олігонуклеотид» відноситься до ряду пов'язаних нуклеотидних залишків, причому олігонуклеотид має достатнє число нуклеотидних основ для використання в ПЛР-реакції. Коротка олігонуклеотидна послідовність може бути основана на геномній або кДНК-послідовності або сконструйована з геномної або кДНК-послідовності і використана для ампліфікації, підтвердження або виявлення присутності ідентичної, схожої або комплементарної ДНК або РНК в конкретній клітині або тканині. Олігонуклеотиди включають частини послідовності нуклеїнової кислоти, що мають, щонайменше, приблизно 10 нуклеотидів і так багато, як 50 нуклеотидів, переважно приблизно 15-30 нуклеотидів. Вони можуть бути синтезовані хімічно і можуть бути використані як зонди.

В іншому варіанті ізольована молекула нуклеїнової кислоти даного винаходу включає молекулу нуклеїнової кислоти, яка є комплементом нуклеотидної послідовності, показаної на Фіг.1A (SEQ ID NO:1), Фіг.1B (SEQ ID NO:2), Фіг.2A (SEQ ID NO:3), Фіг.2C (SEQ ID NO:4) і Фіг.3 (SEQ ID NO:6). В іншому варіанті ізольована молекула нуклеїнової кислоти даного винаходу включає молекулу нуклеїнової кислоти, яка є комплементом нуклеотидної послідовності, показаної на Фіг.1A (SEQ ID NO:1), Фіг.1B (SEQ ID NO:2), Фіг.2A (SEQ ID NO:3), Фіг.2C (SEQ ID NO:4) і Фіг.3 (SEQ ID NO:6), або частиною цієї нуклеотидної послідовності. Молекула нуклеїнової кислоти, яка комплементарна нуклеотидній послідовності, показаної на Фіг.1A (SEQ ID NO:1), Фіг.1B (SEQ ID NO:2), Фіг.2A (SEQ ID NO:3), Фіг.2C (SEQ ID NO:4) і Фіг.3 (SEQ ID NO:6), є послідовністю, яка є досить комплементарною нуклеотидній послідовності, показаній на Фіг.1A (SEQ ID NO:1), Фіг.1B (SEQ ID NO:2), Фіг.2A (SEQ ID NO:3), Фіг.2C (SEQ ID NO:4) і Фіг.3 (SEQ ID NO:6), щоб вона могла зв'язуватися водневими зв'язками з малою кількістю помилкових спаровувань або взагалі без помилкових спаровувань з нуклеотидною послідовністю, показаною на Фіг.1A (SEQ ID NO:1), Фіг.1B (SEQ ID NO:2), Фіг.2A (SEQ ID NO:3), Фіг.2C (SEQ

ID NO:4) і Фіг.3 (SEQ ID NO:6), з утворенням за допомогою цього стабільного дуплекса.

У застосуванні тут термін «комплементарне» відноситься до спаровування основ за Уотсоном-Криком або Хугстіном між нуклеотидними ланками молекули нуклеїнової кислоти, і термін «скріплення» означає фізичну або хімічну взаємодію між двома поліпептидами або сполуками або пов'язаними поліпептидами або сполуками, або їх комбінаціями. Скріплення включає в себе іонні, неіонні, ван-дер-ваальсові, гідрофобні взаємодії і т.д. Фізична взаємодія може бути або прямою, або опосередкованою. Посередні взаємодії можуть відбуватися за допомогою або внаслідок дій іншого поліпептиду або сполуки. Прямим скріпленням називають взаємодії, які не відбуваються за допомогою або без допомоги дії іншого поліпептиду або сполуки, а здійснюються без інших істотних хімічних проміжних продуктів.

Крім того, молекула нуклеїнової кислоти даного винаходу може включати тільки частину послідовності нуклеїнової кислоти Фіг.1A (SEQ ID NO:1), Фіг.1B (SEQ ID NO:2), Фіг.2A (SEQ ID NO:3), Фіг.2C (SEQ ID NO:4) і Фіг.3 (SEQ ID NO:6), наприклад, фрагмент, який може бути використаний як зонд або праймер, або фрагмент, що кодує біологічно активну частину BAFF-R. Забезпечені тут фрагменти визначаються як послідовності з довжиною з, щонайменше, 6 нуклеотидів, що безперервно йдуть одним за одним або, щонайменше, 4 амінокислот, що безперервно йдуть одна за одною, достатньої для можливості специфічної гібридизації у разі нуклеїнових кислот або для специфічного пізнання епітопу у разі амінокислот, відповідно, і вони є щонайбільше меншими, ніж повнорозмірна послідовність. Фрагменти можуть бути одержані з будь-якої безперервної частини переважної послідовності нуклеїнової кислоти або амінокислотної послідовності. Похідними є послідовності нуклеїнових кислот або амінокислотні послідовності, утворені з природних сполук або безпосередньо, або модифікацією, або частковою заміною. Аналогами є послідовності нуклеїнових кислот або амінокислотні послідовності, які мають структуру, схожу, але не ідентичну відносно природної сполуки, але відрізняються від неї відносно певних компонентів або бічних ланцюгів. Аналоги можуть бути синтетичними або мати відмінне еволюційне походження і можуть мати схожу або протилежну метаболічну активність в порівнянні з активністю дикого типу.

Похідні і аналоги можуть бути повнорозмірними або мати іншу довжину, якщо похідне або аналог містить модифікований нуклеотид або аналог модифікованої амінокислоти, як описано нижче. Похідні і аналоги нуклеїнових кислот або білків даного винаходу включають в себе, але не обмежуються ними, молекули, що включають райони, які є по суті гомологічними відносно нуклеїнових кислот або білків даного винаходу, з ідентичністю в різних варіантах, що дорівнює, щонайменше, приблизно 45%, 50%, 70%, 80%, 95%, 98% або навіть 99% (з переважною ідентичністю, 80-99%) відносно послідовності нуклеїнової кислоти або амінокислотної послідовності ідентичного розміру

або при порівнянні з зіставленою послідовністю, коли зіставлення проводять з використанням комп'ютерної програми гомології, відомої в даній області, або кодує нуклеїнова кислота яких здатна гібридизуватись з комплементом послідовності, що кодує вищезазначені білки, при жорстких, помірно жорстких умовах або при умовах низької жорсткості. Див., наприклад, [Ausubel, et al, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, NY, 1993] і приведені нижче посилання. Прикладом такої програми є Gap (Gen)-програма (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for UNIX, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison, WI) з використанням установок за умовчанням, які використовують алгоритм Сміта і Уотермана [(1981) Adv. Appl. Math. 2: 482-489], яка включена тут посиланням в її повному вигляді.

«Гомологічна послідовність нуклеїнової кислоти» або «гомологічна амінокислотна послідовність» або їх варіації означають послідовності, що характеризуються гомологією на нуклеотидному рівні або на рівні амінокислот, як обговорювалося вище. Гомологічні нуклеотидні послідовності кодують послідовності ізоформ поліпептиду BAFF-R. Ізоформи можуть експресуватись в різних тканинах одного організму в результаті, наприклад, альтернативного сплайсингу РНК. Альтернативно, ізоформи можуть кодуватись різними генами. У даному винаході, гомологічні нуклеотидні послідовності включають в себе нуклеотидні послідовності, що кодують поліпептид BAFF-R інших видів, ніж людина, в тому числі, але не тільки, ссавців, і, отже, ці види можуть включати в себе, наприклад, мишу, щура, кролика, собаку, кішку, корову, коня та інші організми. Гомологічні нуклеотидні послідовності включають в себе також, але не обмежуються ними, алельні варіації, що природно зустрічаються, і мутації представлених тут нуклеотидних послідовностей. Однак, гомологічна нуклеотидна послідовність не включає в себе нуклеотидну послідовність, що кодує білок BAFF-R людини. Гомологічні послідовності нуклеїнових кислот включають в себе ті нуклеотидні послідовності, які кодують консервативні амінокислотні заміни (див. нижче) на Фіг.2D (SEQ ID NO:5), а також поліпептид, що має BAFF-R-активність. Гомологічна амінокислотна послідовність не кодує амінокислотну послідовність поліпептиду BAFF-R людини.

Нуклеотидна послідовність, визначена з клонування гена BAFF-R людини, дозволяє генерувати зонди і праймери, сконструйовані для застосування в ідентифікації і/або клонуванні гомологів BAFF-R в інших клітинних типах, наприклад, з інших тканин, а також гомологів BAFF-R з інших ссавців. Зонд/праймер звичайно містить по суті очищений олігонуклеотид. Цей олігонуклеотид звичайно включає район нуклеотидної послідовності, який гібридується при жорстких умовах, що найменше, зі складеною з приблизно 12, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 або 400 нуклеотидів, що безперервно йдуть один за одним, нуклеотидною послідовністю смислового ланцюга будь-якої з послідовностей Фіг.1A (SEQ ID NO:1), Фіг.1B (SEQ ID NO:2), Фіг.2A (SEQ ID NO:3), Фіг.2C (SEQ ID

NO:4) і Фіг.3 (SEQ ID NO:6), або нуклеотидною послідовністю антисмислового ланцюга будь-якої з послідовностей Фіг.1A (SEQ ID NO:1), Фіг.1B (SEQ ID NO:2), Фіг.2A (SEQ ID NO:3), Фіг.2C (SEQ ID NO:4) і Фіг.3 (SEQ ID NO:6) або мутантом, що природно зустрічається, будь-якої з послідовностей Фіг.1A (SEQ ID NO:1), Фіг.1B (SEQ ID NO:2), Фіг.2A (SEQ ID NO:3), Фіг.2C (SEQ ID NO:4) і Фіг.3 (SEQ ID NO:6).

Зонди на основі нуклеотидної послідовності BAFF-R людини можуть бути використані для детектування транскриптів або геномних послідовностей, що кодують той же самий або гомологічний білок. У різних варіантах цей зонд додатково включає приєднану до нього групу мітки, наприклад, ця група мітки може бути радіоізотопом, флуоресцентною сполукою, ферментом або кофактором ферменту. Такі зонди можуть бути використані як частина набору для діагностичного тесту для ідентифікації клітин або тканини, які неправильно експресують білок BAFF-R, наприклад, за допомогою вимірювання рівня кодує нуклеїнової кислоти в пробі клітин з суб'єкта, наприклад, детектування рівня мРНК BAFF-R або визначенням, чи був геномний ген BAFF-R мутований або делетований.

Термін «поліпептид, що має біологічно активну частину BAFF-R», означає поліпептиди, що виявляють активність, схожу, але необов'язково ідентичну, з активністю поліпептиду даного винаходу, в тому числі зрілих форм, при вимірюванні в конкретному біологічному аналізі, із залежністю від дози або без залежності від дози. Фрагмент нуклеїнової кислоти, що кодує «біологічно активну частину BAFF-R», може бути одержаний ізолюванням частини будь-якої послідовності з Фіг.1A (SEQ ID NO:1), Фіг.1B (SEQ ID NO:2), Фіг.2A (SEQ ID NO:3), Фіг.2C (SEQ ID NO:4) і Фіг.3 (SEQ ID NO:6), яка кодує поліпептид, що має біологічну активність BAFF-R (біологічна активність білків BAFF-R описана нижче), експресією цієї частини білка, що кодується BAFF-R (наприклад, рекомбінантною експресією *in vitro*) і оцінкою активності частини BAFF-R, що кодується. Наприклад, фрагмент нуклеїнової кислоти, що кодує біологічно активну частину BAFF-R, може необов'язково включати в себе домен скріплення BAFF. В іншому варіанті, фрагмент нуклеїнової кислоти, що кодує біологічно активну частину BAFF-R, включає в себе один або декілька районів.

#### Варіанти BAFF-R

Далі, даний винахід включає в себе молекули нуклеїнових кислот, які відрізняються від нуклеотидних послідовностей, показаних на Фіг.1A (SEQ ID NO:1), Фіг.1B (SEQ ID NO:2), Фіг.2A (SEQ ID NO:3), Фіг.2C (SEQ ID NO:4) і Фіг.3 (SEQ ID NO:6), внаслідок виродженості генетичного коду. Таким чином, ці нуклеїнові кислоти кодують той же самий білок BAFF-R, який кодується нуклеотидною послідовністю, показаною на Фіг.1A (SEQ ID NO:1), Фіг.1B (SEQ ID NO:2), Фіг.2A (SEQ ID NO:3), Фіг.2C (SEQ ID NO:4) і Фіг.3 (SEQ ID NO:6). В іншому варіанті ізолювана молекула нуклеїнової кислоти даного винаходу має нуклеотидну послідовність,

що кодує білок, який має амінокислотну послідовність, показану на Фіг.2D (SEQ ID NO:5).

Фахівцями з кваліфікацією в даній області буде зрозуміло, що, крім нуклеотидної послідовності BAFF-R людини, показаної в будь-якій з послідовностей Фіг.1A (SEQ ID NO:1), Фіг.1B (SEQ ID NO:2), Фіг.2A (SEQ ID NO:3), Фіг.2C (SEQ ID NO:4) і Фіг.3 (SEQ ID NO:6), поліморфізм послідовності ДНК, який приводить до змін в амінокислотних послідовностях BAFF-R, може існувати в популяції (наприклад, популяції людини). Такий генетичний поліморфізм в гені BAFF-R може існувати серед індивідів в популяції внаслідок природної алельної варіації. У застосуванні тут терміни «ген» і «рекомбінантний ген» означають молекули нуклеїнової кислоти, що включають відкриту рамку читання, що кодує білок BAFF-R, переважно білок BAFF-R ссавця. Такі природні алельні варіації можуть звичайно приводити до 1-5% відхилення в нуклеотидній послідовності гена BAFF-R. Передбачається, що будь-які і всі подібні нуклеотидні варіації і виникаючий в результаті поліморфізм амінокислот в BAFF-R, які є результатом природної алельної варіації і які не змінюють функціональну активність BAFF-R, входять в об'єм даного винаходу.

Крім того, передбачається, що молекули нуклеїнових кислот, які кодують білки BAFF-R з інших видів і, отже, мають нуклеотидну послідовність, яка відрізняється від послідовностей людини Фіг.1A (SEQ ID NO:1), Фіг.1B (SEQ ID NO:2), Фіг.2A (SEQ ID NO:3), Фіг.2C (SEQ ID NO:4) і Фіг.3 (SEQ ID NO:6), знаходяться в об'ємі даного винаходу. Молекули нуклеїнових кислот, відповідні природним алельним варіантам і гомологам кДНК BAFF-R даного винаходу, можуть бути ізольовані на основі їх гомології з нуклеїновими кислотами BAFF-R людини, описаними тут, з використанням кДНК у людини або її частини, у вигляді гібридаційного зонда згідно зі стандартними способами гібридизації при жорстких умовах гібридизації. Наприклад, кДНК розчинної BAFF-R людини може бути ізольована на основі його гомології з мембранопов'язаним BAFF-R людини. Подібним чином, кДНК мембранопов'язаного BAFF-R людини може бути ізольована на основі його гомології з розчинним BAFF-R людини.

Таким чином, в іншому варіанті ізольована молекула нуклеїнової кислоти даного винаходу має довжину, щонайменше, 6 нуклеотидів і гібридується при жорстких умовах з молекулою нуклеїнової кислоти, що включає нуклеотидну послідовність будь-якої з послідовностей Фіг.1A (SEQ ID NO:1), Фіг.1B (SEQ ID NO:2), Фіг.2A (SEQ ID NO:3), Фіг.2C (SEQ ID NO:4) і Фіг.3 (SEQ ID NO:6). В іншому варіанті ця нуклеїнова кислота має довжину, щонайменше, 10, 25, 50, 100, 250 або 500 нуклеотидів. В іншому варіанті ізольована молекула нуклеїнової кислоти даного винаходу гібридується з кодуючим районом. У застосуванні тут термін «гібридується при жорстких умовах» призначений для опису умов гібридизації і промивання, при яких нуклеотидні послідовності, щонайменше, на 60% гомологічні одна одній, звичайно залишаються гібридизованими одна з одною.

Гомологи (тобто нуклеїнові кислоти, що кодують білки BAFF-R, що походять з видів, інших ніж людина) або інші споріднені послідовності (наприклад, паралоги) можуть бути одержані з використанням умов гібридизації низької, помірної або високої жорсткості з повною конкретною послідовністю людини або з частиною цієї послідовності як зонда з використанням способів, добре відомих в даній області для гібридизації і клонування нуклеїнових кислот.

У застосуванні тут фраза «жорсткі умови гібридизації» означає умови, при яких зонд, праймер або олігонуклеотид буде гібридуватись з його послідовністю-мішенню, але не з іншими послідовностями. Жорсткі умови є послідовність-залежними і будуть різними в різних обставинах. Більш довгі послідовності гібридизуються специфічно при більш високих температурах, ніж більш короткі послідовності. Звичайно жорсткі умови вибирають таким чином, щоб температура була приблизно на 5°C нижче ніж точка плавлення ( $T_m$ ) для цієї конкретної послідовності при визначених іонній силі і pH.  $T_m$  є температурою (при визначених іонній силі, pH і концентрації нуклеїнової кислоти), при якій 50% зондів, комплементарних послідовності-мішені, гібридизуються з послідовністю-мішенню при рівновазі. Оскільки послідовності-мішені звичайно присутні в надлишку, при  $T_m$ , 50% цих зондів займають мішень при рівновазі. Звичайно, жорсткими умовами будуть умови, в яких концентрація солі дорівнює менше ніж приблизно 1,0M іон натрію, звичайно приблизно 0,01-1,0M іон натрію (або інших солей) при pH7,0-8,3, а температура дорівнює, щонайменше, приблизно 30°C для коротких зондів, праймерів або олігонуклеотидів (наприклад, 10 нуклеотидів - 50 нуклеотидів) і, щонайменше, приблизно 60°C для більш довгих зондів, праймерів і олігонуклеотидів. Жорсткі умови можуть бути також досягнуті з додаванням дестабілізуючих агентів, таких як формамід.

Жорсткі умови відомі фахівцям в даній області і можуть бути знайдені в [CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6]. Переважно, ці умови є такими, що послідовності, щонайменше, на приблизно 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 98% або 99% гомологічні одна з одною, звичайно залишаються гібридизованими одна з одною. Необмежувальним прикладом жорстких умов гібридизації є гібридизація у високосольовому буфері, що містить 6xSSC, 50mM Трис-HCl (pH7,5), mM EDTA, 0,02% ПВП, 0,02 Фіколл, 0,02% BCA і 500мг/мл денатурованої ДНК сперми лосося при 65°C. За цією гібридизацією йдуть одне або декілька промивань в 0,2xSSC, 0,01% BCA при 50°C. Ізольована молекула нуклеїнової кислоти даного винаходу, яка гібридується при жорстких умовах з послідовностями SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, відповідає молекулі нуклеїнової кислоти, що природно зустрічається. У застосуванні тут «молекула нуклеїнової кислоти, що природно зустрічається» означає молекулу РНК або ДНК, що має нуклеотидну послідовність, яка зустрічається в природі (наприклад, кодує природний білок).

У другому варіанті забезпечена послідовність нуклеїнової кислоти, яка гібридизується з молекулою нуклеїнової кислоти, що включає нуклеотидну послідовність будь-якої з послідовностей Фіг.1А (SEQ ID NO:1), Фіг.1В (SEQ ID NO:2), Фіг.2А (SEQ ID NO:3), Фіг.2С (SEQ ID NO:4) і Фіг.3 (SEQ ID NO:6), або її фрагментами, аналогами або похідними, в умовах помірної жорсткості. Необмежувальним прикладом умов гібридизації помірної жорсткості є гібридизація в 6хSSC, 5х розчині Денхардта, 0,5% ДСН і 100мг/мл денатурованій ДНК спермі лосося при 55°C, з подальшими одним або декількома промиваннями в 1хSSC, 0,1% ДСН при 37°C. Інші умови помірної жорсткості, які можуть бути використані, добре відомі в даній області. Див., наприклад, [Ausubel et al., Eds., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NY, 1993; and Knegler, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY, 1990].

У третьому варіанті забезпечена нуклеїнова кислота, яка гібридизується з молекулою нуклеїнової кислоти, що включає нуклеотидну послідовність будь-якої з послідовностей Фіг.1А (SEQ ID NO:1), Фіг.1В (SEQ ID NO:2), Фіг.2А (SEQ ID NO:3), Фіг.2С (SEQ ID NO:4) і Фіг.3 (SEQ ID NO:6), або її фрагментами, аналогами або похідними, в умовах низької жорсткості. Необмежувальним прикладом умов гібридизації низької жорсткості є гібридизація в 35% формаміді, 5хSSC, 50мМ Трис-НСІ (рН7,5), 5мМ ЕДТА, 0,02% ПВП, 0,02% Фіколі, 0,2% БСА, 100мг/мл денатурованій ДНК стермі лосося, 10% (маса/об'єм) декстрансульфаті при 40°C, з подальшими одним або декількома промиваннями в 2хSSC, 25мМ Трис-НСІ (рН7,4), 5мМ ЕДТА і 0,1% ДСН при 50°C. Інші умови низької жорсткості, які можуть бути використані, добре відомі в даній області (наприклад, що використовуються для міжвидових гібридизацій). Див., наприклад, [Ausubel et al., Eds., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NY, 1993; and Kriegler, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY, 1990; Shilo and Weinberg (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:6789-6792].

#### Консервативні мутації

Фахівцві з кваліфікацією в даній області буде також зрозуміло, що, крім алельних варіантів послідовності BAFF-R, що природно зустрічаються, які можуть існувати в популяції, зміни можуть бути введені мутацією в нуклеотидну послідовність Фіг.2А (SEQ ID NO:3), Фіг.2С (SEQ ID NO:4), Фіг.3 (SEQ ID NO:6), що приводить до змін в амінокислотній послідовності білка, що кодується BAFF-R, без зміни функціональної активності цього білка BAFF-R. Наприклад, нуклеотидні заміни, що приводять до амінокислотних замін в «не-незамінних» амінокислотних залишках, можуть бути вироблені в послідовності будь-якої з Фіг.2А (SEQ ID NO:3), Фіг.2С (SEQ ID NO:4), Фіг.3 (SEQ ID NO:6). «Не-незамінним» амінокислотним залишком є залишок, який може бути змінений, з послідовності дикого типу BAFF-R без зміни біологічної активності, тоді як «незамінний» амінокислотний залишок є необхідним для біологічної активності. Наприклад, пе-

редбачається, що амінокислотні залишки, які є консервативними серед білків BAFF-R даного винаходу, є таким, що особливо не піддаються зміні.

Крім того, передбачається також, що амінокислотні залишки, які є консервативними серед членів сімейства білків BAFF-R даного винаходу, є також такими, що особливо не піддаються зміні. Наприклад, білки BAFF-R даного винаходу можуть містити, щонайменше, один домен, який звичайно є консервативним районом в членах сімейства TNF. Як такі, ці консервативні домени, очевидно, не піддаються мутації. Однак, інші амінокислотні залишки (наприклад, залишки, які не є консервативними або є тільки напів консервативними серед членів білків BAFF-R), можуть не бути незамінними для активності і, отже, можуть бути, очевидно, такими, що піддаються зміні.

Інший аспект даного винаходу відноситься до молекул нуклеїнових кислот, що кодують білки BAFF-R, які містять зміни амінокислотних залишків, які не є незамінними для активності. Такі білки BAFF-R відрізняються за амінокислотною послідовністю від амінокислотної послідовності з Фіг.2D (SEQ ID NO:5), але все ще зберігають біологічну активність. В одному варіанті ізолювана молекула нуклеїнової кислоти включає нуклеотидну послідовність, що кодує білок, причому цей білок включає амінокислотну послідовність, щонайменше, на приблизно 45% гомологічну амінокислотних послідовності Фіг.2D (SEQ ID NO:5). Переважно, білок, що кодується цією молекулою нуклеїнової кислоти, є, щонайменше, на приблизно 60% гомологічним послідовності, щонайменше, на приблизно 70%, 80%, 90%, 95%, 98% і найбільш переважно на, щонайменше, приблизно 99% гомологічним послідовності Фіг.2D (SEQ ID NO:5).

Ізолювана молекула нуклеїнової кислоти, що кодує білок BAFF-R, гомологічний білку Фіг.2D, може бути створена введенням однієї або декількох нуклеотидних замін, додатків або делецій в нуклеотидну послідовність Фіг.2А (SEQ ID NO:3), Фіг.2С (SEQ ID NO:4), Фіг.3 (SEQ ID NO:6), так що одна або декілька амінокислотних замін, додавань або делецій вводяться в білок, що кодується.

Мутації можуть бути введені в Фіг.2А (SEQ ID NO:3), Фіг.2С (SEQ ID NO:4) або Фіг.3 (SEQ ID NO:6), наприклад, стандартними способами, такими як сайт-направлений мутагенез і ПЛР-опосередкований мутагенез. Переважно, виробляють консервативні заміни амінокислот в одному або декількох передбачених не-незамінних амінокислотних залишках. «Консервативною амінокислотою заміною» є заміна, при якій амінокислотний залишок замінюють амінокислотним залишком, що має схожий бічний ланцюг. Сімейства амінокислотних залишків, що мають схожі бічні ланцюги, були визначені в даній області. Ці сімейства включають в себе амінокислоти з основними бічними ланцюгами (наприклад, лізин, аргінін, гістидин), кислотними бічними ланцюгами (наприклад, аспарагінова кислота, глутамінова кислота), незарядженими полярними бічними ланцюгами (наприклад, гліцин, аспарагін, глутамін, серин, треонін, тирозин, цистеїн), неполярними бічними ланцюгами (наприклад, аланін, валін, лейцин, ізо-



лейцин, пролін, фенілаланін, метіонін, триптофан), бета-розгалуженими бічними ланцюгами (наприклад, треонін, валін, ізолейцин) і ароматичними бічними ланцюгами (наприклад, тирозин, фенілаланін, триптофан, пістидин). Таким чином, передбачений не-незамінний амінокислотний залишок в BAFF-R замінюють іншим амінокислотним залишком з того ж самого сімейства бічних ланцюгів. Альтернативно, в іншому варіанті мутації можуть вводиться випадковим чином вздовж всього або частини кодуєчого ланцюга для BAFF-R, наприклад, насичувальним мутагенезом, і одержані мутанти можуть бути піддані скринінгу на біологічну активність BAFF-R. для ідентифікації мутантів, які зберігають активність. Після мутагенезу будь-якої з послідовностей Fіr.2A (SEQ ID NO:3), Fіr.2C (SEQ ID NO:4), Fіr.3 (SEQ ID NO:6) білок, що кодується може бути експресований будь-яким рекомбінантним способом, відомим в даній області, і може бути визначена активність цього білка.

В одному варіанті мутантний білок BAFF-R може бути перевірений на (1) здатність формувати взаємодії за типом білок-білок з іншими білками BAFF-R, іншими білками клітинної поверхні або їх біологічно активними частинами; (2) утворення комплексу між мутантним білком BAFF-R і лігандом BAFF-R; (3) здатність мутантного білка BAFF-R зв'язуватися з внутрішньоклітинним білком-мішенню або його біологічно активною частиною; (наприклад, білками авідину); (4) здатність зв'язуватися з BAFF; або (5) здатність специфічно зв'язувати антитіло проти білка BAFF-R.

Даний винахід забезпечує специфічні мутанти, що кодуєть поліпептид BAFF-R:Fc, сконструйовані для ослаблення агрегації експресованого білка при збереженні активності скріплення BAFF. Такі мутанти включають в себе, наприклад, клони, що кодуєть амінокислотні послідовності JST661 (SEQ ID NO:17), JST662 (SEQ ID NO:18), JST663 (SEQ ID NO:19), JST673 (SEQ ID NO:20), JST674 (SEQ ID NO:21), JST675 (SEQ ID NO:22), JST672 (SEQ ID NO:23), JST676 (SEQ ID NO:24), JST671 (SEQ ID NO:25), JST677 (SEQ ID NO:26) і JST678 (SEQ ID NO:27). Інші варіанти включають в себе мутанти, що кодуєть поліпептид BAFF-R або BAFF-R:Fc, який має характеристики агрегації, схожі з природним поліпептидом BAFF-R людини або BAFF-R:Fc, але також зв'язують BAFF, в тому числі, наприклад, послідовності, що включають амінокислотні послідовності JST659 (SEQ ID NO:15), JST660 (SEQ ID NO:16), JST664 (SEQ ID NO:28), JST668 (SEQ ID NO:29), JST665 (SEQ ID NO:30), JST666 (SEQ ID NO:31) і JST667 (SEQ ID NO:32). Інші варіанти включають в себе мутанти, що кодуєть поліпептид BAFF-R або BAFF-R:Fc, де консервативні амінокислоти між BAFF-R людини і миші замінені на інші консервативні амінокислоти, і де зберігається зв'язувальна активність поліпептиду BAFF-R або BAFF-R:Fc у відношенні BAFF. В інших варіантах мутанти кодуєть поліпептид BAFF-R або BAFF-R:Fc, що має амінокислоти, які не є консервативними між BAFF-R людини і миші, які були замінені на інші амінокислоти. Переважно, щонайменше, одна неполярна амінокислота замінена на

залишок проліну або на незаряджену полярну амінокислоту.

Антисмислові молекули нуклеїнових кислот

Інший аспект даного винаходу відноситься до ізольованих антисмислових молекул нуклеїнових кислот, які можуть гібридизуватись з молекулою нуклеїнової кислоти, що включає нуклеотидну послідовність Fіr.2A, C 3, або її фрагментами, аналогами або похідними, або є комплементарними цій молекулі нуклеїнової кислоти, або її фрагментам, аналогам або похідним. «Антисмислова» нуклеїнова кислота включає нуклеотидну послідовність, яка комплементарна «смысловій» нуклеїновій кислоті, що кодує білок, наприклад, комплементарна кодуєчому ланцюгу дволанцюгової кДНК-молекули або комплементарна мРНК-послідовності. У специфічних аспектах забезпечені антисмислові молекули нуклеїнових кислот, які включають послідовність, комплементарну, щонайменше, приблизно 10, 25, 50, 100, 250 або 500 нуклеотидам або всьому кодуєчому ланцюгу BAFF-R або тільки його частині. Додатково забезпечені молекули нуклеїнових кислот, кодуєчі фрагменти, гомологи, похідні і аналоги білка BAFF-R будь-якої з Fіr.2A (SEQ ID NO:3), Fіr.2C (SEQ ID NO:4), Fіr.3 (SEQ ID NO:6), або антисмислові нуклеїнові кислоти, комплементарні послідовності нуклеїнової кислоти BAFF-R будь-якої з Fіr.2A (SEQ ID NO:3), Fіr.2C (SEQ ID NO:4), Fіr.3 (SEQ ID NO:6).

В одному варіанті антисмислова молекула нуклеїнової кислоти є антисмисловою відносно «кодуєчого району» кодуєчого ланцюга нуклеотидної послідовності, що кодує BAFF-R. Термін «кодуєчий район» означає район нуклеотидної послідовності, що включає кодони, які транскрибуються в амінокислотні залишки (наприклад, кодуєчий білок район, BAFF-R людини відповідає нуклеотидам 13-568 Fіr.2A (SEQ ID NO:3) або нуклеотидам 13-565 Fіr.2C (SEQ ID NO:4) або нуклеотидам 298-849 Fіr.3 (SEQ ID NO:6)). В іншому варіанті антисмислова молекула нуклеїнової кислоти є антисмисловою відносно «некодуєчого району» кодуєчого ланцюга нуклеотидної послідовності, що кодує BAFF-R. Термін «некодуєчий район» означає 5'- і 3'-послідовності, які фланкують кодуєчий район, які не транскрибуються в амінокислоти (тобто названі також 5'- і 3'-нетрансльованими районами).

За умови, що послідовності кодуєчого ланцюга, що кодує BAFF-R, описані тут, антисмислові нуклеїнові кислоти даного винаходу можуть бути сконструйовані відповідно до правил спаровування основ Уотсона і Крику або Хугстіна. Антисмислова молекула нуклеїнової кислоти може бути комплементарною всьому кодуєчому району мРНК BAFF-R, але більш переважно є олігонуклеотидом, який є антисмисловим відносно тільки частини кодуєчого або некодуєчого району мРНК BAFF-R. Наприклад, антисмисловий олігонуклеотид може бути комплементарним району, що оточує сайт початку трансляції мРНК BAFF-R. Антисмисловий олігонуклеотид може мати довжину, наприклад, приблизно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 або 50 нуклеотидів. Антисмислова молекула нуклеїнової кислоти даного винаходу може бути

сконструйована з використанням хімічного синтезу або реакцій ферментативного лігування з використанням процедур, відомих в даній області. Наприклад, антисмислова нуклеїнова кислота (наприклад, антисмисловий олігонуклеотид) може бути хімічно синтезована з використанням нуклеотидів, що природно зустрічаються, або різним чином модифікованих нуклеотидів, призначених для збільшення біологічної стабільності цих молекул або для збільшення фізичної стабільності дуплекса, що утворюється між антисмисловою і смисловою нуклеїновими кислотами, наприклад, можуть використовуватися фосфоротіоатні похідні і заміщені акридином нуклеотиди.

Приклади модифікованих нуклеотидів, які можуть бути використані для генерування антисмислової нуклеїнової кислоти, включають в себе: 5-фторурацил, 5-бром урацил, 5-хлорурацил, 5-йодурацил, піпексантин, ксантин, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксигідроксиметил)урацил, 5-карбоксиметиламінометил-2-тіоуридин, 5-карбоксиметиламінометилурацил, дигідроурацил, бета-D галактозилквеозин, інозин, N6-ізопентеніладенін, 1-метилгуанін, 1-метилінозин, 2,2-диметилгуанін, 2-метиладенін, 2-метилгуанін, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, N6-аденін, 7-метилгуанін, 5-метиламінометилурацил, 5-метоксіамінометил-2-тіоурацил, бета-S-манозилквеозин, 5'-метоксикарбоксиметилурацил, 5-метоксіурацил, 2-метилтіо-N6-ізопентеніладенін, урацил-5-оксіцтову кислоту (v), вібутоксозин, псевдоурацил, квеозин, 2-тіоцитозин, 5-метил-2-тіоурацил, 2-тіоурацил, 4-тіоурацил, 5-метилурацил, метиловий ефір урацил-5-оксіцтової кислоти, 5-метил-2-тіоурацил, 3-(3-аміно-3-N-2-карбоксипропіл)урацил, (аср3)w і 2,6-діамінопурин. Альтернативно, антисмислова нуклеїнова кислота може бути одержана біологічно з використанням експресуючого вектора, в який була субклонована нуклеїнова кислота в антисмисловій орієнтації (тобто РНК, транскрибована з інсертованої нуклеїнової кислоти, буде мати антисмислову орієнтацію відносно нуклеїнової кислоти, що представляє інтерес, описаної додатково в наступному підрозділі).

Антисмислові молекули нуклеїнових кислот даного винаходу звичайно вводять суб'єкту або генерують *in situ* таким чином, що вони гібридизуються або зв'язуються з клітинною мРНК і/або геномною ДНК, що кодує білок BAFF-R, інгібуючи тим самим експресію цього білка, наприклад, інгібуванням транскрипції і/або трансляції. Ця гібридизація може відбуватися за допомогою звичайної комплементарності нуклеотидів з утворенням стабільного дуплекса або, наприклад, у разі антисмислової молекули нуклеїнової кислоти, яка зв'язується з ДНК-дуплексами, за допомогою специфічних взаємодій в основній борозенці подвійної спіралі. Приклад способу введення антисмислових молекул нуклеїнових кислот даного винаходу включає в себе пряму ін'єкцію в ділянку тканини. Альтернативно, антисмислові молекули нуклеїнових кислот можуть бути модифіковані для вибраних клітин-мішеней і потім введені системно. Наприклад, для системного введення антисмисло-

ві молекули можуть бути модифіковані таким чином, що вони специфічно зв'язуються з рецепторами або антигенами, експресованими на вибраній клітинній поверхні, наприклад, за допомогою скріплення антисмислових молекул нуклеїнових кислот з пептидами або антитілами, які зв'язуються з рецепторами або антигенами клітинної поверхні. Антисмислові молекули нуклеїнових кислот можуть також доставлятися в клітини з використанням описаних тут векторів. Для досягнення достатніх внутрішньоклітинних концентрацій антисмислових молекул переважними є векторні конструкції, в яких антисмислова молекула нуклеїнової кислоти вміщена під контроль сильного промотора pol II або pol III.

Ще в одному варіанті антисмислова молекула нуклеїнової кислоти даного винаходу є  $\alpha$ -аномерною молекулою нуклеїнової кислоти,  $\alpha$ -аномерна молекула нуклеїнової кислоти утворює специфічні дволанцюгові гібриди з комплементарною РНК, в яких, в протилежність звичайним  $\beta$ -ланкам, ланцюги йдуть паралельно один одному [Gaultier et al. (1987) Nucl. Acids Res. 15: 6625-6641]. Антисмислова молекула нуклеїнової кислоти може також містити 2'-О-метилрибонуклеотид [Inoue et al. (1987) Nucl. Acids Res. 15: 6131-6148] або химерний РНК-ДНК-аналог [Inoue et al. (1987) FEBS Lett. 215: 327-330].

#### Рибозими і РНК-радикали

Ще в одному варіанті антисмисловою нуклеїновою кислотою даного винаходу є рибозим. Рибозими є каталітичними РНК-молекулами з рибонуклеазною активністю, які здатні розщеплювати одноланцюгову нуклеїнову кислоту, таку як мРНК, відносно якої вони мають комплементарний район. Таким чином, рибозими (наприклад, «молотоголові» рибозими, описані в [Haselhoff and Gerlach (1988) Nature 334: 585-591], можуть бути використані для каталітичного розщеплення мРНК-транскриптів BAFF-R для інгібування за допомогою цього трансляції мРНК BAFF-R. Рибозим, що має специфічність відносно BAFF-R-кодуючої нуклеїнової кислоти, може бути сконструйований на основі описаної тут нуклеотидної послідовності ДНК BAFF-R (тобто SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6). Наприклад, може бути сконструйоване похідне РНК Tetrahymena L-19 IVS, в якому нуклеотидна послідовність активного сайту є комплементарною нуклеотидній послідовності, яка повинна бути розщеплена, у BAFF-R-кодуючій мРНК. Див., наприклад, [Cech et al. U.S. Pat. No. 4 987 071; і Cech et al. патент США №5 116 742]. Альтернативно, мРНК BAFF-R може бути використана для відбору каталітичної РНК, що має специфічну рибонуклеазну активність, з пулу РНК-молекул. Див., наприклад, [Bartel et al., (1993) Science 261: 1411-1418].

Альтернативно, експресія гена BAFF-R може бути інгібована наділенням нуклеотидних послідовностей, комплементарних регуляторному району BAFF-R (наприклад, промотору BAFF-R і/або енхансеру BAFF-R), з утворенням потрібних спіральних структур, які запобігають транскрипції гена BAFF-R в клітинах-мішенях. Див. у загальному [Helene (1991) Anticancer Drug Des. 6: 569-84;

Helene et al. (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660: 27-36; i Maher (1992) *Bioassays* 14: 807-15].

У різних варіантах нуклеїнові кислоти BAFF-R можуть бути модифіковані в частині основи, цукровій частині або фосфатному скелеті молекули для поліпшення, наприклад, стабільності, гібридизації або розчинності цієї молекули. Наприклад, дезоксирибозофосфатний скелет нуклеїнових кислот може бути модифікований для генерування пептиднуклеїнових кислот [див. Нугар et al. (1996) *Bioorg. Med. Chem.* 4: 5-23]. У застосуванні тут терміни «пептиднуклеїнові кислоти» або «ПНК» означають міметики нуклеїнових кислот, наприклад, ДНК-міметики, в яких дезоксирибозофосфатний скелет замінений псевдопептидним скелетом і збережені тільки чотири природних нуклеобазових. Було показано, що нейтральний скелет ПНК робить можливою специфічну гібридизацію з ДНК і РНК в умовах низької йонної сили. Синтез ПНК-олігонуклеотидів можна виконувати з використанням протоколів стандартного твердофазного пептидного синтезу, описаних в [Нугар et al. (1996) *Bioorg. Med. Chem.* 4:5-23; Perry-O'Keefe et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14670-675].

ПНК BAFF-R можуть бути використані для терапевтичних і діагностичних застосувань. Наприклад, ПНК можуть бути використані як антисмислові або антигенні агенти для послідовності-специфічної модуляції експресії генів, наприклад, індукцією зупинки транскрипції або трансляції або інгібуванням реплікації. ПНК BAFF-R можуть бути також використані, наприклад, в аналізі мутацій єдиної пари основ в гені за допомогою, наприклад, ПНК-направленого утворення ПЛР-«клемпа»; як штучні рестриктази при застосуванні в комбінації з іншими ферментами, наприклад, S1-нуклеазами [Нугар В. (1996) *Bioorg. Med. Chem.* 4: 5-23], або як зонди або праймери для ДНК-послідовності і гібридизації [Нугар et al. (1996), *Bioorg. Med. Chem.* 4: 5-23; Perry-O'Keefe (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14670-675].

В іншому варіанті ПНК BAFF-R можуть бути модифіковані, наприклад, для посилення їх стабільності або клітинного поглинання, приєднанням ліпофільних або інших допоміжних груп до ПНК з утворенням ПНК-ДНК-химер або з використанням ліпосом або інших способів доставки лікарських засобів, відомих в даній області. Наприклад, можуть бути одержані ПНК-ДНК-химери BAFF-R, які можуть об'єднувати корисні властивості ПНК і ДНК. Такі химери дозволяють ферментам, які впізнають ДНК, наприклад, РНКазі і ДНК-полімеразам, взаємодіяти з ДНК-частиною, тоді як ПНК-частина забезпечує високу афінність скріплення і специфічність. ПНК-ДНК-химери можуть бути пов'язані з використанням лінкер відповідної довжини, вибраних в залежності від стекингу основ, числа зв'язків між нуклеобазовими і орієнтації [Нугар (1996) *Bioorg. Med. Chem.* 4: 5-23]. Синтез ПНК-ДНК-химер може виконуватися, як описано в [Нугар (1996) *Bioorg. Med. Chem.* 4: 5-23; and Finn et al. (1996) *Nucl. Acids Res.* 24: 3357-63]. Наприклад, ланцюг ДНК може бути синтезований на твердому носії з використанням стандартного способу фосфорамідитного скріплення, і модифіковані нуклео-

зидні аналоги, наприклад, 5'-(4-метокситримідинфосфорамідит, можуть бути вико-

ристані між ПНК і 5'-кінцем ДНК [Mag et al. (1989) *Nucl. Acids Res.* 17: 5973-88]. Потім ПНК-мономери зв'язують ступінчастим чином з одержанням химерної молекули з 5'-ПНК-сегментом і 3'-ДНК-сегментом (Finn et al. (1996) вище). Альтернативно, химерні молекули можуть бути синтезовані з 5'-ДНК-сегментом і 3'-ПНК-сегментом. Див., наприклад, [Petersen et al. (1975) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 5: 1119-1124].

В інших варіантах олігонуклеотид може включати в себе інші приєднані групи, такі як пептиди (наприклад, для націлення на рецептори клітинних хазяїна *in vivo*), або агенти, які сприяють транспорту через мембрану клітини [див., наприклад, Letsinger et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6553-6556; Lemaitre et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 648-652; РСТ Публікацію №WO 88/09810] або гематоенцефалічний бар'єр [див., наприклад, Публікацію РСТ №WO 89/10134]. Крім того, олігонуклеотиди можуть бути модифіковані агентами розщеплення, що запускаються гібридизацією [див., наприклад, Krol et al., (1988) *BioTechniques* 6: 958-976] або інтеркалюючими агентами [див., наприклад, Zon, (1988) *Pharm. Res.* 5: 539-549]. Для цієї мети олігонуклеотид може бути кон'югований з іншою молекулою, наприклад, пептидом, зшиваючим агентом, що запускається гібридизацією, агентом транспорту, агентом розщеплення, що запускається гібридизацією, і т.д.

#### Поліпептиди BAFF-R

Один з аспектів даного винаходу відноситься до виділених білків BAFF-R і їх біологічно активних частин, або їх похідних, фрагментів, аналогів або гомологів. Забезпечені також поліпептидні фрагменти, придатні для застосування як імуногени для індукції BAFF-R-антитіл. В одному варіанті природні білки BAFF-R можуть бути виділені з клітин або тканин-джерел за допомогою відповідної схеми очищення з використанням стандартних способів очищення білків. В іншому варіанті білки BAFF-R одержують способами рекомбінантних ДНК. Альтернативно рекомбінантний експресії, білок або поліпептиди BAFF-R можуть бути синтезовані хімічно з використанням стандартних способів синтезу пептидів.

«Виділені» або «очищені» білок або його біологічно активна частина по суті не містять клітинного матеріалу або інших забруднюючих (домішкових) білків з даної клітини або тканини-джерела, з яких одержаний даний білок BAFF-R, або по суті не містять хімічних попередників або інших хімікаліїв при хімічному синтезі. Вираз «які по суті не містять клітинного матеріалу» включає в себе препарати білка BAFF-R, в яких цей білок відділений від клітинних компонентів клітин, з яких він виділений, або одержаний рекомбінантним шляхом. В одному варіанті вираз «які по суті не містять клітинного матеріалу» включає в себе препарати білка BAFF-R, що мають менше ніж приблизно 30% (за сухою вагою) не-BAFF-R-білка (також названого тут «забруднюючим (домішковим) білком»), більш переважно менше ніж приблизно 20%

Не-BAFF-R-білка, ще більш переважно менше ніж приблизно 10% не-BAFF-R-білка і найбільш переважно менше ніж приблизно 5% Не-BAFF-R-білка. При одержанні білка BAFF-R або його біологічно активної частини рекомбінантним шляхом, він також є по суті вільним від культурального середовища, тобто культуральне середовище представляє менше ніж приблизно 20%, більш переважно менше ніж приблизно 10%, і найбільш переважно менше ніж приблизно 5% об'єму препарату білка.

Вираз «які по суті не містять хімічних попередників або інших хімікаліїв» включає в себе препарати білка BAFF-R, в яких цей білок відділений від хімічних попередників або інших хімікаліїв, які беруть участь в синтезі цього білка. В одному варіанті вираз «які по суті не містять хімічних попередників або інших хімікаліїв» включає в себе препарати білка BAFF-R, що мають менше ніж приблизно 30% (за сухою вагою) хімічних попередників або не-BAFF-R-хімікаліїв, більш переважно менше ніж приблизно 20% хімічних попередників або не-BAFF-R-хімікаліїв, ще більш переважно менше ніж приблизно 10% хімічних попередників або не-BAFF-R-хімікаліїв, і найбільш переважно менше ніж приблизно 5% хімічних попередників або не-BAFF-R-хімікаліїв.

Біологічно активні частини білка BAFF-R включають в себе пептиди, що містять амінокислотні послідовності, досить гомологічні або одержані з амінокислотної послідовності білка BAFF-R, наприклад, амінокислотної послідовності, показаної в SEQ ID NO:5, які включають в себе менше амінокислот, ніж повнорозмірні білки BAFF-R і виявляють, щонайменше, одну активність білка BAFF-R. Звичайно, біологічно активні частини включають домен або мотив з, щонайменше, однією активністю білка BAFF-R. Біологічно активна частина білка BAFF-R може бути поліпептидом, який має довжину, наприклад, щонайменше, 10, 25, 50, 100 або більше за амінокислоти.

Біологічно активна частина білка BAFF-R даного винаходу може містити, щонайменше, один з вищезгаданих доменів, консервативних між білками BAFF-R. Альтернативна біологічно активна частина білка BAFF-R може містити, щонайменше, два з вищезгаданих доменів. Інша біологічно активна частина білка BAFF-R може містити, щонайменше, три з вищезгаданих доменів. Ще одна біологічно активна частина білка BAFF-R даного винаходу може містити, щонайменше, чотири з вищезгаданих доменів.

Крім того, інші біологічно активні частини, в яких делетовані інші райони даного білка, можуть бути одержані рекомбінантними способами і оцінені на одну або декілька функціональних активностей нативного білка BAFF-R.

В одному варіанті білок BAFF-R має амінокислотну послідовність, показану на Фіг.2D (SEQ ID NO:5). В інших варіантах білок BAFF-R є по суті гомологічним Фіг.2D (SEQ ID NO:5) і зберігає функціональну активність білка Фіг.2D (SEQ ID NO:5), але відрізняється за амінокислотною послідовністю внаслідок природної алельної варіації або мутагенезу, як описано детально нижче. Таким чином, в іншому варіанті білок BAFF-R є білком, який

включає амінокислотну послідовність, гомологічну, щонайменше, на приблизно 45% амінокислотної послідовності Фіг.2D (SEQ ID NO:5), і зберігає функціональну активність білків BAFF-R Фіг.2D (SEQ ID NO:5).

У деяких варіантах даний винахід включає в себе специфічні мутанти поліпептиду BAFF-R:Fc, сконструйованого для ослаблення агрегації експресованого білка при збереженні BAFF-зв'язувальної активності. Такі мутанти включають в себе, наприклад, клони, що кодують амінокислотні послідовності JST661 (SEQ ID NO:17), JST662 (SEQ ID NO:18), JST663 (SEQ ID NO:19), JST673 (SEQ ID NO:20), JST674 (SEQ ID NO:21), JST675 (SEQ ID NO:22), JST672 (SEQ ID NO:23), JST676 (SEQ ID NO:24), JST671 (SEQ ID NO:25), JST677 (SEQ ID NO:26) JST678 (SEQ ID NO:27). Інші варіанти включають в себе мутанти, що кодують поліпептид BAFF-R або BAFF-R:Fc, які мають характеристики агрегації, схожі з нативним поліпептидом BAFF-R людини або BAFF-R:Fc, але також зв'язують BAFF, в тому числі, наприклад, послідовності, що включають амінокислотні послідовності JST659 (SEQ ID NO:15), JST660 (SEQ ID NO:16), JST664 (SEQ ID NO:28), JST668 (SEQ ID NO:29), JST665 (SEQ ID NO:30), JST666 (SEQ ID NO:31) і JST667 (SEQ ID NO:32). Інші варіанти включають в себе мутанти, що кодують поліпептид BAFF-R або BAFF-R:Fc, де консервативні амінокислоти між BAFF-R людини і миші замінені іншими консервативними амінокислотами і де збережена зв'язувальна активність поліпептиду BAFF-R або BAFF-R:Fc відносно BAFF. В інших варіантах мутанти кодують поліпептид BAFF-R або BAFF-R:Fc, що має амінокислоти, які не є консервативними між BAFF-R людини і миші, які були замінені на інші амінокислоти. Переважно, неполярні амінокислоти мutowані заміною їх на пролін або незаряджені полярні амінокислоти.

Визначення гомології між двома або декількома послідовностями Для визначення процентної гомології двох амінокислотних послідовностей або двох нуклеїнових кислот ці послідовності вирівнюють для цілей оптимального порівняння (наприклад, можуть вводитися гепи в першій амінокислотній послідовності або послідовності нуклеїнової кислоти для оптимального вирівнювання з другою амінокислотою послідовністю або послідовністю нуклеїнової кислоти). Потім порівнюють амінокислотні залишки або нуклеотиди у відповідних положеннях амінокислот або положеннях нуклеотидів. Коли положення в першій послідовності зайняте тим же самим амінокислотним залишком або нуклеотидом, що і відповідне положення у другій послідовності, то ці молекули є гомологічними в цьому положенні (тобто в застосуванні тут «гомологія» амінокислоти або нуклеотиду еквівалентна «ідентичності» амінокислоти або нуклеотиду).

Гомологія послідовності нуклеїнової кислоти може бути визначена як міра ідентичності між двома послідовностями. Гомологія може бути визначена з використанням комп'ютерних програм, відомих в даній області, таких як програма GAP (ГЕП), забезпечена в пакеті програм GCG. [Див.

Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443-453]. З використанням програми GAP GCG з наступними установками для порівняння послідовностей нуклеїнових кислот: штраф (пенальті) за створення гепу 5,0 і штраф (пенальті) за подовження гепу 0,3, кодуєчий район аналогічних послідовностей нуклеїнових кислот, вказаних вище, виявляє міру ідентичності переважно, щонайменше, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% або 99%, причому CDS (кодуєча) частина послідовності ДНК показана на Фіг.2А (SEQ ID NO:3), Фіг.2С (SEQ ID NO:4), Фіг.3 (SEQ ID NO:6).

Термін «ідентичність послідовностей» означає міру, в якій дві полінуклеотидні або поліпептидні послідовності є ідентичними на основі залишок-за-залишком протягом конкретного району порівняння. «Процентна ідентичність послідовності» розраховують порівнянням двох оптимально вирівняних послідовностей протягом району порівняння, визначенням числа положень, в яких ідентичні основи нуклеїнових кислот (наприклад, А, Т, С, Г, У або І, у разі нуклеїнових кислот) зустрічаються в обох послідовностях, з одержанням співпадаючих положень, розподілом числа співпадаючих положень на загальне число положень в районі порівняння (тобто на розмір вікна) і множенням результату на 100 з одержанням процента ідентичності послідовності. Термін «істотна ідентичність» в застосуванні тут означає характеристику полінуклеотидної послідовності, де даний полінуклеотид включає послідовність, яка має, щонайменше, 80%-ну ідентичність послідовності, переважно, щонайменше, 85%-ну ідентичність і часто 90-95%-ну ідентичність послідовності, більш звичайно, щонайменше, 99%-ну ідентичність послідовності в порівнянні з посилальною послідовністю протягом району порівняння.

Химерні і злиті білки

Даний винахід забезпечує також химерні або злиті білки BAFF-R. У застосуванні тут «химерний білок» або «злитий білок» BAFF-R включає BAFF-R-поліпептид, функціонально злитий з He-BAFF-R-поліпептидом. «BAFF-R-поліпептид» означає поліпептид, що має амінокислотну послідовність, відповідну BAFF-R, тоді як «He-BAFF-R-поліпептид» означає поліпептид, що має амінокислотну послідовність, відповідну білку, який не є по суті гомологічним білку BAFF-R, наприклад, білку, який відрізняється від білка BAFF-R і який одержаний з того ж самого або відмінного організму. У злитому білку BAFF-R BAFF-R-поліпептид може відповідати всьому білку або частині білка BAFF-R. В одному варіанті злитий білок BAFF-R включає, щонайменше, одну біологічно активну частину білка BAFF-R. В іншому варіанті злитий білок BAFF-R включає, щонайменше, дві біологічно активні частини білка BAFF-R. Ще в одному варіанті злитий білок BAFF-R включає, щонайменше, три біологічно активні частини білка BAFF-R. У злитому білку термін «функціонально пов'язані» вказує на те, що BAFF-R-поліпептид і He-BAFF-R-поліпептид злиті в рамці зчитування один з одним. He-BAFF-R-поліпептид може бути злитий з N-кінцем або C-кінцем BAFF-R-поліпептиду. He-BAFF-R-поліпептид може бути, наприклад, Fc-частиною

антитіла. Вона може бути функціонально приєднана або до N-кінця, або до C-кінця BAFF-R-поліпептиду. Злиті з Fc-частиною білки описані в [Lo et al. (1998) Protein Engineering 11: 495-500, і патент США №5 541 087 і 5 726 044], описи яких включені тут як посилання.

Наприклад, в одному варіанті злитий білок BAFF-R включає домен BAFF-R, функціонально пов'язаний з позаклітинним доменом другого білка. Такі злиті білки можуть бути додатково використані в скринінг-аналізах на сполуки, які модулюють активність BAFF-R (такі аналізи описані детально нижче).

Ще в одному варіанті злитий білок є злитим білком GST-BAFF-R, в якому послідовності BAFF-R злиті з C-кінцем послідовності GST (тобто глутатіон-S-трансферази). Такі злиті білки можуть полегшувати очищення рекомбінантного BAFF-R.

В іншому варіанті злитий білок є білком BAFF-R, що містить гетерологічну сигнальну послідовність на його N-кінці. Наприклад, оскільки BAFF-R не містить власної сигнальної послідовності, гетерологічна сигнальна послідовність повинна бути злита з 5'-кінцем кодуєчої послідовності BAFF-R для ефективної секреції злитого білка BAFF-R. Експресія і/або секреція BAFF-R може бути збільшена за допомогою використання різних гетерологічних сигнальних послідовностей.

Ще в одному варіанті злитий білок є злитим білком BAFF-R-імуноглобулін, в якому послідовності BAFF-R, що включають один або декілька доменів, злиті з послідовностями, одержаними з члена сімейства білків імуноглобулінів. Злиті білки BAFF-R-імуноглобулін даного винаходу можуть включатись у фармацевтичні композиції і вводиться суб'єкту для інгібування взаємодії між лігандом BAFF-R і білком BAFF-R на поверхні клітини для супресії за допомогою цього BAFF-R опосередкованої трансдукції сигналу *in vivo*. Злиті білки BAFF-R-імуноглобулін можуть бути використані для дії на біодоступність спорідненого BAFF-R ліганду. Інгібування взаємодії ліганд BAFF-R/BAFF-R може бути корисним терапевтично як для лікування проліферативних і пов'язаних з диференціюванням порушень, так і для модуляції (наприклад, стимуляції або інгібування) виживання клітин. Крім того, злиті білки BAFF-R-імуноглобулін даного винаходу можуть бути використані як імуногени для одержання анти-BAFF-R-антитіл у суб'єкта, для очищення лігандів BAFF-R і в скринінг-аналізах для ідентифікації молекул, які інгібують взаємодію BAFF-R з лігандом BAFF-R.

Химерний або злитий BAFF-R-білок даного винаходу може бути одержаний стандартними способами рекомбінантних ДНК. Наприклад, ДНК-фрагменти, що кодуєть різні поліпептидні послідовності, лігують разом в рамці зчитування відповідно до загальноприйнятих способів, наприклад, з використанням затуплених або ступінчастих кінців для лігування, розщеплення рестрикційними ферментами для забезпечення відповідних кінців, заповнення липких кінців, якщо треба, обробки лужною фосфатазою, щоб уникнути небажаної сполуки і ферментативного лігування. В іншому варіанті злитий ген може бути синтезований зага-

льноприйнятими способами, в тому числі автоматичними ДНК-синтезаторами. Альтернативно, може проводитись ПЛР-ампліфікація фрагментів гена з використанням якірних праймерів, які приводять до утворення комплементарних виступів між двома послідовними фрагментами гена, які можуть бути потім випалені і повторно ампліфіковані з одержанням химерної генної послідовності [див., наприклад, Ausubel et al. Eds. *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, John Wiley & Sons, 1992]. Крім того, багато які експресуючі вектори є комерційно доступними, причому ці вектори вже кодують частину молекули, що зливається (наприклад, GST-поліпептид). Кодуюча BAFF-R нуклеїнова кислота може бути клонована в такий експресуючий вектор, що так частина, що зливається, зв'язується в рамці читування з білком BAFF-R.

У переважному варіанті злитий білок BAFF-R забезпечений послідовністю нуклеїнової кислоти (SEQ ID NO:11) і амінокислотною послідовністю (SEQ ID NO:12) Фіг.9.

#### Агоністи і антагоністи BAFF-R

Даний винахід відноситься також до варіантів білків BAFF-R, які функціонують або як агоністи BAFF-R (міметики), або як антагоністи BAFF-R. Варіанти білка BAFF-R можуть бути одержані мутагенезом, наприклад, дискретною точковою мутацією або укороченням білка BAFF-R. Агоніст білка BAFF-R може зберігати по суті ту ж самі біологічну активність або підпорядкований набір біологічної активності форми білка BAFF-R, що природно зустрічається. Антагоніст білка BAFF-R може інгібувати одну або декілька активностей форми білка BAFF-R, що природно зустрічається, наприклад, конкурентним скріпленням з членом каскаду передачі сигналу, що знаходиться по ходу або проти ходу каскаду, який включає в себе білок BAFF-R. Таким чином, специфічні біологічні ефекти можуть бути індуковані обробкою варіантом обмеженої функції. В одному варіанті обробка суб'єкта варіантом, що має підпорядкований набір біологічної активності форми білка, що природно зустрічається, має менші побічні дії у суб'єкта, в порівнянні з обробкою формою білків BAFF-R, що природно зустрічається.

Варіанти білка BAFF-R, які функціонують або як агоністи BAFF-R (міметики), або як антагоністи BAFF-R, можуть бути ідентифіковані скринінгом комбінаторних бібліотек мутантів, наприклад, укорочених мутантів, білка BAFF-R на агоністичну або антагоністичну активність білка BAFF-R. В одному варіанті мозаїчну бібліотеку різноманітних варіантів BAFF-R одержують комбінаторним мутагенезом на рівні нуклеїнових кислот, причому вказана бібліотека кодується за допомогою мозаїчної бібліотеки генів. Мозаїчна бібліотека варіантів BAFF-R може бути одержана, наприклад, ферментативним лігуванням суміші синтетичних олігонуклеотидів в послідовності генів, так що вироджений набір потенційних послідовностей BAFF-R експресується у вигляді індивідуальних поліпептидів, або альтернативно, у вигляді набору більш крупних злитих білків (наприклад, фагове представлення), що містять в них набір послідовностей BAFF-R. Існує

множина способів, які можуть бути використані для одержання бібліотек потенційних варіантів BAFF-R з виродженої олігонуклеотидної послідовності. Хімічний синтез виродженої генної послідовності може виконуватись у автоматичному ДНК-синтезаторі, і потім синтетичний ген може бути лігований у відповідний експресуючий вектор. Застосування виродженого набору генів дозволяє забезпечити в одній суміші всі послідовності, що кодують бажаний набір потенційних послідовностей BAFF-R. Способи синтезу вироджених олігонуклеотидів відомі в даній області [див., наприклад, Narang (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura et al. (1984) *Ann. Rev. Biochem.* 53: 323; Itakura et al. (1977) *Science* 198: 1056-1063; Ike et al. (1983) *Nucl. Acids Res.* 11:477-488).

#### Бібліотеки поліпептидів

Крім того, бібліотеки фрагментів кодуючої послідовності білка BAFF-R можуть бути використані для одержання мозаїчної популяції фрагментів BAFF-R для скринінгу і подальшого відбору варіантів білка BAFF-R. В одному варіанті бібліотека фрагментів кодуючої послідовності може бути одержана обробкою дволанцюгового ПЛР-фрагмента кодуючої послідовності BAFF-R нуклеазою в умовах, в яких розрив одного ланцюга відбувається тільки приблизно один раз на молекулу, денатурацією дволанцюгової ДНК, ренатурацією цієї ДНК з утворенням дволанцюгової ДНК, яка може включати в себе смислові/антисмислові пари з продуктів з різними розривами одного ланцюга, видаленням одноланцюгових частин з повторно утворених дуплексів обробкою S1-нуклеазою і лігуванням одержаної бібліотеки фрагментів в експресуючий вектор. За допомогою цього способу може бути одержана експресуюча бібліотека, яка кодує N-кінцеві і внутрішні фрагменти різних розмірів білка BAFF-R.

У даній області відомі декілька способів для скринінгу генних продуктів комбінаторних бібліотек, одержаних точковими мутаціями або укороченням, і для скринінгу кДНК-бібліотек на генні продукти, що мають вибрану властивість. Такі способи можуть бути адаптовані для швидкого скринінгу бібліотек генів, що генеруються комбінаторним мутагенезом білка BAFF-R. Способи, що найбільш широко використовуються, які придатні для високопродуктивного аналізу, для скринінгу великих бібліотек генів, звичайно включають в себе клонування бібліотеки генів в репліковані експресуючі вектори, трансформацію відповідних клітин одержаною бібліотекою векторів і експресію цих комбінаторних генів в умовах, в яких детектування бажаної активності полегшує виділення вектора, що кодує ген, продукт якого був детектований. REM (recursive ensemble mutagenesis), новий спосіб, який посилює частоту появи функціональних мутантів в бібліотеках, може бути використаний в комбінації зі скринінг-аналізами для ідентифікації варіантів BAFF-R [Arkin and Yourvan (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7811-7815; Delgrave et al. (1993) *Protein Engineering* 6: 327-331].

#### Антитіла проти BAFF-R

Виділений білок BAFF-R, або його частина або фрагмент, можуть бути використані як імуноген

для генерування антитіл, які зв'язують BAFF-R, з використанням стандартних способів для одержання моноклональних і поліклональних антитіл. Може бути використаний повнорозмірний білок BAFF-R, або, альтернативно, даний винахід забезпечує антигенні пептидні фрагменти BAFF-R для застосування як імуногенів. Антигенний пептид BAFF-R включає, щонайменше, 8 амінокислотних залишків амінокислотної послідовності, показаної на Фіг.2D (SEQ ID NO:5), і включає в себе епітоп BAFF-R, так що антитіло, індуковане проти цього пептиду, утворює специфічний імунний комплекс з BAFF-R. Переважно, цей антигенний пептид включає, щонайменше, 10 амінокислотних залишків, більш переважно, щонайменше, 15 амінокислотних залишків, ще більш переважно, щонайменше, 20 амінокислотних залишків і найбільш переважно, щонайменше, 30 амінокислотних залишків. Переважними епітопами, що охоплюються терміном антигенний пептид, є райони BAFF-R, які локалізовані на поверхні цього білка, наприклад, гідрофільні райони.

Як описано тут, послідовність білка BAFF-R Фіг.2D (SEQ ID NO:5) або її похідні, фрагменти, аналоги або гомологи можуть бути використані як імуногени в генеруванні антитіл, які імуноспецифічно зв'язують ці білкові компоненти. Термін «антитіло» в застосуванні тут означає молекули імуноглобуліну і імунологічно активні частини молекул імуноглобуліну, тобто молекули, які містять сайт скріплення антигену, який специфічно зв'язує (імунореагує з ним) антиген, такий як BAFF-R. Такі антитіла включають в себе, але не обмежуються ними, поліклональні, моноклональні, химерні антитіла, однокланцові, Fab і F(ab')<sub>2</sub>-фрагменти і експресуючу Fab бібліотеку. У конкретному варіанті описані антитіла до білків BAFF-R людини. Різні процедури, відомі в даній області, можуть бути використані для одержання поліклональних або моноклональних антитіл до послідовності білка BAFF-R Фіг.2D (SEQ ID NO:5) або його похідного, фрагмента, аналога або гомолога. Деякі з цих білків обговорюються нижче.

Для одержання поліклональних антитіл різні відповідні тварини-хазяї (наприклад, кролик, коза, миша або інший ссавець) можуть бути імунізовані ін'єкцією природним білком або його синтетичним варіантом або їх похідним. Відповідний імуногенний препарат може містити, наприклад, рекомбінантно експресований білок BAFF-R або хімічно синтезований поліпептид BAFF-R. Цей препарат може додатково включати в себе ад'ювант. Різні ад'юванти, що використовуються для збільшення імунологічної відповіді, включають в себе, але не обмежуються ними, ад'ювант Фрейнда (повний або неповний), мінеральні гелі (наприклад, гідроксид алюмінію), поверхнево-активні речовини (наприклад, лізолецитин, плуронікові поліолі, поліаніони, пептиди, масляні емульсії, динітрофенол і т.д.), ад'юванти для людини, такі як Bacille Calmette-Guerin (BCG) і Corynebacterium parvum, або подібні імуностимуляторні агенти. Якщо бажано, молекули антитіл, направлені проти BAFF-R, можуть бути виділені з ссавця (наприклад, з крові) і додатково очищені добре відомими способами,

такими як протеїн А-хроматографія, для одержання IgG-фракції.

Термін «моноклональне антитіло» або «композиція моноклонального антитіла» в застосуванні тут відноситься до популяції молекул антитіл, які містять тільки один вид антигензв'язувального сайту, здатний імунореагувати з конкретним епітопом BAFF-R. Таким чином, композиція моноклонального антитіла звичайно виявляє єдину зв'язувальну афінність відносно конкретного білка BAFF-R, з яким вона імунореагує. Для одержання моноклональних антитіл, направлених проти конкретного білка BAFF-R або його похідних, фрагментів, аналогів або гомологів, може бути використаний будь-який спосіб, який забезпечує продукування молекул антитіл безперервним культивуванням клітинної лінії. Такі способи включають в себе, але не обмежуються ними, гібридомний спосіб [див. Kohler & Milstein, (1975) Nature 256: 495-497]; триомний спосіб; гібридомний спосіб з використанням В-клітин людини [див. Kozbor et al. (1983) Immunol Today 4: 72] і EBV-гібридомний спосіб для одержання моноклональних антитіл людини [див. Cole, et al. IN MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., 1985, pp.77-96]. Моноклональні антитіла людини можуть бути використані в практиці даного винаходу і можуть бути одержані з використанням гібридом людини [Cole et al. (1983) Proc. Natl Acad. Sci. USA 80: 2026-2030] або трансформацією В-клітин людини вірусом Епштейна-Барра in vitro [див. Cole et al. IN MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., 1985 pp.77-96].

Згідно з даним винаходом, способи можуть бути адаптовані для одержання однокланцових антитіл, специфічних для білка BAFF-R [див., наприклад, патент США №4 946 778]. Крім того, способи можуть бути адаптовані для конструювання експресуючих Fab-бібліотек [див. Huse et al. (1989) Science 246: 1275-1281] для можливості швидкої і ефективною ідентифікації моноклональних Fab-фрагментів з бажаною специфічністю відносно білка BAFF-R або його похідних, фрагментів, аналогів або гомологів. Надлюдські антитіла можуть бути «гуманізовані» способами, добре відомими в даній області. [Див., наприклад, патент США з номером 5 225 539]. Фрагменти антитіл, які містять ідіотипи до білка BAFF-R, можуть бути одержані способами, відомими в даній області, в тому числі, але не тільки: (i) P(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, що одержується розщепленням пепсином молекули антитіла; (ii) Fab-фрагмент, що одержується відновленням дисульфідних містків P(ab')<sub>2</sub>-фрагмента; (iii) Fab-фрагмент, що одержується обробкою молекули антитіла папаїном і відновлювальним агентом, і (iv) Fv-фрагменти.

Крім того, рекомбінантні aHTH-BAFF-R-антитіла, такі як химерні і гуманізовані моноклональні антитіла, що містять частини як людини, так і не-людини, які можуть бути одержані з використанням стандартних способів рекомбінантних ДНК, знаходяться в об'ємі даного винаходу. Такі химерні і гуманізовані моноклональні антитіла можуть бути одержані способами рекомбінантних ДНК, відомими в даній області, наприклад, з викорис-

танням способів, описаних в [Міжнародній публікації PCT з номером PCT/US86/02269; Європейській патентній заявці з номером 184 187; Європейській патентній заявці з номером 171 496; Європейській патентній заявці з номером 173 494; Міжнародної публікації PCT з номером WO 86/01533; патенті США з номером 4 816 567; Європейській патентній заявці з номером 125 023; Better et al. (1988) Science 240: 1041-1043; Liu et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443; Liu et al. (1987) J. Immunol. 139: 3521-3526; Sun et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 214-218; Nishimura et al. (1987) Cancer Res. 47: 999-1005; Wood et al. (1985) Nature 314: 446-449; Shaw et al. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80: 1553-1559; Morrison (1985) Science 229: 1202-1207; Oi et al. (1986) BioTechniques 4: 214; U.S. Pat. No. 5,225,539; Jones et al. (1986) Nature 321: 552-525; Verhoeven et al. (1988) Science 239: 1534; i Beidler et al. (1988) J. Immunol. 141: 4053-4060].

В одному варіанті способи для скринінгу анти-тіл, які володіють бажаною специфічністю, включають в себе, але не обмежуються ними, твердо-фазний імуноферментний аналіз (ELISA) та інші імунологічно-опосередковані способи, відомі в даній області. У конкретному варіанті, відбір анти-тіл, які є специфічними відносно конкретного домену білка BAFF-R, полегшується генеруванням гібридом, які зв'язуються з фрагментом білка BAFF-R, що володіє таким доменом. Антитіла, які є специфічними відносно одного або декількох доменів в білку BAFF-R, наприклад, доменів, що охоплюють вищеописані консервативні райони білків сімейства BAFF-R, або їх похідних, фрагментів, аналогів або гомологів, також забезпечені в даному винаході.

АНТН-BAFF-R-антитіла можуть бути використані в способах, відомих в даній області, що відносяться до локалізації і/або кількісного визначення білка BAFF-R (наприклад, для застосування у вимірюванні рівнів білка BAFF-R у відповідних фізіологічних пробах, для застосування в діагностичних способах, для застосування у візуалізації цього білка і т.п.). У конкретному варіанті антитіла для білків BAFF-R або їх похідних, фрагментів, аналогів або гомологів, які містять виникаючий з цих антитіл домен скріплення, використовують як фармакологічно активні сполуки (далі названі «терапевтичними речовинами»).

АНТН-BAFF-R-антитіло (наприклад, моноклональне антитіло) може бути використане для виділення BAFF-R стандартними способами, такими як афінна хроматографія або імунопреципітація. АНТН-BAFF-R-антитіло може полегшувати очищення природного BAFF-R з клітин і рекомбінантно продукованого BAFF-R, експресованого в клітинах-хазяях. Крім того, анти-BAFF-R-антитіло може бути використане для детектування білка BAFF-R (наприклад, в клітинному лізаті або клітинному супернатанті) для оцінки представленості і розподілу експресії білка BAFF-R. АНТН-BAFF-R-антитіла можуть бути використані діагностично для моніторингу рівнів білка в тканинах як частина процедури клінічного випробування, наприклад, для визначення ефективності конкретної схеми

лікування. Детектування може полегшуватися скріпленням (тобто фізичним скріпленням) антитіла з детектованою речовиною. Приклади детектованих речовин включають в себе різні ферменти, простетичні групи, флуоресцентні матеріали, люмінесцентні матеріали, біоломінесцентні матеріали і радіоактивні матеріали. Приклади відповідних ферментів включають в себе пероксидазу хіну, лужну фосфатазу,  $\beta$ -галактозидазу або ацетилхолінестеразу; приклади відповідних комплексів простетичних груп включають в себе стрептавідин/біотин і авідин/біотин; приклади відповідних флуоресцентних матеріалів включають в себе умбеліферон, флуоресцеїн, флуоресцеїнізотіоціанат, родамін, дишпортриазиніламінофлуоресцеїн, дансилхлорид або фікоеритрин; приклад люмінесцентного матеріалу включає в себе люмінол; приклади біоломінесцентних матеріалів включають в себе люциферазу, люциферин і аекворин, і приклади відповідного радіоактивного матеріалу включають в себе  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  або  $^3\text{H}$ .

Рекомбінантні експресуючі BAFF-R вектори і клітини-хазяї Інший аспект даного винаходу відноситься до векторів, переважно експресуючих векторів, що містять нуклеїнову кислоту, що кодує білок BAFF-R або його похідні, фрагменти, аналогів або гомологів. У застосуванні тут термін «вектор» відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, здатної транспортувати іншу нуклеїнову кислоту, з якою він був пов'язаний. Один тип вектора є «плазмідною», яка є кільцевою дволанцюговою петлею ДНК, в яку можуть бути лігвані додаткові ДНК-сегменти. Іншим типом вектора є вірусний вектор, де додаткові ДНК-сегменти можуть бути лігвані у вірусний геном. Деякі вектори здатні до автономної реплікації в клітині-хазяїні, в яку їх вводять (наприклад, бактеріальні вектори, що мають бактеріальний сайт ініціації реплікації (оріджин), і епісомні вектори ссавців). Інші вектори (наприклад, неепісомні вектори ссавців) інтегруються в геном клітини-хазяїна при введенні в клітину-хазяїна і за допомогою цього реплікуються разом з геномом хазяїна. Крім того, деякі вектори здатні до управління експресією генів, з якими вони функціонально пов'язані. Такі вектори називають тут «експресуючими векторами». Звичайно експресуючі вектори, що використовуються в способах рекомбінантних ДНК, часто знаходяться у формі плазмід. У даній заявці терміни «плазмід» і «вектор» можуть використовуватися взаємозамінно, оскільки плазмід є формою вектора, що найчастіше використовується. Однак, даний винахід має на увазі також і інші форми експресуючих векторів, такі як вірусні вектори (наприклад, дефектні за реплікацією ретровіруси, аденовіруси і аденоасоційовані віруси), які виконують еквівалентні функції.

Рекомбінантні експресуючі вектори даного винаходу включають нуклеїнову кислоту даного винаходу у формі, придатній для експресії цієї нуклеїнової кислоти в клітині-хазяїні, що означає, що ці рекомбінантні експресуючі вектори включають в себе одну або декілька регуляторних послідовностей, вибраних на основі клітин-хазяїв, що використовуються для експресії, яка (які) функціонально



пов'язані з підлягаючою експресії нуклеїновою кислотою. У рекомбінантному експресуючому векторі термін «функціонально пов'язана» означає, що нуклеотидна послідовність, яка представляє інтерес, пов'язана з регуляторною послідовністю (регуляторними послідовностями) таким чином, що створюється можливість експресії цієї нуклеотидної послідовності (наприклад, в системі транскрипції/трансляції *in vitro* або в клітині-хазяїні при введенні цього вектора в клітину-хазяїні). Термін «регуляторна послідовність» включає в себе промотори, енхансери та інші елементи регуляції експресії (наприклад, сигнали поліаденілування). Такі регуляторні послідовності описані, наприклад, в [Goeddel «Gene Expression Technology» METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif., 1990]. Регуляторні послідовності включають в себе послідовності, які управляють конститутивною експресією нуклеотидної послідовності в багатьох типах клітин-хазяїв, і послідовності, які управляють експресією нуклеотидної послідовності тільки в певних клітинах-хазяїнах (наприклад, тканеспецифічні регуляторні послідовності). Фахівцям з кваліфікацією в даній області буде зрозуміло, що конструкція експресуючого вектора може залежати від таких факторів як вибір клітини-хазяїна, яка повинна бути трансформована, бажаного рівня експресії білка і т.д. Експресуючі вектори даного винаходу можуть бути введені в клітину-хазяїна для продукування за допомогою цього білків або пептидів, в тому числі злитих білків або пептидів, що кодуються нуклеїновими кислотами, описаними тут (наприклад, білків BAFF-R, мутантних форм BAFF-R, злитих білків і т.д.).

Рекомбінантні експресуючі вектори даного винаходу можуть бути сконструйовані для експресії BAFF-R в прокариотичних або еукаріотичних клітинах. Наприклад, BAFF-R може експресуватись в бактеріальних клітинах, таких як *Escherichia coli*, клітинах комах (з використанням бакуловірусних експресуючих векторів), дріжджових клітинах або клітинах ссавців. Відповідні клітини-хазяї обговорюються додатково в [Goeddel, «Gene Expression Technology» METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif, 1990]. Альтернативно, рекомбінантний експресуючий вектор може транскрибуватись і транслюватись *in vitro*, наприклад, з використанням регуляторних послідовностей промотора T7 і полімерази T7.

Експресію білків в прокариотах найчастіше проводять в *E. coli* з векторами, що містять конститутивні або промотори, що індукуються, керуючі експресією або злитих, або незлитих білків. Вектори злитих білків додають ряд амінокислот до білка, що кодується ними, звичайно до аміно-кінця рекомбінантного білка. Такі вектори злитих білків звичайно служать для досягнення трьох цілей: (1) для збільшення експресії рекомбінантного білка; (2) для збільшення розчинності рекомбінантного білка і (3) для сприяння очищенню рекомбінантного білка за допомогою дії як ліганду при афінному очищенні. Часто в експресуючі злиті білки вектори вводять сайт протеолітичного розщеплення в місці сполучення зливої частини і рекомбінантного білка для забезпечення відділення рекомбінантного білка від

цієї зливої частини після очищення злого білка. Такі ферменти і їх споріднені послідовності розпізнавання, включають в себе фактор Ха, тромбін і ентерокіназу. Типові експресуючі злиті білки вектори включають в себе pGEX [Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson (1988) Gene 67: 31-40], pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) і pRITS (Pharmacia, Piscataway, N.J.), які зливають глутатіон-8-трансферазу (GST), мальтозу Е-зв'язувальний білок або білок А, відповідно, з рекомбінантним білком-мішенню.

Приклади відповідних індукованих експресуючих не злиті білки векторів *E. coli* включають в себе pTrc [(Amrann et al, (1988) Gene 69:301-315) і pET lid (Studier et al, «Gene Expression Technology» METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif., 1990, pp.60-89].

Однією стратегією максимізації експресії рекомбінантного білка в *E. coli* є експресія цього білка в бактерії-хазяїні з порушеною здатністю протеолітичного розщеплення рекомбінантного білка. [Див. Gottesman, «Gene Expression Technology» METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif., 1990, pp.119-128]. Іншою стратегією є зміна послідовності нуклеїнової кислоти, яка повинна бути вбудована в експресуючий вектор, таким чином, що індивідуальні кодони для кожної амінокислоти є кодонами, що переважно використовуються в *E. coli* [Wada et al, (1992) Nucleic Acids Res. 20: 2111-2118]. Така зміна послідовностей нуклеїнових кислот даного винаходу може бути виконана стандартними способами синтезу ДНК.

В іншому варіанті експресуючий BAFF-R вектор є дріжджовим експресуючим вектором. Приклади векторів для експресії в дріжджах (наприклад, *Saccharomyces cerevisiae*) включають в себе pYepSecI [Baldari, et al, (1987) EMBO J. 6: 229-234], pMFa [Kurjan and Herskowitz, (1982) Cell 30: 933-943], pJRY88 [Schultz et al. (1987) Gene 54: 113-123], pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.) і для *P. pastoris* включають в себе сімейство векторів pPIC (Invitrogen Corp, San Diego, Calif.).

Альтернативно, BAFF-R може бути експресований в клітинах комах з використанням бакуловірусних експресуючих векторів. Бакуловірусні вектори, доступні для експресії білків в клітинах комах (наприклад, клітинах SF9), що культивуються, включають в себе серію pAc [Smith et al. (1983) Mol. Cell. Biol. 3: 2156-2165] і серію pVL [Lucklow and Summers (1989) Virology 170: 31-39].

Ще в одному варіанті нуклеїнову кислоту даного винаходу експресують в клітинах ссавців з використанням експресуючого вектора ссавців. Приклади експресуючих векторів ссавців включають в себе pCDMS [Seed (1987) Nature 329: 840-842] і pMT2PC [Kaufman et al. (1987) EMBO J. 6: 187-195]. При використанні в клітинах ссавців функції регуляції цього експресуючого вектора часто забезпечуються вірусними регуляторними елементами. Наприклад, звичайно промотори, що використовуються, одержують з поліоми, аденовірусу 2, цитомегаловірусу і вірусу мавп 40. Відносно інших відповідних систем експресії як для прокариотичних, так і для еукаріотичних клітин [див., наприклад, частини 16 і 17 Sambrook et al., Molecular

Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y., (1989)].

В іншому варіанті рекомбінантний експресуючий вектор ссавців здатний управляти експресією нуклеїнової кислоти переважно (преферентивно) в конкретному типі клітин (наприклад, тканеспецифічні регуляторні елементи використовуються для експресії цієї нуклеїнової кислоти). Тканеспецифічні регуляторні елементи відомі в даній області. Необмежувальні приклади відповідних тканеспецифічних промоторів включають в себе промотор альбуміну (печінка-специфічний; [Pinkert et al. (1987) *Genes Dev.* 1: 268-277]), лімфоїд-специфічні промотори [Calame and Eaton (1988) *Adv. Immunol.* 43: 235-275], зокрема, промотори рецепторів Т-клітин [Winoto and Baltimore (1989) *EMBO J.* 8: 729-733] і імуноглобулінів [Banerji et al. (1983) *Cell* 33: 729-740; Queen and Baltimore (1983) *Cell* 33: 741-748], нейрон-специфічні промотори (наприклад, промотор нейрофіламенту; [Byrne and Ruddle (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5473-5477]), специфічні для підшлункової залози промотори [Edlund et al. (1985) *Science* 230: 912-916] і промотори, специфічні для молочної залози (наприклад, промотор молочної сироватки; [патент США №4 873 316 і Публікація Європейської заявки №264 166]). У даний винахід включені також регульовані стадією розвитку промотори, наприклад, промотори *hox* мишей [Kessel and Gruss (1990) *Science* 249: 374-379] і промотор  $\alpha$ -фетопротеїну (ембріонального білка) [Campes and Tilghman (1989) *Genes Dev.* 3: 537-546].

Далі, даний винахід забезпечує рекомбінантний експресуючий вектор, що включає молекулу ДНК даного винаходу, клоновану в цей експресуючий вектор в антисмисловій орієнтації. Тобто, ця молекула ДНК функціонально пов'язана з регуляторною послідовністю таким чином, що створюється можливість експресії (транскрипцією цієї молекули ДНК) РНК-молекули, яка є антисмисловою відносно мРНК BAFF-R. Регуляторні послідовності, функціонально пов'язані з нуклеїновою кислотою, клоновану в антисмисловій орієнтації, можуть бути вибрані таким чином, що вони управляють безперервною експресією молекули антисмислової РНК в різних типах клітин, наприклад, вірусні промотори і/або енхансери, або регуляторні послідовності можуть бути вибрані таким чином, що вони управляють конститутивною, тканеспецифічною або клітинспецифічною експресією антисмислової РНК. Цей антисмисловий експресуючий вектор може бути у формі рекомбінантної плазміди, фагміди або атенуйованого вірусу, в якому антисмислові нуклеїнові кислоти продукуються під контролем високоефективного регуляторного району, активність якого може бути визначена типом клітин, в які вводиться цей вектор. Відносно дискусії про регуляції експресії генів з використанням антисмислових генів [див. Weintraub et al. (1986) «Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis» *Reviews Trends in Genetics*, 1(1)].

Інший аспект даного винаходу відноситься до клітин-хазяїв, в які був введений рекомбінантний

експресуючий вектор даного винаходу. Терміни «клітина-хазяїн» і рекомбінантна «клітина-хазяїн» використовуються тут взаємозамінно. Зрозуміло, що такі терміни відносяться не тільки до конкретної клітини, що розглядається, але і до потомства або потенційного потомства такої клітини. Оскільки деякі модифікації можуть відбуватися в подальших генераціях внаслідок або мутації, або впливів навколишнього середовища, таке потомство може бути, насправді, неідентичним батьківській клітині, але воно все-таки включено в термін, що використовується тут.

Клітиною-хазяїном може бути будь-яка прокаріотична або еукаріотична клітина. Наприклад, білок BAFF-R може експресуватись в бактеріальних клітинах, таких як *E. coli*, клітинах комах, дріжджових клітинах або клітинах ссавців (таких як клітини яєчника Китайського хом'ячка (CHO) або COS-клітинах). Інші відповідні клітини-хазяї відомі фахівцям з кваліфікацією в даній області.

Векторна ДНК може бути введена в прокаріотичні або еукаріотичні клітини загальноприйнятими способами трансформації або трансфекції. У застосуванні тут терміни «трансформація» і «трансфекція» означають різноманітні визнані в даній області способи введення чужорідної нуклеїнової кислоти (наприклад, ДНК) в клітину-хазяїна, в тому числі кальцій-фосфатну або кальцій-хлоридну копреципітацію, опосередковану ДЕАЕ-декстраном трансфекцію, ліпофекцію або електропорацію. Відповідні способи трансформації або трансфекції клітин-хазяїв можна знайти в [Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y., (1989)] і іншому лабораторному керівництві.

Для стабільної трансфекції клітин ссавців відомо, що в залежності від експресуючого вектора, що використовуються, і способу трансфекції тільки невелика фракція клітин може інтегрувати чужорідну ДНК в їх геном. Для ідентифікації і відбору цих інтегрантів ген, що кодує селектований маркер (наприклад, стійкість до антибіотиків), звичайно вводять в клітини-хазяї разом з геном, яка представляє інтерес. Різні селектовані маркери включають в себе маркери, який додають стійкість до лікарських засобів, таких як G418, пігроміцин і метотрексат. Нуклеїнова кислота, що кодує селектований маркер, може бути введена в клітину-хазяїна на тому ж самому векторі, який кодує BAFF-R, або може бути введена на окремому векторі. Клітини, стабільно трансфіковані введеною нуклеїновою кислотою, можуть бути ідентифіковані відбором з лікарським засобом (наприклад, клітини, які включили ген селектованого маркера, будуть виживати, тоді як інші клітини гинуть).

Клітина-хазяїн даного винаходу, наприклад, прокаріотична або еукаріотична клітина-хазяїн в культурі, може бути використана для продукування (тобто експресії) білка BAFF-R. Таким чином, даний винахід забезпечує додатково способи одержання білка BAFF-R з використанням клітин-хазяїв даного винаходу. В одному варіанті цей спосіб включає в себе культивування клітини-хазяїна даного винаходу (в яку був введений ре-

комбінантний експресуючий вектор, що кодує BAFF-R) у відповідному середовищі, так що продукується білок BAFF-R. В іншому варіанті цей спосіб додатково передбачає виділення BAFF-R з середовища або клітини-хазяїна.

#### Трансгенні тварини

Клітини-хазяї даного винаходу можуть бути також використані для одержання трансгенних тварин, крім людини. Наприклад, в одному варіанті клітиною-хазяїном даного винаходу є запліднений ооцит або ембріональна стовбурова клітина, в яку були введені кодуючі BAFF-R послідовності. Такі клітини-хазяї можуть бути потім використані для створення трансгенних тварин, крім людини, в яких екзогенні послідовності BAFF-R були введені в їх геном, або гомологічних рекомбінантних тварин, в яких ендогенні послідовності BAFF-R були змінені. Такі тварини застосовні для дослідження функції і/або активності BAFF-R і для ідентифікації і/або оцінки модуляторів активності BAFF-R. У застосуванні тут «трансгенна тварина» є твариною, крім людини, переважно ссавцем, більш переважно гризуном, таким як щур або миша, причому одна або більше клітин цієї тварини включають в себе трансген. Інші приклади трансгенних тварин включають приматів (крім людини), овець, собак, корів, кіз, курей, земноводних і т.д. Трансгеном є екзогенна ДНК, яка інтегрується в геном клітини, з якої розвивається трансгенна тварина і яка залишається в геномі зрілої тварини, управляючи експресією продукту, що кодується геном в одному або декількох типах клітин або тканин трансгенної тварини. У застосуванні тут «гомологічна рекомбінантна тварина» є твариною (крім людини), переважно ссавцем, більш переважно мишею, в якій ендогенний ген BAFF-R був змінений гомологічною рекомбінацією між ендогенним геном і екзогенною ДНК-молекулою, введеною в клітину цієї тварини, наприклад, ембріональну клітину цієї тварини, до розвитку цієї тварини.

Трансгенна тварина даного винаходу може бути створена введенням кодуючої BAFF-R нуклеїнової кислоти в чоловічі пронуклеуси заплідненого ооциту, наприклад, мікроін'єкцією, ретровірусною інфекцією, і наданням цьому ооциту можливості розвиватися в псевдовагітній тварині-самці, що виношує. ДНК-послідовність BAFF-R людини Фіг.2А (SEQ ID NO:3), Фіг.2С (SEQ ID NO:4), Фіг.3 (SEQ ID NO:6) може бути введена як трансген в геном тварини (крім людини). Альтернативно, надлюдський гомолог гена BAFF-R людини, такий як ген BAFF-R миші (Фіг.4А) (SEQ ID NO:8), може бути виділений на основі гібридизації з кДНК BAFF-R людини (описаної більш детально вище) і використаний як трансген. Інтронні послідовності і сигнали поліаденілування можуть бути також включені в цей трансген для збільшення ефективності експресії трансгену. Тканеспецифічні регуляторні послідовності можуть бути функціонально пов'язані з трансгеном BAFF-R для управління експресією білка BAFF-R в конкретних клітинах. Способи одержання трансгенних тварин за допомогою маніпуляції і мікроін'єкції ембріона, зокрема, таких тварин як миші, стали загальноприйнятими в даній області і описані, наприклад, в [патенті США

№4 736 866; 4 870 009; і 4 873 191; і Hogan in MANIPULATING THE MOUSE EMBRYO, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986]. Подібні способи використовують для одержання інших трансгенних тварин. Трансгенна тварина-фундатор може бути ідентифікована на основі присутності трансгену BAFF-R в його геномі і/або експресії мРНК BAFF-R в тканинах або клітинах цих тварин. Потім трансгенна тварина-фундатор може бути використана для розведення додаткових тварин, що несуть цей трансген. Крім того, трансгенні тварини, що несуть трансген, що кодує BAFF-R, можуть бути розмножені далі з одержанням інших трансгенних тварин, які несуть інші трансгени.

Для створення гомологічної рекомбінантної тварини готують вектор, який містить, щонайменше, частину гена BAFF-R, в який була введена делеція, додавання або заміну для зміни за допомогою цього, наприклад, функціонального руйнування, гена BAFF-R. Геном BAFF-R може бути ген людини (наприклад, Фіг.2А (SEQ ID NO:3), Фіг.2С (SEQ ID NO:4), Фіг.3 (SEQ ID NO:6)), але більш переважно цей ген є надлюдським гомологом гена BAFF-R людини. Наприклад, мишачий гомолог (Фіг.4А) гена BAFF-R людини Фіг.2А (SEQ ID NO:3), Фіг.2С (SEQ ID NO:4), Фіг.3 (SEQ ID NO:6) може бути використаний для конструювання вектора для гомологічної рекомбінації, придатного для зміни ендогенного гена BAFF-R в мишачому геномі. В одному варіанті цей вектор конструйований таким чином, що, при гомологічній рекомбінації, ендогенний ген BAFF-R є функціонально зруйнованим (тобто він вже не кодує функціональний білок; цей вектор називають також вектором «нокауту»).

Альтернативно, вектор може бути сконструйований таким чином, що, при гомологічній рекомбінації, ендогенний ген BAFF-R є мутованим або іншим чином зміненим, але все ще кодує функціональний білок (наприклад, «лівий» регуляторний район може бути змінений для зміни за допомогою цього експресії ендогенного білка BAFF-R). У векторі для гомологічної рекомбінації змінена частина гена BAFF-R фланкована на його 5'- і 3'-кінцях додатковою нуклеїновою кислотою гена BAFF-R для забезпечення можливості гомологічної рекомбінації між екзогенним геном BAFF-R, що несеться цим вектором, і ендогенним геном BAFF-R в ембріональній стовбуровій клітині. Ця додаткова фланкуюча нуклеїнова кислота BAFF-R має достатню довжину для успішної гомологічної рекомбінації з ендогенним геном. Звичайно у вектор включають декілька т.п.н. фланкуючої ДНК (як на 5'-, так і на 3'-кінцях). [Див., наприклад, Thomas et al. (1987) Cell 51: 503] відносно опису векторів для гомологічної рекомбінації. Цей вектор вводять в лінію ембріональних стовбурових клітин (наприклад, електропорацією), і клітини, в яких введений ген BAFF-R гомологічно рекомбінувався з ендогенним геном, BAFF-R, відбирають [див., наприклад, Li et al. (1992) Cell 69: 915].

Потім відібрані клітини ін'єкують в бластоцисту тварину (наприклад, миші) для утворення агрегованих химер. [Див., наприклад, Bradley, in

TERATOCARCINOMAS AND EMBRYONIC STEM CELLS: A PRACTICAL APPROACH, Robertson, Ed. IRL, Oxford, 1987, pp.113-152]. Потім химерний ембріон може бути імплантований у відповідну псевдовагітну самицю-виношуючу тварину, і ембріон росте до кінця «вагітності». Потомство, яке несе гомологічно рекомбіновану ДНК в їх статевих зародкових клітинах, може бути використане для виведення тварин, в яких всі клітини тварини містять гомологічно рекомбіновану ДНК внаслідок передачі зародковою лінією цього трансгену. Способи конструювання векторів для гомологічної рекомбінації і гомологічні рекомбінантні тварини описані додатково в [Bradley (1991) Curr. Opin. Biotechnol. 2: 823-829; PCT International Publication Nos.: WO 90/11354; WO 91/01140; WO 92/0968; і WO 93/04169].

В іншому варіанті можуть бути одержані трансгенні тварини (крім людини), які містять вибрані системи, які забезпечують регульовану експресію даного трансгену. Одним з прикладів такої системи є система *cre/loxP*-рекомбінази бактеріофага P1. Відносно опису системи *cre/loxP*-рекомбінази [див., наприклад, Lakso et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6232-6236]. Іншим прикладом системи рекомбінази є система рекомбінази FLP *S. cerevisiae* [O'German et al. (1991) Science 251: 1351-1355]. Якщо систему *cre/loxP*-рекомбінази використовують для регуляції експресії трансгену, необхідні тварини, що містять трансгени, що кодують як рекомбіназу Cre, так і вибраний білок. Такі тварини можуть бути забезпечені конструюванням «подвійних» трансгенних тварин, наприклад, спаровуванням двох трансгенних тварин, одна з яких містить трансген, що кодує вибраний білок, а інша містить трансген, що кодує рекомбіназу.

Клони трансгенних тварин (не людини), описані тут, можуть бути також одержані згідно зі способами, описаними в [Wilmot et al. (1997) Nature 385: 810-813]. Коротко, клітина, наприклад, соматична клітина, з трансгенної тварини може бути виділена і індукована для виходу з циклу зростання і вступу в фазу G<sub>0</sub>. Потім клітину, що знаходиться в спокої, зливають, наприклад, з використанням електричних імпульсів, з енуклеїваним ооцитом з тварини того ж виду, з якої виділена клітина, що знаходиться в спокої. Потім реконструйований ооцит культивують таким чином, що він розвивається до морули або бластули, і потім переносять його в псевдовагітну самицю-виношуючу тварину. Потомство, що народилося у такої самиці-виношуючої тварини, буде клоном тварини, з якої виділена ця клітина, наприклад, соматична клітина.

#### Фармацевтичні композиції

Молекули нуклеїнових кислот BAFF-R, білки BAFF-R і анти-BAFF-R-антитіла (також звані тут «активними сполуками») даного винаходу і їх похідні, фрагменти, аналоги і гомологи, можуть бути включені у фармацевтичні композиції, придатні для введення. Такі композиції звичайно містять молекулу нуклеїнової кислоти, білок або антитіло і фармацевтично прийнятний носій. У застосуванні тут «фармацевтично прийнятний носій» включає в

себе будь-які і всі розчинники, диспергуючі середовища, покриття, антибактеріальні і протигрибкові агенти, ізотонічні і затримуючі поглинання агенти і т.п., сумісні з фармацевтичним введенням. Відповідні носії описані в найбільш нещодавньому виданні Remington's Pharmaceutical Sciences, стандартному довіднику в даній області, який включений тут як посилання. Переважні приклади таких носіїв або розріджувачів включають в себе, але не обмежуються ними, воду, сольовий розчин, розчини Рінгера, розчин декстрази і 5% людський сироватковий альбумін. Можуть бути також використані ліпосоми і неводні носії, такі як нелеткі масла. Застосування таких середовищ і агентів для фармацевтично активних речовин відоме в даній області. За винятком загальноприйнятих середовищ або агентів, які несумісні з активною сполукою, передбачається застосування цих середовищ і агентів в цих композиціях. Додаткові активні сполуки також можуть включатися в ці композиції.

Фармацевтичну композицію даного винаходу готують таким чином, щоб вона була сумісною з передбачуваним шляхом її введення. Приклади способів введення включають в себе парентеральне, наприклад, внутрішньовенне, інтрадермальне, підшкірне, пероральне (наприклад, інгаляцією), черезшкірне (локальне), трансмукозне і ректальне введення. Розчини або суспензії, що використовуються для парентерального, інтрадермального або підшкірного введення, можуть включати наступні компоненти: стерильний розріджувач, такий як вода для ін'єкцій, сольовий розчин, нелеткі масла, поліетиленгліколи, гліцерин, пропіленгліколь або інші синтетичні розчинники; антибактеріальні агенти, такі як бензиловий спирт або метилпарабени; антиоксиданти, такі як аскорбінова кислота або бісульфіт натрію; хелатоутворювачі, такі як етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА); буфери, такі як ацетати, цитрати або фосфати, і агенти для корекції тоничності, такі як хлорид натрію або декстроза. pH може коректуватися кислотами або основами, наприклад, хлористоводневою кислотою або гідроксидом натрію. Парентеральний препарат може бути взятий в ампули, одноразові шприци або флакони з множинними дозами, виготовлені з скла або пластику.

Фармацевтичні композиції, придатні для ін'єкцій, включають стерильні водні розчини (якщо вони є водорозчинними) або дисперсії і стерильні порошки для незапланованого приготування стерильних ін'єкційних розчинів або дисперсій. Для внутрішньовенного введення відповідні носії включають фізіологічний розчин, бактеріостатичну воду, Кремофор EL (BASF Parsippany, N.J.) або забуферений фосфатом сольовий розчин (ФСБ). У всіх випадках композиція повинна бути стерильною і повинна бути текучою до міри легкого введення шприцом. Вона повинна бути стабільною в умовах приготування і зберігання і повинна бути збережена проти забруднюючої дії мікроорганізмів, таких як бактерії і грибки. Носієм може бути розчинник або дисперсійне середовище, що містить, наприклад, воду, етанол, поліол (наприклад, гліцерин, пропіленгліколь і рідкий поліетиленгліколь і т.п.), і їх відповідні суміші. Відповідна теку-

чість може підтримуватися, наприклад, використанням покриття, такого як лецитин, за допомогою підтримки необхідного розміру частинок у разі дисперсії і використанням поверхнево-активних речовин. Попередження дії мікроорганізмів може досягатися з використанням різних антибактеріальних і протигрибкових агентів, наприклад, парабенів, хлорбутанолу, фенолу, аскорбінової кислоти, тимерозалу і т.п.В багатьох випадках буде переважне включення ізотонічних агентів, наприклад, цукрів, поліспиртів, такого як маніт, сорбіт, хлорид натрію, в композицію. Пролонговане всмоктування ін'єктованих композицій може досягатися включенням в композицію агента, який пролонгує всмоктування, наприклад, моностеарату алюмінію і желатини.

Стерильні ін'єктовані розчини можуть бути приготовані включенням активної сполуки (наприклад, білка BAFF-R або анти-BAFF-R-антитіла) в необхідній кількості у відповідному розчиннику з одним або з комбінацією інгредієнтів, перерахованих вище, за необхідністю, з подальшою стерилізацією фільтруванням через мікропористу мембрану. Звичайно дисперсії готують включенням активної сполуки в стерильний носій, який містить основне диспергуюче середовище і необхідні інші інгредієнти з інгредієнтів, перерахованих вище. У разі стерильних порошків для приготування стерильних ін'єкційних розчинів способи приготування включають в себе вакуумне сушіння і ліофілізацію, які дають порошок активного інгредієнта плюс будь-який додатковий бажаний інгредієнт з його заздалегідь стерилізованого фільтрацією через мікропористу мембрану розчину.

Пероральні композиції звичайно включають в себе інертний розріджувач або істивний носій. Вони можуть бути укладені в желатинові капсули або спресовані в таблетки. Для цілей перорального терапевтичного введення активна сполука може бути включена з наповнювачами і використана у формі таблеток, пастилок або капсул. Пероральні композиції можуть бути приготовані з використанням рідкого носія для застосування як рідини для полоскання рота, де сполуку в рідкому носії застосовують перорально і прополісують рот і виплювають або проковтують. Фармацевтично сумісні зв'язувальні агенти і/або ад'юванти можуть бути включені як частина цієї композиції. Таблетки, пілюлі, капсули, пастилки і т.п. можуть містити будь-який з наступних інгредієнтів або сполук схожої природи: зв'язувальна речовина, така як мікрокристалічна целюлоза, трагакантова камедь або желатина; наповнювач, такий як крохмаль або лактоза, дезінтегруючий агент, такий як альгінова кислота, Примогель або кукурудзяний крохмаль; змащувальна речовина, така як стеарат магнію або Стеротес; ковзна речовина, така як колоїдальний діоксид кремнію; підсолоджувальний агент, такий як сахароза або сахарин; або ароматизуючий агент, такий як м'ята перцева, метилсаліцилат або апельсинова віддушка.

Для введення інгаляційної сполуки доставляються у формі аерозольного спрею з контейнера, що знаходиться під тиском, або дозатора, який

містить відповідний пропелент, наприклад, газ, такий як діоксид вуглецю, або розпилювача.

Системне введення може здійснюватися також трансмукозним або трансдермальним шляхом (через слизову оболонку або через шкіру). Для трансмукозного або трансдермального введення в композиції використовують підсилювачі проникнення (пенетранти), придатні для бар'єра, який повинен бути перетнутий. Такі посилюючі проникнення агенти звичайно відомі в даній області і включають в себе, наприклад, для трансмукозного введення, детергенти, жовчні кислоти і похідні фусидової кислоти. Трансмукозне введення може виконуватися з використанням спреїв для носа або супозиторіїв. Для трансдермального введення активні сполуки готують у вигляді мазей, пастоподібної маси, гелей або кремів, звичайно відомих в даній області.

Сполуки даного винаходу можуть бути також приготовані у формі супозиторіїв (наприклад, з відповідними основами для супозиторіїв, такими як масло какао і інші гліцериди), або вмісних клізм для ректальної доставки.

В одному варіанті активні сполуки готують з носієм, який буде захищати ці сполуки проти швидкого виведення з тіла, наприклад, у вигляді композиції пролонгованого вивільнення, в тому числі імплантатів і мікроінкапсульованих систем доставки. Можуть використовуватися біодеградовані, біосумісні полімери, такі як етиленвінілацетат, поліангідриди, полігліколева кислота, колаген, поліортоєфіри і полімолочна кислота. Способи приготування таких композицій будуть очевидними для фахівців з кваліфікацією в даній області. Ці матеріали можуть бути також одержані комерційно з Alza Corporation і Nova Pharmaceuticals, Inc. Як фармацевтично прийнятні носії можуть бути також використані ліпосомні суспензії (в тому числі ліпосоми, націлені на інфіковані клітини моноклональними антитілами до вірусних антигенів). Вони можуть бути приготовані згідно зі способами, відомими фахівцям з кваліфікацією в даній області, наприклад, як описано в [патенті США №4 522 811].

Особливо вигідно готувати пероральні або парентеральні композиції у формі уніфікованих (стандартних) доз для легкості введення і однорідності доз. Формою стандартної дози в застосуванні тут називають фізично дискретні стандартні одиниці у вигляді одиничних доз для суб'єкта, що проходить лікування; причому кожна стандартна одиниця містить задану кількість активної сполуки, розраховану таким чином, що вона виконує бажану терапевтичну дію, разом з необхідним фармацевтичним носієм. Специфікація для форм стандартних доз даного винаходу диктується унікальними характеристиками конкретного активної сполуки і конкретного терапевтичного ефекту, який бажано одержати, і залежить безпосередньо від цих характеристик і ефекту.

Молекули нуклеїнових кислот даного винаходу можуть бути інсертовані у вектори і використані як вектори генотерапії. Вектори генотерапії можуть доставлятися суб'єкту будь-яким шляхом введення, наприклад, як описано в [патенті США з номе-

ром 5 703 055]. Таким чином, доставка може включати, наприклад, внутрішньовенну ін'єкцію, локальне введення [див. патент США №5 328 470] або стереотаксичну ін'єкцію [див., наприклад, Chen et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 3054-3057]. Фармацевтичний препарат вектора генотерапії може включати вектор генотерапії в прийнятному розріджувачі або може містити матрикс для уповільненого вивільнення, в який впроваджений вектор доставки гена. Альтернативно, якщо повний вектор доставки гена не може бути одержаний інтактним з рекомбінантних клітин, наприклад, ретровірусні вектори, фармацевтичний препарат може включати в себе одну або декілька клітин, які продукують систему доставки гена.

Фармацевтичні композиції можуть бути упаковані в контейнер, упаковку або розподільний пристрій разом з інструкціями для введення.

Застосування і способи винаходу

Молекули нуклеїнових кислот, білки, гомологи білків і антитіла, описані тут, можуть бути використані в одному або декількох з наступних способів: (a) скринінг-аналіз; (b) аналізах детектування (наприклад, хромосомному картуванні, гістотипуванні, судовій біології), (c) прогностичній медицині (наприклад, діагностичних аналізах, прогностичних аналізах, моніторингу клінічних випробувань і фармакогеномії); і (d) способах лікування (наприклад, терапевтичного або профілактичного). Як описано тут, в одному варіанті білок BAFF-R даного винаходу здатний зв'язувати BAFF.

Ізольовані молекули нуклеїнових кислот даного винаходу можуть бути використані для експресії білка BAFF-R (наприклад, через рекомбінантний експресуючий вектор в клітині-хазяїні при застосуваннях в генотерапії), для детектування мРНК BAFF-R (наприклад, в біологічній пробі) або генетичного пошкодження в гені BAFF-R, і для модуляції активності BAFF або BAFF-R, як описано додатково нижче. Крім того, білки BAFF-R можуть бути використані для скринінгу лікарських засобів або сполук, які модулюють активність або експресію BAFF-R, а також для лікування порушень, що характеризуються недостатнім або надмірним продукуванням BAFF і/або білка BAFF-R, або продукуванням форм білка BAFF-R, які мають зменшену або активність, що відхиляється від норми в порівнянні з білком BAFF-R дикого типу. Крім того, анти-BAFF-R-антитіла даного винаходу можуть бути використані для детектування і виділення білків BAFF-R і модуляції активності BAFF і/або BAFF-R.

Даний винахід відноситься також до нових агентів, ідентифікованих вищеописаними скринінг-аналізами, і їх застосуванням для способів лікування, описаних тут.

Скринінг-аналізи

Даний винахід забезпечує спосіб (також названий тут «скринінг-аналізом») для ідентифікації модуляторів, тобто кандидатів або тест-сполук або агентів (наприклад, пептидів, пептидоміметиків, невеликих молекул або інших лікарських засобів), які зв'язуються з білками BAFF-R або надають стимуляторну або інгібіторну дію, наприклад, на експресію BAFF-R або активність BAFF-R.

В одному варіанті даний винахід забезпечує аналізи для скринінгу кандидатів або тест-сполук, які зв'язуються з білком або поліпептидом BAFF-R або його біологічно активною частиною або модулюють активність білка або поліпептиду BAFF-R або його біологічно активної частини. Тест-сполуки даного винаходу можуть бути одержані будь-яким з численних підходів в способах з використанням комбінаторних бібліотек, відомих в даній області, в тому числі: біологічних бібліотек; паралельних твердофазних, що просторово розділяються, або «рідкофазних» бібліотек; способів синтетичних бібліотек, що вимагають обернення згортки при аналізі цифрового зображення; способу бібліотек типу «одна-гранула одна-сполука» і способів синтетичних бібліотек, що використовують відбір з використанням афінної хроматографії. Підхід біологічних бібліотек обмежений пептидними бібліотеками, тоді як чотири інших підходи застосовні до бібліотек сполук пептидів, непептидних олігомерів або невеликих молекул [Lam (1997) *Anticancer Drug Des.* 12: 145-167].

Приклади способів для синтезу молекулярних бібліотек можуть бути знайдені в даній області, наприклад, в: [DeWitt et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6909-6013; Erb et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11422-11426; Zuckermann et al. (1994) *J. Med. Chem.* 37: 2678-2685; Cho et al. (1993) *Science* 261: 1303; Carrell et al. (1994) *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2059; Carrell et al. (1994) *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2061; і Gallop et al. (1994) *J. Med. Chem.* 37: 1233-1251].

Бібліотеки сполук можуть бути представлені в розчині [наприклад, Houghten (1992) *Biotechniques* 13: 412-421] або на гранулах [Lam (1991) *Nature* 354: 8 2-84], на чіпах [Fodor (1993) *Nature* 364: 555-556], бактеріях [Ladner, патент США №5 223 409], спорах [Ladner, патент США 5 223 409], плазмідах [Cull et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1865-1869] або на фарі [Scott and Smith (1990) *Science* 249: 386-390; Devlin (1990) *Science* 249: 404-406; Cwirla et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6378-6382; Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 301-310; Ladner, патент США 5 223 409].

В одному варіанті аналізом є аналіз на основі клітин, в якому клітину, яка експресує мембранозв'язану форму білка BAFF-R або його біологічно активну частину на поверхні клітини, контактують з тест-сполукою і визначають здатність цієї тест-сполуки зв'язуватися з білком BAFF-R. Клітина може походити, наприклад, з ссавця або з дріжджів. Визначення здатності тест-сполуки зв'язуватися з білком BAFF-R може виконуватися, наприклад, скріпленням тест-сполуки з радіоізотопною або ферментативною міткою, так що скріплення тест-сполуки з білком BAFF-R або його біологічно активною частиною може бути визначено детектування міченої сполуки в комплексі. Наприклад, тест-сполуки можуть бути помічені  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$  або  $^3\text{H}$ , прямо або опосередковано, і радіоізотоп може бути детектований прямим рахунком радіовипромінювання або сцинтиляційним рахунком. Альтернативно, тест-сполуки можуть бути ферментативно міченими, наприклад, пероксидазою хрину, лужною фосфатазою або люциферазою, і ферме-

нтативна мітка може бути детектована визначенням перетворення відповідного субстрату в продукт. В одному варіанті цей аналіз передбачає контактування клітини, яка експресує мембранозв'язану форму білка BAFF-R або його біологічно активну частину на клітинній поверхні, з відомою сполукою, яка зв'язує BAFF-R, для утворення тест-суміші, контактування цієї тест-суміші з тест-сполукою і визначення здатності тест-сполуки взаємодіяти з білком BAFF-R, де визначення здатності тест-сполуки взаємодіяти з білком BAFF-R передбачає визначення здатності цієї тест-сполуки переважно зв'язуватися з BAFF-R або його біологічно активною частиною в порівнянні з відомою сполукою.

В іншому варіанті аналізом є аналіз на основі клітин, що передбачає контактування клітини, яка експресує мембранозв'язану форму білка BAFF-R або його біологічно активну частину на поверхні клітини, з тест-сполукою і визначення здатності цієї тест-сполуки модулювати (наприклад, стимулювати або інгібувати) активність білка BAFF-R або його біологічно активної частини. Визначення здатності тест-сполуки модулювати активність BAFF-R або його біологічно активної частини може виконуватися, наприклад, визначенням здатності білка BAFF-R зв'язуватися або взаємодіяти з молекулою-мішенню BAFF-R. У застосуванні тут «молекула-мішень» є молекулою, з якою білок BAFF-R зв'язується або взаємодіє в природі, наприклад, молекулою на поверхні клітини, яка експресує білок BAFF-R, молекулою на поверхні другої клітини, молекулою у позаклітинному оточенні, молекулою, пов'язаною з внутрішньою поверхнею клітинної мембрани, або цитоплазматичною молекулою. Молекула-мішень BAFF-R може не бути BAFF-R-молекулою або білком або поліпептидом BAFF-R даного винаходу. В одному варіанті молекула-мішень BAFF-R є компонентом шляху трансдукції сигналу, який полегшує трансдукцію позаклітинного сигналу (наприклад, сигналу, що генерується скріпленням сполуки з мембранозв'язаною молекулою BAFF-R) через цю клітинну мембрану і в клітину. Ця мішень може бути, наприклад, другим міжклітинним білком, який має каталітичну активність, або білком, який полегшує скріплення що знаходяться нижче по ходу трансдукції сигналу молекул з BAFF-R, які передають сигнал.

Визначення здатності білка BAFF-R зв'язуватися або взаємодіяти з молекулою-мішенню BAFF-R може виконуватися одним зі способів, описаних вище для визначення прямого скріплення. В одному варіанті визначення здатності білка BAFF-R зв'язуватися або взаємодіяти з молекулою-мішенню BAFF-R може виконуватися визначенням активності молекули-мішені. Наприклад, активність молекули-мішені може бути визначена детектуванням індукції клітинного повторного месенджера мішені (тобто внутрішньоклітинного  $\text{Ca}^{2+}$ , діацилглицерину, IP3 і т.д.), детектуванням каталітичної/ферментативної активності мішені на відповідному субстраті, детектуванням індукції репортерного гена (що містить регуляторний елемент, що відповідає на BAFF-R, функціонально пов'яза-

ний з нуклеїновою кислотою, що кодує детектований маркер, наприклад, люциферазу) або детектуванням клітинної реакції, наприклад, виживання клітини, клітинного диференціювання або проліферації клітин.

Ще в одному варіанті аналізом даного винаходу є безклітинний аналіз, що передбачає контактування білка BAFF-R або його біологічно активної частини з тест-сполукою і визначення здатності цієї тест-сполуки зв'язуватися з білком BAFF-R або його біологічно активною частиною. Скріплення тест-сполуки з білком BAFF-R може бути визначене або прямо, або опосередковано, як описано вище. В одному варіанті цей аналіз передбачає контактування білка BAFF-R або його біологічно активної частини з відомою сполукою, яка зв'язує BAFF-R, з утворенням тест-суміші, контактування цієї тест-суміші з тест-сполукою і визначення здатності тест-сполуки взаємодіяти з білком BAFF-R, де визначення здатності тест-сполуки взаємодіяти з білком BAFF-R передбачає визначення здатності цієї тест-сполуки переважно зв'язуватися з BAFF-R або його біологічно активною частиною в порівнянні з відомою сполукою.

В іншому варіанті цим аналізом є безклітинний аналіз, що передбачає контактування білка BAFF-R або його біологічно активної частини з тест-сполукою і визначення здатності цієї тест-сполуки модулювати (наприклад, стимулювати або інгібувати) активність білка BAFF-R або його біологічно активної частини. Визначення здатності тест-сполуки модулювати активність BAFF-R може виконуватися, наприклад, визначенням здатності білка BAFF-R зв'язуватися з молекулою-мішенню BAFF-R одним з описаних вище способів для визначення прямого скріплення. У альтернативному варіанті визначення здатності тест-сполуки модулювати активність BAFF-R може виконуватися визначенням здатності білка BAFF-R додатково модулювати молекулу-мішень BAFF-R. Наприклад, може бути визначена каталітична/ферментативна активність молекули-мішені на відповідному субстраті, як описано раніше.

Ще в одному варіанті цей безклітинний аналіз передбачає контактування білка BAFF-R або його біологічно активної частини з відомою сполукою, яка зв'язує BAFF-R, з утворенням тест-суміші, контактування цієї тест-суміші з тест-сполукою і визначення здатності тест-сполуки взаємодіяти з білком BAFF-R, де визначення здатності тест-сполуки взаємодіяти з білком BAFF-R передбачає визначення здатності білка BAFF-R переважно зв'язуватися з молекулою-мішенню BAFF-R або модулювати активність молекули-мішені BAFF-R.

Безклітинні аналізи даного винаходу придатні для застосування як розчинної форми, так і мембранозв'язаної форми BAFF-R. У разі безклітинних аналізів, що містять мембранозв'язану форму BAFF-R, може бути бажаним використати сольобілізуючий агент, щоб мембранозв'язана форма BAFF-R підтримувалася в розчині. Приклади таких сольобілізуючих агентів включають неіонні детергенти, такі як н-октилглюкозид, н-додецилглюкозид, н-додецилмальтозид, октаноїл-М-метилглюкамід, деканоїл-Н-метилглюкамід,

Тритон® X-100, Тритон® X-114, Тезит®, ізотридециполі(простий ефір етиленгліколю)<sub>n</sub>, 3-(3-холомідопропіл)диметиламініол-1-пропансульфонат (CHAPS), 3-(3-холомідопропіл)диметиламініол-2-гідрокси-1-пропансульфонат(CHAPSO) або N-додецил-N,N-диметил-3-амоніо-1-пропансульфонат.

У більш ніж одному варіанті вищеописаних способів даного винаходу може бути бажаною іммобілізація або BAFF-R, або його молекули-мішені для полегшення відділення форм, що утворили комплекси, від форм одного або обох білків, що не утворили комплекси, а також для забезпечення автоматизації цього аналізу. Скріплення тест-сполуки з BAFF-R або взаємодія BAFF-R з молекулою-мішенню в присутності або у відсутності сполуки-кандидата може виконуватися в будь-якій посудині, придатній для вміщення реагуючих речовин. Приклади таких посудин включають в себе мікротитраційні планшети, тест-пробірки і мікроцентрифужні пробірки. В одному варіанті може бути забезпечений злитий білок, який додає домен, який дозволяє одному або обом білкам зв'язуватися з матриксом. Наприклад, злиті білки GST-BAFF-R або злиті білки GST-мішень можуть бути адсорбовані на гранулах глутатіон-сефарози (Sigma Chemical, St. Louis, MO) або дериватизованих глутатіоном мікротитраційних планшетах, які потім об'єднують з тест-сполукою або тест-сполукою і або неадсорбованим білком-мішенню, або білком BAFF-R, і суміш інкубують в умовах, які сприяють утворенню комплексу (наприклад, фізіологічних умовах відносно солі і рН). Після інкубування гранули або ямки мікротитраційного планшета промивають для видалення всіх компонентів, які не зв'язались, матрикс іммобілізують у разі гранул, комплекс визначають або прямо, або опосередковано, наприклад, як описано вище. Альтернативно, ці комплекси можуть бути дисоційовані з матриксу, і рівень скріплення або активності BAFF-R визначають з використанням стандартних способів.

Інші способи іммобілізації білків на матриксах можуть бути також використані в скринінг-аналізах даного винаходу. Наприклад, або BAFF-R, або його молекула-мішень можуть бути іммобілізовані з використанням кон'югації біотину і стрептавідину. Біотинільовані молекули BAFF-R або його молекули-мішені можуть бути одержані з біотин-NHS (N-гідроксисукцинімід) з використанням способів, добре відомих в даній області (наприклад, набір для біотинілювання, Pierce Chemicals, Rockford, Ill), і іммобілізовані в ямках покритих стрептавідином 96-ямкових планшетів (Pierce Chemical). Альтернативно, антитіла, реактивні з BAFF-R або молекулами-мішенями, але які не заважають скріпленню білка BAFF-R з його молекулою-мішенню, можуть бути дериватизовані з ямками планшета і непов'язана мішень або BAFF-R вловлюються в цих ямках кон'югацією з антитілами. Способи детектування таких комплексів, нарівні з описаними вище для GST-іммобілізованих комплексів, включають в себе імунодетектування комплексів з використанням антитіл, реактивних з BAFF-R або молекулою-мішенню, а також пов'язаних з ферме-

нтом аналізів, які основані на детектуванні ферментативної активності, пов'язаної з BAFF-R або молекулою-мішенню.

В іншому варіанті модулятори експресії BAFF-R ідентифікують в способі, в якому клітину контактують зі сполукою-кандидатом і визначають експресію мРНК або білка BAFF-R в цій клітині. Рівень експресії мРНК або білка BAFF-R в присутності сполуки-кандидата порівнюють з рівнем експресії мРНК або білка BAFF-R у відсутності сполуки-кандидата. Потім сполука-кандидат може бути ідентифікована як модулятор експресії BAFF-R на основі цього порівняння. Наприклад, коли експресія мРНК або білка BAFF-R є більш високою (статистично значуще більш високою) в присутності сполуки-кандидата, ніж в її відсутності, сполука-кандидат ідентифікують як стимулятор експресії мРНК або білка BAFF-R. Альтернативно, коли експресія мРНК або білка BAFF-R є більш низькою (статистично значуще більш низькою) в присутності сполуки-кандидата, ніж в її відсутності, сполука-кандидат ідентифікують як інгібітор експресії мРНК або білка BAFF-R. Рівень експресії мРНК і білка BAFF-R в клітині може бути визначений способами, описаними тут, для детекції мРНК і білка BAFF-R.

Ще в одному варіанті даного винаходу білки BAFF-R можуть бути використані як «білки-приманки» в двогибридному аналізі або тригибридному аналізі [див., наприклад, патент США №5 283 317; Zervos et al. (1993) Cell 72: 223-232; Madura et al. (1993) J. Biol. Chem. 268: 12046-12054; Bartel et al. (1993) Biotechniques 14: 920-924; Iwabuchi et al. (1993) Oncogene 8: 1693-1696; і Brent WO 94/10300], для ідентифікації інших білків, які зв'язуються або взаємодіють з BAFF-R («BAFF-R-зв'язувальних білків» або «BAFF-R-bp») і модулюють активність BAFF-R. Такі BAFF-R-зв'язувальні білки, очевидно, також беруть участь в розмноженні сигналів білками BAFF-R як, наприклад, елементи, розташовані вище або нижче по ходу передачі сигналу в дорозі BAFF-R.

Двогибридна система основана на модуляторній природі більшості факторів транскрипції, які складаються з ДНК-зв'язувального і активуючого доменів, що розділяються. Коротко, цей аналіз використовує дві різні ДНК-конструкції. В одній конструкції ген, який кодує BAFF-R, злитий з геном, що кодує ДНК-зв'язувальний домен відомого фактора транскрипції (наприклад, GAL-4). В іншій конструкції ДНК-послідовність з бібліотеки ДНК-послідовностей, яка кодує неідентифікований білок («жертву» або «пробу»), зливають з геном, який кодує активуючий домен цього відомого фактора транскрипції. Якщо білок-«приманка» і білок-«жертва» здатні взаємодіяти *in vivo* з утворенням BAFF-R-залежного комплексу, ДНК-зв'язувальний і активуючий домени цього фактора транскрипції приводяться в тісну близькість. Ця близькість забезпечує можливість репортерного гена (наприклад, LacZ), який функціонально пов'язаний з регуляторним сайтом транскрипції, що відповідає на цей фактор транскрипції. Експресія репортерного гена може бути детектована, і колонії клітин, що містять цей функціональний фактор



транскрипції, можуть бути виділені і використані для одержання клонованого гена, який кодує білок, взаємодіючий з BAFF-R.

Крім того, даний винахід відноситься до нових агентів, ідентифікованих вищеописаними скринінг-аналізами, і їх застосуванням для лікування, як описано тут.

#### Аналізи детектування

Частини або фрагменти кДНК-последовностей, ідентифікованих тут (і відповідних повних генних последовностей), можуть бути використані для численних цілей як полінуклеотидні реагенти. Наприклад, ці последовності можуть бути використані для: (i) картування їх відповідних генів на хромосомі; i, отже, локалізації районів генів, пов'язаних з генетичним захворюванням; (ii) ідентифікації індивідуума при використанні дуже невеликої біологічної проби (тканинного типування); i (iii) сприяння в судовій ідентифікації біологічної проби. Ці застосування описані в підрозділах нижче.

#### Хромосомне картування

Після виділення последовності (або частини цієї последовності) гена ця последовність може бути використана для локалізації цього гена на хромосомі. Цей процес називають хромосомним картуванням. Таким чином, частини або фрагменти BAFF-R, последовності, описані вище, можуть бути використані для картування місцеположення (позиціонування) генів BAFF-R, відповідно, на хромосомі. Картування последовностей BAFF-R відносно хромосом є важливим першим рівнем в кореляції цих последовностей з генами, асоційованими із захворюванням.

Коротко, гени BAFF-R можуть бути картовані відносно хромосом одержанням ПЛР-праймерів (переважно довжиною 15-25п.н.) з последовностей BAFF-R. Комп'ютерний аналіз последовностей BAFF-R може бути використаний для швидкого відбору праймерів, які не тягнуться більш ніж на один екзон, в геномній ДНК, ускладнюючи, таким чином, процес ампліфікації. Потім ці праймери можуть бути використані для ПЛР-скринінгу соматичних клітинних гібридів, що містять індивідуальні хромосоми даного виду. Тільки гібриди, що містять видоспецифічний ген, відповідний последовностям BAFF-R, будуть давати ампліфікований фрагмент.

ПЛР-картування соматичних клітинних гібридів є швидкою процедурою для віднесення конкретної последовності до конкретної хромосоми. Три або більше последовності можуть бути віднесені в день з використанням одного термоциклера. З використанням последовностей BAFF-R для конструювання олігонуклеотидних праймерів сублокалізація може досягатися з панелями фрагментів зі специфічних хромосом.

Гібридизація з флуоресценцією *in situ* (FISH) ДНК-последовності з метафазним розгортанням хромосом може додатково використовуватися для забезпечення визначення точного хромосомного місцеположення в одній стадії. Хромосомні розгортання можуть бути одержані з використанням клітин, поділ яких був заблокований в метафазі хімікалієм, подібним колцеміду, який руйнує міотичне веретено. Хромосоми можуть бути короткочасно оброблені трипсином і потім забарвлені ба-

рвником Гімза. Розподіл світлих і темних смуг (бендів) виявляється на кожній хромосомі, так що хромосоми можуть бути ідентифіковані індивідуально. Спосіб FISH може бути використаний з ДНК-последовністю такою короткою, як 500 або 600 основ. Однак, клони, більш великі, ніж 1000 основ, мають велику імовірність скріплення з унікальним хромосомним місцеположенням з достатньою інтенсивністю сигналу для простого детектування. Переважно, 1000 основ і більш переважно 2000 основ будуть достатніми для одержання хороших результатів протягом прийнятного періоду часу. Відносно огляду цього способу [див. Verma et al. *Human Chromosomes: A manual of basic techniques*, Pergamon Press, N.Y., 1988].

Реагенти для хромосомного картування можуть бути використані індивідуально для маркування окремої хромосоми або окремого сайту на цій хромосомі, або можуть бути використані панелі реагентів для маркування множинних сайтів і/або множинних хромосом. Реагенти, відповідні некодуючим районам генів, в цей час є переважними для цілей картування. Кодуючі последовності з більшою імовірністю є консервативними в сімействах генів, що збільшує шанс перехресних гібридацій під час хромосомного картування.

Після картування последовності в точному хромосомному місцеположенні фізичне положення цієї последовності на хромосомі може корелюватися з даними генетичної карти. Такі дані можна знайти, наприклад, в [McKusick, *Mendelian Inheritance in Man*, доступної on-line через Johns Hopkins University Welch Medical Library]. Потім взаємозв'язок між генами і захворюванням, картованим в тому ж самому хромосомному районі, може бути ідентифікований за допомогою аналізу зчеплення (спільного успадкування фізично суміжних генів), описаного, наприклад, в [Egeland et al. (1987) *Nature*, 325: 783-787].

Крім того, можуть бути визначені відмінності в ДНК-последовностях між індивідуумами, ураженими і не ураженими захворюванням, пов'язаним з геном BAFF-R. Якщо мутація спостерігається в деяких або всіх уражених індивідуумах, але не в якому-небудь неуразеному індивідуумові, то ця мутація, очевидно, є причинним фактором цього конкретного захворювання. Порівняння уражених і неуразених індивідуумів звичайно включає в себе перший пошук на структурні зміни в хромосомах, такі як делеції або транслокації, які є видимими з розгортань хромосом або можуть бути детектовані з використанням ПЛР на основі цієї ДНК-последовності. Нарешті, може бути виконане повне секвенування генів з декількох індивідуумів для підтвердження присутності мутації і для відмінності мутацій від поліморфізму.

#### Тканинне типування

Последовності BAFF-R даного винаходу можуть бути також використані для ідентифікації індивідуумів при використанні дуже маленьких біологічних проб. У цьому способі геномну ДНК індивідуума розщеплюють одним або декількома рестрикційними ферментами (рестриктазами) і зондують на Саузерн-блоті з одержанням унікальних смуг (бендів) для ідентифікації. Последовності

даного винаходу застосовні як додаткові ДНК-маркери для аналізу RFLP («поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів», ПДРФ), описаного в [патенті США №5 272 057].

Крім того, послідовності даного винаходу можуть бути використані для забезпечення альтернативного способу, який визначає дійсну ДНК-послідовність, основа-за-основою, вибраних частин геному індивідуума. Таким чином, послідовності BAFF-R, описані тут, можуть бути використані для одержання двох ПЛР-праймерів з 5'- і 3'-кінців цих послідовностей. Ці праймери можуть бути потім використані для ампліфікації ДНК індивідуума і потім секвенування її.

Панелі відповідних ДНК-послідовностей з індивідуумів, одержані таким чином, можуть забезпечити унікальну ідентифікацію індивідуумів, оскільки кожний індивідуум буде мати унікальний набір таких ДНК-послідовностей внаслідок алельних відмінностей. Послідовності даного винаходу можуть бути використані для одержання таких ідентифікуючих послідовностей з індивідуумів і з тканини. Послідовності BAFF-R даного винаходу унікально представляють частини геному людини. Алельна варіація має місце до деякої міри в кодуючих районах цих послідовностей і в більшій мірі в некодуючих районах. Оцінюється, що алельна варіація між індивідуальними людьми відбувається з частотою приблизно один раз на кожні 500 основ. Велика частина цієї алельної варіації зумовлена поліморфізмом єдиного нуклеотиду (SNP), який включає в себе поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів (RFLP).

Кожна з описаних тут послідовностей може до деякої міри бути використана як стандарт, з яким може порівнюватися ДНК з індивідуума для цілей ідентифікації. Оскільки великі числа поліморфізму зустрічаються в некодуючих районах, менші послідовності потрібні для диференціації (розрізнення) індивідуумів. Некодуючі послідовності Фіг.1А (SEQ ID NO:1), Фіг.1В (SEQ ID NO:2), Фіг.2А (SEQ ID NO:3), Фіг.2В (SEQ ID NO:4), Фіг.3 (SEQ ID NO:6) можуть зручним чином забезпечувати позитивну ідентифікацію індивідуумів з панеллю з, можливо, 10-1000 праймерів, кожний з яких дає некодуючу ампліфіковану послідовність з 100 основ. Якщо використовуються передбачені кодуючі послідовності, такі як Фіг.1А (SEQ ID NO:1), Фіг.1В (SEQ ID NO:2), Фіг.2А (SEQ ID NO:3), Фіг.2В (SEQ ID NO:4), Фіг.3 (SEQ ID NO:6), більш відповідним числом праймерів для позитивної ідентифікації індивідуумів було б 500-2000.

#### Прогностична медицина

Даний винахід відноситься також до області прогностичної медицини, в якій діагностичні аналізи, прогностичні аналізи, фармакогеноміка і моніторинг клінічних випробувань використовуються для прогнозування цілей для профілактичного лікування індивідуума на основі цього прогнозу. Таким чином, один аспект даного винаходу відноситься до діагностичних аналізів для визначення експресії білка і/або нуклеїнової кислоти BAFF-R, а також активності BAFF-R в контексті біологічної проби (наприклад, крові, сироватки, клітин, тканини) для визначення за допомогою цього, чи уражений ін-

дивідуум захворюванням або порушенням, або він знаходиться при ризику розвитку порушення, пов'язаного з експресією або активністю BAFF-R, що відхиляється від норми. Даний винахід забезпечує також прогностичні (або які прогнозують) аналізи для визначення, чи знаходиться індивідуум при ризику розвитку порушення, пов'язаного з білком BAFF-R, експресією нуклеїнової кислоти або активністю. Наприклад, мутації в гені BAFF-R можуть аналізуватися в біологічній пробі. Такі аналізи можуть бути використані для прогностичної або прогнозуючої мети для того, щоб профілактично лікувати індивідуума до виникнення порушення, що характеризується білком BAFF-R, експресією нуклеїнової кислоти або активністю BAFF-R або пов'язаного з білком BAFF-R, експресією нуклеїнової кислоти або активністю BAFF-R.

Інший аспект даного винаходу забезпечує спосіб для визначення білка BAFF-R, експресії нуклеїнової кислоти або активності BAFF-R в індивідуумові, для вибору за допомогою цього відповідних терапевтичних або профілактичних агентів для цього індивідуума (далі названого тут «фармакогеномікою»). Фармакогеноміка забезпечує можливість вибору агентів (наприклад, лікарських засобів) для терапевтичного або профілактичного лікування індивідуума на основі генотипу цього індивідуума (наприклад, генотипу індивідуума, дослідженого для визначення здатності цього індивідуума відповідати на конкретний агент).

Ще в одному аспекті даний винахід відноситься до моніторингу впливу агентів (наприклад, лікарських засобів, сполук) на експресію або активність BAFF-R в клінічних випробуваннях.

Ці і інші агенти описані більш детально в наступних розділах.

#### Діагностичні аналізи

Наведений як приклад спосіб для детектування присутності або відсутності BAFF-R в біологічній пробі передбачає одержання біологічної проби з випробуваного суб'єкта і контактування цієї біологічної проби зі сполукою або агентом, здатним детектувати білок BAFF-R або нуклеїнову кислоту (наприклад, мРНК, геномну ДНК), яка кодує білок BAFF-R, так що присутність BAFF-R детектується в цій біологічній пробі. Агентом для детектування мРНК або геномної ДНК BAFF-R є мічений зонд нуклеїнової кислоти, здатний гібридизуватись з мРНК або геномною ДНК BAFF-R. Зонд нуклеїнової кислоти може бути, наприклад, повнорозмірною нуклеїновою кислотою BAFF-R, такою як нуклеїнової кислоти будь-кого з Фіг.1А (SEQ ID NO:1), Фіг.1В (SEQ ID NO:2), Фіг.2А (SEQ ID NO:3), Фіг.2В (SEQ ID NO:4), Фіг.3 (SEQ ID NO:6), або їх частиною, такою як олігонуклеотид з довжиною, щонайменше, 15, 30, 50, 100, 250 або 500 нуклеотидів і достатньою для специфічної гібридизації при жорстких умовах з мРНК або геномною ДНК BAFF-R. Тут описані інші відповідні зонди для застосування в діагностичних аналізах даного винаходу.

Агентом для детектування білка BAFF-R є антитіло, здатне зв'язуватися з білком BAFF-R, переважно антитіло з детектованою міткою. Антитіла можуть бути поліклональними або більш переважно моноклональними. Може використовуватись

інтактне антитіло або його фрагмент (наприклад, Fab або  $F(ab')_2$ ). Термін «мічені» відносно зонда або антитіла включає в себе пряме мічення зонда або антитіла скріпленням (тобто фізичним скріпленням) детектованої речовини з цим зондом або антитілом, а також посереднє мічення зонда або антитіла за допомогою реактивності з іншим реагентом, який є безпосередньо міченим. Приклади посереднього мічення включають детектування первинного антитіла з використанням флуоресцентно міченого вторинного антитіла і кінцевого мічення ДНК-зонда біотином, так що він може бути детектований флуоресцентно міченим стрептавідином. Термін «біологічна проба» включає в себе тканини, клітини і біологічні рідини, виділені з суб'єкта, а також тканини, клітини і рідини, присутні в суб'єкті. Тобто спосіб детектування даного винаходу може бути використаний для детектування мРНК, білка або геномної ДНК BAFF-R в біологічній пробі *in vitro*, а також *in vivo*. Наприклад, способи *in vitro* для детектування мРНК BAFF-R включають в себе Нозерн-гібридизації і гібридизації *in situ*. Способи *in vitro* для детектування білка BAFF-R включають в себе твердофазні імуноферментні аналізи (ELISA), Вестерн-блоти, імунопреципітації і імуофлуоресценцію. Способи *in vitro* для детектування геномної ДНК BAFF-R включають в себе Саузерн-гібридизації. Крім того, способи *in vivo* для детектування білка BAFF-R включають в себе введення в суб'єкта міченого анти-BAFF-R-антитіла. Наприклад, це антитіло може бути міченим радіоактивним маркером, присутність і місцеположення якого в суб'єкті можуть бути визначені стандартними способами візуалізації.

В одному варіанті біологічна проба містить білкові молекули з випробуваного суб'єкта. Альтернативно, біологічна проба може містити мРНК-молекули з випробуваного суб'єкта або молекули геномної ДНК з випробуваного суб'єкта. Переважною біологічною проброю є проба лейкоцитів периферичної крові, виділена загальноприйнятим способом з суб'єкта.

В іншому варіанті ці способи додатково включають в себе одержання контрольної біологічної проби з контрольного суб'єкта, контактування контрольної проби зі сполукою або агентом, здатним детектувати білок, мРНК або геномну ДНК BAFF-R, так що присутність білка, мРНК або геномної ДНК BAFF-R детектується в біологічній пробі, і порівняння присутності білка, мРНК або геномної ДНК BAFF-R в контрольній пробі з присутністю білка, мРНК або геномної ДНК BAFF-R в тест-пробі.

Даний винахід включає в себе також набори для детектування присутності BAFF-R в біологічній пробі. Наприклад, такий набір може містити: мічену сполуку або мічений агент, здатні детектувати білок або мРНК BAFF-R в біологічній пробі; засоби для визначення кількості BAFF-R в пробі і засоби для порівняння кількості BAFF-R в пробі зі стандартом. Сполука або агент можуть бути упаковані у відповідному контейнері. Набір може додатково містити інструкції для застосування цього набору для детектування білка або нуклеїнової кислоти BAFF-R.

#### Прогностичні аналізи

Діагностичні способи, описані тут, можливо, крім того, використані для ідентифікації суб'єктів, що мають захворювання або порушення, пов'язане з експресією або активністю BAFF-R, що відхиляється від норми, або що мають ризик розвитку такого захворювання або порушення. Наприклад, описані тут аналізи, такі як попередні діагностичні аналізи або подальші аналізи, можуть бути використані для ідентифікації суб'єкта, що має порушення, пов'язане з білком BAFF-R, експресією нуклеїнової кислоти або активністю BAFF-R, або має ризик розвитку такого порушення, наприклад, в аутоімунних станах, таких як аутоімунна гемолітична анемія і системний червоний вовчак. Альтернативно, прогностичні аналізи можуть бути використані для ідентифікації суб'єкта, що має захворювання або порушення, або має ризик розвитку захворювання або порушення. Таким чином, даний винахід забезпечує спосіб для ідентифікації захворювання або порушення, пов'язаного з експресією або активністю BAFF-R, що відхиляється від норми, в якому з суб'єкта одержують тест-пробу і детектують білок або нуклеїнову кислоту BAFF-R (наприклад, мРНК, геномну ДНК), причому присутність білка або нуклеїнової кислоти BAFF-R є діагностичною для суб'єкта, що має захворювання або порушення, або має ризик розвитку захворювання або порушення, пов'язаного з експресією або активністю BAFF-R, що відхиляється від норми. У застосуванні тут «тест-проба» означає біологічну пробу, одержану з суб'єкта, який представляє інтерес. Наприклад, тест-проба може бути біологічною рідиною (наприклад, сироваткою), клітинною проброю або проброю тканини.

Крім того, описані тут прогностичні аналізи можуть бути використані для визначення, чи може суб'єкту вводитися агент (наприклад, агоніст, антагоніст, пептидоміметик, білок, пептид, нуклеїнова кислота, невелика молекула або інше лікарський засіб-кандидат) для лікування захворювання або порушення, пов'язаного з експресією або активністю BAFF-R, що відхиляється від норми. Наприклад, такі способи можуть бути використані для визначення, чи може суб'єкт ефективно лікуватися агентом з приводу цього порушення. Таким чином, даний винахід забезпечує способи для визначення, чи може суб'єкт ефективно лікуватися агентом з приводу порушення, пов'язаного з експресією або активністю BAFF-R, що відхиляється від норми, що передбачають одержання тест-проби і детектування білка або нуклеїнової кислоти BAFF-R (наприклад, способи, в яких присутність білка або нуклеїнової кислоти BAFF-R є діагностичною для суб'єкта, якому може вводитися агент для лікування порушення, пов'язаного з експресією або активністю BAFF-R, що відхиляється від норми).

Способи даного винаходу можуть бути також використані для детектування генетичних пошкоджень в гені BAFF-R, для визначення за допомогою цього, чи має суб'єкт з пошкодженням геном ризик розвитку онкогенного або аутоімунного порушення або чи страждає він від онкогенного або аутоімунного порушення. У різних варіантах ці способи передбачають детектування в пробі клі-

тин з цього суб'єкта присутності або відсутності генетичного пошкодження, що характеризується, щонайменше, однією з ознак: зміною, що впливає на цілісність гена, що кодує білок BAFF-R, або помилковою експресією гена BAFF-R. Наприклад, такі генетичні пошкодження можуть бути детектовані встановленням існування, щонайменше, однієї з наступних ознак: (1) делеції одного або більше нуклеотидів з гена BAFF-R; (2) додавання одного або більше нуклеотидів до гена BAFF-R; (3) заміни одного або більше нуклеотидів гена BAFF-R; (4) хромосомного реаранжування гена BAFF-R; (5) зміни рівня мРНК-транскрипту гена BAFF-R; (6) модифікації гена BAFF-R, що відхиляється від норми, такої як розподіл метилювання геномної ДНК; (7) присутність характеру сплайсингу не дикого типу мРНК-транскрипта гена BAFF-R; (8) рівня не дикого типу білка BAFF-R; (9) алельної втрати гена BAFF-R і (10) неприйнятної посттрансляційної модифікації білка BAFF-R. Як описано тут, існує велике число способів аналізу, відомих в даній області, які можуть бути використані для детектування пошкоджень в гені BAFF-R. Переважною біологічною пробою є проба лейкоцитів периферичної крові, виділена загальноприйнятими засобами з суб'єкта. Однак, може бути використана будь-яка біологічна проба, що містить клітини, які мають ядра, в тому числі, наприклад, клітини внутрішньоротової слизової оболонки.

У деяких варіантах детектування такого пошкодження передбачає використання зонда/праймера в полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) [див., наприклад, патенти США №№ 4 683 195 і 4 683 202], такий як anchor PCR (якірна ПЛР) або RACE-PCR (ПЛР з швидкою ампліфікацією кінців ДНК), або, альтернативно, в лігазній ланцюговій реакції (LCR) [див., наприклад, Landegran et al. (1988) *Science* 241: 1077-1080; і Nakazawa et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 360-364], остання з яких може бути, зокрема, застосовна для детектування точкових мутацій в гені BAFF-R [див. Abravaya et al. (1995) *Nucl. Acids Res.* 23: 675-682]. Цей спосіб може включати стадії взяття проби клітин з пацієнта, виділення нуклеїнової кислоти (наприклад, геномної ДНК, мРНК або обох) з клітин цієї проби, контактування проби нуклеїнової кислоти з одним або більше праймерами, які специфічно гібридизуються з геном BAFF-R, в умовах, в яких мають місце гібридизація і ампліфікація гена BAFF-R (якщо він присутній), і детектування присутності або відсутності продукту ампліфікації або детектування розміру продукту ампліфікації і порівняння цієї довжини з контрольною пробю. Очікується, що ПЛР і/або ЛЛР може бути бажаною для застосування як попередня стадія ампліфікації разом з будь-яким зі способів, що використовуються для детектування описаних тут мутацій.

Альтернативні способи ампліфікації включають: самопідтримувану реплікацію послідовності [Guatelli et al., (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1874-1878], транскрипційну систему ампліфікації [Kwoh, et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1173-1177], Q-Beta Replicase [Lizardi et al. (1988) *Bio Technology* 6: 1197] або будь-який інший спосіб ампліфікації нуклеїнових кислот з подальшим де-

тектування ампліфікованих молекул з використанням способів, добре відомих фахівцям з кваліфікацією в даній області. Ці схеми детектування особливо застосовні для детектування молекул нуклеїнових кислот, якщо такі молекули присутні в дуже низьких кількостях.

В альтернативному варіанті мутації в гені BAFF-R з проби клітин можуть бути ідентифіковані за змінами в характері розщеплення рестрикційними ферментами. Наприклад, виділяють ДНК проби і контролю, ампліфікують (необов'язково), розщеплюють однією або декількома рестриктазами і визначають розміри довжин фрагментів гелю-електрофорезом і порівнюють. Відмінність в розмірах довжин фрагментів між ДНК проби і контролю вказує на мутації в ДНК проби. Крім того, застосування послідовності-специфічних рибозимів [див., наприклад, патент США №5 492 531] може бути використане для оцінки на присутність специфічних мутацій за появою або втратою сайту розщеплення рибозимом.

В інших варіантах генетичні мутації в BAFF-R можуть бути ідентифіковані гібридизацією нуклеїнових кислот проби і контролю, наприклад, ДНК або РНК, з матрицями (масивами) високої щільності, що містять сотні або тисячі олігонуклеотидних зондів [Cronin et al. (1996) *Human Mutation* 7: 244-255; Kozal et al. (1996) *Nature Med.* 2: 753-759]. Наприклад, генетичні мутації в BAFF-R можуть бути ідентифіковані в двомірній матрицях (масивах), що містять генеровані світлом ДНК-зонди, як описано в [Cronin et al. (1996) *Human Mutation* 7: 244-255]. Коротко, перша гібридизаційна матриця (масив) зондів може бути використана для сканування за довгими відрізками ДНК в пробі і контролі для ідентифікації змін основ між цими послідовностями за допомогою створення лінійних рядів послідовних зондів, що перекриваються. Ця стадія забезпечує можливість ідентифікації точкових мутацій. За цією стадією йде друга гібридизаційна матриця, яка дозволяє характеризувати специфічні мутації з використанням рядів менших спеціалізованих зондів, комплементарних всім детектованим варіантам і мутаціям. Кожна матриця мутацій складається з паралельних наборів зондів, один з яких комплементарний гену дикого типу, а інший комплементарний мутантному гену.

Ще в одному варіанті будь-яка з різноманітних реакцій секвенування, відомих в даній області, може бути використана для прямого секвенування гена BAFF-R і детектування мутацій порівнянням послідовності BAFF-R проби з відповідною контрольною послідовністю (послідовністю дикого типу). Приклади реакцій секвенування включають в себе реакції, основані на способах, розроблених [Maxim and Gilbert (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 560 або Sanger (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463]. Також очікується, що будь-яка з різноманітних процедур автоматичного секвенування може бути використана при виконанні цих діагностичних аналізів [Naeye et al. (1995) *Biotechniques* 19: 448], в тому числі секвенування з використанням мас-спектрометрії [див., наприклад, Міжнародну публікацію PCT №WO: 94/16101; (Cohen et al. (1996) *Adv. Chromatogr.* 36: 127-162; і

Griffin et al. (1993) Appl. Biochem. Biotechnol 38: 147-159].

Інші способи детектування мутацій в гені BAFF-R включають в себе способи, в яких використовують захист від агентів розщеплення для детектування помилково спарених основ у гетеродуплексах РНК/РНК або РНК/ДНК [Myers et al. (1985) Science 230: 1242]. Звичайно відомий в даній області спосіб розщеплення помилкового спарування починається забезпеченням гетеродуплексів утвореної гібридизацією (міченої) РНК або ДНК, що містить послідовність BAFF-R дикого типу, з потенційною мутантною РНК або ДНК, одержаною з проби тканини. Ці дволанцюгові дуплекси обробляють агентом, який розщеплює одноланцюгові райони цього дуплекса, такі, які будуть існувати внаслідок помилкових спарувань основ між контрольним ланцюгом і ланцюгом проби. Наприклад, дуплекси РНК/ДНК можуть бути оброблені РНКазою, а гібриди ДНК/ДНК можуть бути оброблені нуклеазою S1 для ферментативного розщеплення помилково спарених основ. В інших варіантах або дуплекси ДНК/ДНК, або дуплекси РНК/ДНК можуть бути оброблені гідроксиламіном або тетроксидом осмію і піперидином для розщеплення помилково спарених районів. Після розщеплення помилково спарених районів одержаний матеріал потім розділяють за розміром на поліакриламідних гелях в денатуруючих умовах для визначення сайту мутації. [Див., наприклад, Cotton et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4397; Saleeba et al. (1992) Methods Enzymol. 217: 286-295]. В одному варіанті контрольна ДНК або РНК може бути помічена для детектування.

Ще в одному варіанті реакція розщеплення помилкового спарування використовує один або декілька білків, які впізнають помилково спарені пари основ в дволанцюговій ДНК (так звані ферменти «репарації помилково спареної ДНК»), в певних системах для детектування і картування точкових мутацій в кДНК BAFF-R, одержаної з проб клітин. Наприклад, фермент mutY E. coli відщеплює А в помилкових спаруваннях G/A, а тимідин-ДНК-глікозилаза з клітин HeLa відщеплює Т в помилкових спаруваннях G/T [Hsu et al. (1994) Carcinogenesis 15: 1657-1662]. Згідно з тим, що приводиться як приклад варіанту, зонд на основі послідовності BAFF-R, наприклад, послідовності BAFF-R дикого типу, гібридизують з кДНК або іншим ДНК-продуктом з тест-клітини (тест-клітин). Цей дуплекс обробляють ферментом репарації помилкового спарування ДНК і продукти розщеплення, якщо вони є, можуть бути детектовані з протоколів електрофорезу або т.п. [див., наприклад, патент США №5 459 039].

В інших варіантах зміни в електрофоретичній рухливості можуть бути використані для ідентифікації мутацій в генах BAFF-R. Наприклад, поліморфізм конформації одного ланцюга (SSCP) може бути використаний для детектування відмінностей електрофоретичної рухливості між нуклеїновими кислотами мутанта і дикого типу [Orita et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2766, див. також Cotton (1993) Mutat. Res. 285:

125-144; Hayashi (1992) Genet. Anal. Tech. Appl. 9: 73-79].

Одноланцюгові ДНК-фрагменти нуклеїнових кислот BAFF-R проби і контролю денатурують і дають їм ренатуруватись. Вторинна структура одноланцюгових нуклеїнових кислот варіюється відповідно до послідовності, одержана зміна електрофоретичної рухливості дозволяє детектувати навіть заміну єдиної основи. Ці ДНК-фрагменти можуть бути міченими або можуть детектуватись міченими зондами. Чутливість цього тесту може бути посилена використанням РНК (переважніше, ніж ДНК), в якій вторинна структура є більш чутливою до зміни в послідовності. У одному варіанті спосіб, що розглядається, використовує аналіз гетеродуплекса для розділення дволанцюгових молекул гетеродуплекса на основі змін в електрофоретичній рухливості [Keen et al. (1991) Trends Genet. 7: 5].

Ще в одному варіанті рух мутантних фрагментів або фрагментів дикого типу в поліакриламідних гелях, що містять градієнт денатуруючого агента, аналізують з використанням денатуруючого градієнтного гель-електрофорезу (DGGE) (Myers et al. (1985) Nature 313:495). При використанні DGGE як способу аналізу ДНК може бути модифікована для гарантії, що вона не буде повністю денатуруватись, наприклад, додаванням GC-клемпа (фіксатора) з приблизно 40п.н. плавкої при високій температурі GC-багатої ДНК за допомогою ПЛР. У додатковому варіанті використовують температурний градієнт замість денатуруючого градієнта для ідентифікації відмінностей в рухливості ДНК контролю і проби [Rosenbaum and Reissner (1987) Biophys. Chem. 265: 12753].

Приклади інших способів для детектування точкових мутацій включають в себе, але не обмежуються ними, селективну гібридизацію олігонуклеотидів, селективну ампліфікацію або селективне подовження праймерів. Наприклад, можуть бути одержані олігонуклеотидні праймери, в яких центрально вміщена відома мутація, і потім їх гібридизують з ДНК-мішенню в умовах, що допускають гібридизацію тільки у разі знаходження точною збіру [Saiki et al. (1986) Nature 324: 163; Saiki et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6230]. Такі алель-специфічні олігонуклеотиди гібридизуються з ПЛР-ампліфікованою ДНК-мішенню або рядом різних мутацій, коли ці олігонуклеотиди приєднують до мембрани для гібридизації і гібридизують з міченою ДНК-мішенню.

Альтернативно, техніка алель-специфічної ампліфікації, яка залежить від селективної ПЛР-ампліфікації, може бути використана разом з даним винаходом. Олігонуклеотиди, що використовуються як праймери для специфічної ампліфікації, можуть нести мутацію, яка представляє інтерес, в центрі молекули (так що ампліфікація залежить від диференціальної гібридизації) [Gibbs et al. (1989) Nucl. Acids Res. 17: 2437-2448] або на краю 3'-сторони одного праймера, де, у відповідних умовах, помилкове спарування може запобігати або зменшувати подовження полімеразою [Prossner (1993) Tibtech 11: (238)]. Крім того, може бути бажаним введення нового сайту рестрикції в

район мутації для одержання детектування на основі розщеплення [Gasparini et al. (1992) *Mol. Cell. Probes* 6: 1]. Передбачається, що в певних варіантах ампліфікація може також виконуватися з використанням лігази Taq для ампліфікації [Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 189]. У таких випадках лігування буде відбуватися тільки в тому випадку, якщо є точний збіг на 3'-кінці 5'-послідовності, що дозволяє детектувати присутність відомої мутації в специфічному сайті за спостереженням присутності або відсутності ампліфікації.

Описані тут способи можуть виконуватися, наприклад, з використанням заздалегідь упакованих діагностичних наборів, що містять, щонайменше, одну нуклеїнову кислоту зонда або реагент-антитіло, описані тут, які можуть бути зручним чином використані, наприклад, в клінічній обстановці для діагностики пацієнтів, що мають симптоми або сімейну історію захворювання або хвороби, пов'язаних з геном BAFF-R.

Крім того, будь-які клітини або тканина, в якій експресується BAFF-R, може бути використана в описаних тут прогностичних аналізах. Однак може бути використана будь-яка біологічна проба, що містить клітини, які мають ядра, в тому числі, наприклад, клітини слизової оболонки внутрішньоротової області.

#### Фармакогеноміка

Агенти або модулятори, які володіють стимуляторною або інгібіторною дією на активність BAFF-R (наприклад, експресію гена BAFF-R), наприклад, ідентифіковані скринінг-аналізом, описаним тут, можуть бути введені індивідуумам для лікування (профілактичного або терапевтичного) порушень (наприклад, пов'язаних з раком, або аутоімунних порушень). Разом з таким лікуванням може передбачатися фармакогеноміка (тобто дослідження взаємозв'язку між генотипом індивідуума і реакцією у відповідь цього індивідуума на чужорідну сполуку або лікарський засіб). Відмінності в метаболізмі терапевтичних засобів можуть приводити до важкої токсичності або відсутності терапевтичного успіху внаслідок зміни відношень між дозою і концентрацією в крові фармакологічно активного лікарського засобу, що розглядається. Таким чином, фармакогеноміка індивідуума забезпечує можливість вибору ефективних агентів (наприклад, лікарських засобів) для профілактичного або терапевтичного лікування, ґрунтованого на врахуванні генотипу індивідуума. Така фармакогеноміка може бути додатково використана для визначення відповідних доз і програм лікування. Таким чином, активність білка BAFF-R, експресія нуклеїнової кислоти BAFF-R або зміст мутацій генів BAFF-R в індивідуумові можуть визначатися для вибору внаслідок цього відповідного агента (відповідних агентів) для терапевтичного або профілактичного лікування індивідуума.

Фармакогеноміка має справу з клінічно значущими спадковими варіаціями в реакції у відповідь на лікарські засоби внаслідок зміненого розподілу лікарського засобу і атипової дії в уражених пацієнтах. [Див., наприклад, Eichelbaum (1996) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 23: 983-985 і binder (1997) *Clin.*

*Chem.* 43: 254-266]. Загалом, можуть бути диференційовані два типи фармакогенетичних станів. Генетичні стани, що передаються у вигляді єдиного фактора, що змінює шлях, за яким лікарські засоби діють на організм (змінена дія лікарських засобів), або генетичні стани, що передається у вигляді єдиних факторів, що змінюють шлях, за яким організм діє на лікарські засоби (змінений метаболізм лікарських засобів). Ці фармакогенетичні стани можуть зустрічатися або у вигляді рідких дефектів, або у вигляді поліморфізму. Наприклад, недостатність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (G6PD) є звичайною спадковою ензимопатією, в якій основним клінічним ускладненням є гемоліз після прийому окислювальних лікарських засобів (протималярійних засобів, сульфонамідів, анальгетичних засобів, нітрофуранів) і вживання кінських бобів.

Як ілюстративний варіант, активність ферментів, які метаболізують лікарський засіб, є головним визначальним фактором як інтенсивності, так і тривалості дії лікарського засобу. Виявлення генетичного поліморфізму метаболізуючих лікарських засобів ферментів (наприклад, N-ацетилтрансферази 2 (NAT 2) і ферментів цитохрому P450 CYP2D6 і CYP2C19) забезпечило пояснення, чому деякі пацієнти не одержують очікуваних ефектів лікарського засобу або виявляють понадміру збільшену реакцію на лікарський засіб і серйозну токсичність після прийому стандартної і безпечної дози лікарського засобу. Ці поліморфізми експресуються у вигляді двох фенотипів в популяції, суб'єкти з інтенсивно метаболізуючим (ЕМ) фенотипом і суб'єкти зі слабо метаболізуючим (РМ) фенотипом. Переважання РМ є різним серед різних популяцій. Наприклад, ген, що кодує CYP2D6, є високополіморфним, і декілька мутацій були виявлені в РМ, які, всі, приводили до відсутності функціонального CYP2D6. Пацієнти зі слабо метаболізуючим CYP2D6 і CYP2D19 фенотипом дуже часто відчувають понадміру збільшену реакцію на лікарський засіб і мають побічні реакції при прийомі стандартних доз. Якщо метаболіт є активною терапевтичною частиною молекули, пацієнт з РМ не проявляє терапевтичної реакції, як показано для аналітичного ефекту кодеїну, опосередкованого його морфіном, що утворюється CYP2D6 метаболітом. Іншою крайністю є пацієнти з так званим ультрашвидким метаболізуючим фенотипом, які не відповідали на стандартні дози. Нещодавно було показано, що молекулярною основою ультрашвидкого метаболізму є ампліфікація гена CYP2D6.

Таким чином, активність білка BAFF-R, експресія нуклеїнової кислоти BAFF-R або зміст мутацій генів BAFF-R в індивідуумові можуть бути визначені для вибору на основі цього відповідного агента (відповідних агентів) для терапевтичного або профілактичного лікування цього індивідуума. Крім того, фармакогенетичні дослідження можуть бути використані для застосування генотипування поліморфних алелей, що кодують метаболізуючі лікарські засоби ферменти, для ідентифікації фенотипу відповіді індивідуума на лікарські засоби. Ці знання, при застосуванні до визначення доз або

вибору лікарського засобу, можуть допомогти уникнути несприятливих реакцій або терапевтичної невдачі і, отже, посилити терапевтичну або профілактичну ефективність при лікуванні суб'єкта модулятором BAFF-R, таким як модулятор, ідентифікований одним з описаних тут скринінг-аналізів, що приводяться як приклади.

#### Моніторинг клінічної ефективності

Моніторинг впливу агентів (наприклад, лікарських засобів, сполук) на експресію або активність BAFF-R (наприклад, здатність модулювати проліферацію і/або диференціювання клітин, що відхиляється від норми) може застосовуватися не тільки в основному скринінгу лікарських засобів, але також в клінічних випробуваннях. Наприклад, ефективність агента, визначена скринінг-аналізом, як описано тут, відносно збільшення експресії гена BAFF-R, рівнів білка або підвищення активності BAFF-R, може бути піддана моніторингу в клінічних випробуваннях суб'єктів, що виявляють знижену експресію гена BAFF-R, знижені рівні білка або знижену активність BAFF-R. Альтернативно, ефективність агента, що визначається скринінг-аналізом, відносно зменшення експресії гена BAFF-R, рівнів білка або зниження активності BAFF-R, може бути піддана моніторингу в клінічних випробуваннях суб'єктів, що проявляють збільшену експресію гена BAFF-R, збільшені рівні білка або підвищену активність BAFF-R. У таких клінічних випробуваннях експресія або активність BAFF-R і переважно інших генів, які приблизно беруть участь, наприклад, в порушенні, може бути використана як «показники» або маркери імунологічної відповіді конкретної клітини.

Наприклад, можуть бути ідентифіковані гени, в тому числі гени BAFF-R, які модулюються в клітинах внаслідок обробки агентом (наприклад, сполукою, лікарським засобом або невеликою молекулою), що модулює активність BAFF-R (наприклад, ідентифікованим в скринінг-аналізі, як описано тут). Таким чином, для дослідження дії агентів на порушення проліферації клітин, наприклад, в клінічному випробуванні, клітини можуть бути виділені, з них можуть одержані РНК і проаналізовані на рівні експресії BAFF-R і інших генів, що беруть участь в даному порушенні. Рівні експресії генів (тобто характер експресії генів) можуть бути визначені кількісно Нозерн-блот-аналізом або ОТ-ПЛР, як описано тут, або альтернативно вимірюванням кількості продукованого білка, одним з описаних тут способів, або вимірюванням рівнів активності BAFF-R або інших генів. Таким чином, характер експресії генів може служити як маркер, який вказує на фізіологічну реакцію у відповідь цих клітин на даний агент. Таким чином, цей стан реакції може бути визначений до лікування індивідуума і в різних точках схеми лікування індивідуума даним агентом. В одному варіанті даний винахід забезпечує спосіб моніторингу ефективності лікування суб'єкта агентом (наприклад, агоністом, антагоністом, білком, пептидом, пептидоміметиком, нуклеїновою кислотою, невеликою молекулою або іншим кандидатним лікарським засобом, ідентифікованим описаними тут скринінг-аналізами), що передбачає стадії (i) одержання проби до введен-

ня з суб'єкта перед введенням даного агента; (ii) детектування рівня експресії білка, мРНК або геномної ДНК BAFF-R в пробі до введення; (iii) одержання однієї або декількох проб після введення з цього суб'єкта; (iv) детектування рівня експресії або активності білка, мРНК або геномної ДНК BAFF-R в пробах після введення; (v) порівняння рівня експресії або активності білка, мРНК або геномної ДНК BAFF-R в пробі до введення з рівнем експресії або активності білка, мРНК або геномної ДНК BAFF-R в пробі або пробах після введення; і (vi) відповідна зміна введення даного агента суб'єкту. Наприклад, збільшене введення цього агента може бути бажаним для збільшення експресії або активності BAFF-R до більш високих рівнів, ніж детектовані рівні, тобто для збільшення ефективності агента. Альтернативно, зменшене введення агента може бути бажаним для зменшення експресії або активності BAFF-R до більш низьких рівнів, ніж детектовані, тобто для зменшення ефективності агента.

#### Способи лікування

Даний винахід забезпечує як профілактичні, так і терапевтичні способи лікування суб'єкта, що має ризик придбання порушення (або сприйнятливо до порушення) або що має порушення, пов'язане з експресією або активністю BAFF-R, що відхиляється від норми.

Захворювання і порушення, які характеризуються збільшеними рівнями (відносно суб'єкта, не страждаючого від цього захворювання або порушення) або збільшеною біологічною активністю BAFF-R, можуть лікуватися терапевтичними засобами, які протидіють (є антагоністами BAFF-R) цій активності (тобто зменшують або інгібують її). Терапевтичні засоби, які протидіють активності, можуть вводитися терапевтичним або профілактичним чином. Терапевтичні засоби, які можуть бути використані, включають в себе, але не обмежуються ними, (i) поліпептид BAFF-R або його аналог, похідні, фрагменти або гомологи; (ii) антитіла до пептиду BAFF-R; (iii) нуклеїнові кислоти, що кодують пептид BAFF-R; (iv) введення антисмислової нуклеїнової кислоти і нуклеїнових кислот, які є «дисфункціональними» (тобто внаслідок гетерологічного інсертування в кодуючих послідовностях кодуючих послідовностей пептиду BAFF-R), використовуються для «нокауту» ендогенної функції пептиду BAFF-R гомологічною рекомбінацією [див., наприклад, (Carpeschi (1989) Science 244: 1288-1292); або (v) модулятори (тобто інгібітори, агоністи і антагоністи, в тому числі додаткові пептидні міметики даного винаходу або антитіла, специфічні відносно пептиду даного винаходу), які змінюють взаємодію між пептидом BAFF-R і його партнером по скріпленню.

Захворювання і порушення, які характеризуються зменшеними рівнями (відносно суб'єкта, який не страждає від цього захворювання або порушення) або зменшеною біологічною активністю BAFF-R, можуть лікуватися терапевтичними засобами, які збільшують (тобто є агоністами BAFF-R) цю активність. Терапевтичні засоби, які підвищують активність, можуть вводитися терапевтичним або профілактичним чином. Терапевтичні засоби,

які можуть бути використані, включають в себе, але не обмежуються ними, пептид BAFF-R або його аналоги, похідні, фрагменти або гомологи; або агоніст, який збільшує біодоступність.

Збільшені або зменшені рівні можуть легко детектуватись кількісним визначенням пептиду і/або РНК, одержанням проби тканини пацієнта (наприклад, з тканини біопсії) і аналізом її *in vitro* на рівні РНК або пептиду, структуру і/або активність експресованих пептидів (або мРНК пептиду BAFF-R). Способи, які добре відомі в даній області, включають в себе, але не обмежуються ними, імуноаналізи (наприклад, Вестерн-блот-аналіз, імуопреципітацію з подальшим електрофорезом в додецилсульфат натрію (ДСН)-поліакриламідному гелі, імуоцитохімію і т.д.) і/або аналізи гібридизації для детектування експресії мРНК (наприклад, Нозерн-аналізи, дот-блоти, гібридизацію *in situ* і т.д.).

В одному аспекті даний винахід забезпечує спосіб попередження у суб'єкта захворювання або стану, пов'язаного з експресією або активністю BAFF-R, що відхиляється від норми, введенням цьому суб'єкту агента, який модулює експресію BAFF-R або, щонайменше, одну активність BAFF-R. Суб'єкти, що мають ризик придбання захворювання, яке зумовлене або якому сприяє експресія або активність BAFF-R, що відхиляється від норми, можуть бути ідентифіковані, наприклад, діагностичними або прогностичними аналізами або їх комбінацією, як описано тут. Введення профілактичного агента може проводитись до маніфестації симптомів, характерних для відхилення від норми BAFF-R, так що відбувається попередження захворювання або порушення, або альтернативно затримка його прогресування. В залежності від типу відхилення від норми BAFF-R для лікування суб'єкта може бути використаний, наприклад, агоніст BAFF-R або антагоніст BAFF-R. Відповідний агент може бути визначений на основі скринінг-аналізів, описаних тут.

Інший аспект даного винаходу відноситься до способів модуляції експресії або активності BAFF-R для терапевтичних цілей. Модуляторний спосіб даного винаходу передбачає контактування клітини з агентом, який модулює одну або декілька активностей білка BAFF-R, пов'язаного з клітиною. Агент, який модулює активність білка BAFF-R, може бути описаним тут агентом, таким як нуклеїнова кислота або білок, споріднений ліганд білка BAFF-R, що природно зустрічається, пептид, пептидоміметик BAFF-R або інша невелика молекула. В одному варіанті, цей агент стимулює одну або більше активностей білка BAFF-R. Приклади таких стимуляторних агентів включають в себе активний білок BAFF-R і молекулу нуклеїнової кислоти, кодуєчої BAFF-R, які були введені в клітину. В іншому варіанті цей агент інгібує одну або більше активностей білка BAFF-R. Приклади таких інгібіторних агентів включають в себе антисмислові молекули нуклеїнових кислот BAFF-R і анти-BAFF-R-антитіла. Ці модуляторні способи можуть виконуватися *in vitro* (наприклад, культивуванням клітини з агентом) або, альтернативно, *in vivo* (наприклад, введенням агента суб'єкту). Як такий, даний вина-

хід забезпечує способи лікування індивідуума, ураженого захворюванням або порушенням, що характеризується експресією або активністю білка BAFF-R або молекули нуклеїнової кислоти, що відхиляється від норми. В одному варіанті цей спосіб передбачає введення агента (наприклад, агента, ідентифікованого в описаному тут скринінг-аналізі) або комбінації агентів, яка модулює (наприклад, підвищує або знижує) експресію або активність BAFF-R. В іншому варіанті цей спосіб передбачає введення білка BAFF-R або молекули нуклеїнової кислоти BAFF-R як терапії для компенсації зменшеної або експресії або активності BAFF-R, що відхиляється від норми.

В одному варіанті даний винахід забезпечує способи застосування BAFF-R. Такі способи включають в себе способи інгібування зростання В-клітин, індукованого дендритними клітинами зростання В-клітин і дозрівання або продукування імуноглобуліну у тварини з використанням поліпептиду BAFF-R, що містить, щонайменше, BAFF-зв'язувальну частину BAFF-R. Інші варіанти включають в себе способи стимуляції зростання В-клітин, індукованого дендритними клітинами зростання В-клітин і дозрівання або продукування імуноглобуліну у тварини з використанням поліпептиду BAFF-R (наприклад, трансфекцією клітин, які є недостатніми за BAFF-R, векторами для забезпечення ефективної експресії BAFF-R, або введенням антитіл, які зв'язують BAFF-R або імітують BAFF).

В іншому варіанті даний винахід забезпечує способи застосування BAFF-R для лікування аутоімунних захворювань, гіпертензії, серцево-судинних порушень, ниркоподібних порушень, лімфо-проліферативних порушень В-клітин, імуносупресивних захворювань, трансплантації органів і ВІЛ. Включені також способи застосування агентів для лікування, супресії або зміни імунної відповіді, в якій бере участь шлях передачі сигналу між BAFF-R і його лігандом, і способи інгібування запалення введенням антитіла, специфічного для BAFF-R або його епітопу.

Способи даного винаходу переважно проводять введенням терапевтично ефективної кількості поліпептиду BAFF-R, химерної молекули, що включає поліпептид BAFF-R, злитий з гетерологічною амінокислотою послідовністю, або гомолога анти-BAFF-R-антитіла.

В одному варіанті даний винахід забезпечує фармацевтичні композиції, що містять поліпептид BAFF-R і фармацевтично прийнятний носій.

В іншому варіанті даний винахід забезпечує химерні молекули, що включають поліпептид BAFF-R, злитий з гетерологічним поліпептидом або гетерологічною амінокислотою послідовністю. Приклад такої химерної молекули включає BAFF-R, злитий з Fc-районом імуноглобуліну або послідовністю епітопної мітки.

В іншому варіанті даний винахід забезпечує антитіло, яке специфічно зв'язується з поліпептидом BAFF-R. Це антитіло, необов'язково, є моноклональним антитілом.

В одному варіанті даного винаходу забезпечений спосіб лікування ссавця з приводу стану, по-



в'язаного з небажаною проліферацією клітин, введенням цьому ссавцеві терапевтично ефективної кількості композиції, що містить антагоніст BAFF-R, причому цей антагоніст BAFF-R включає поліпептид, який протидіє взаємодії між BAFF і його спорідненим рецептором або рецепторами, з фармацевтично прийнятним наповнювачем.

У переважному варіанті спорідненим рецептором BAFF на поверхні клітини є BAFF-R.

Цей спосіб може бути використаний з будь-яким антагоністом BAFF-R, який має поліпептид, протидіючий взаємодії між BAFF і його спорідненим рецептором або рецепторами. Приклади антагоністів BAFF-R включають в себе, але не обмежуються ними, розчинний поліпептид BAFF-R, розчинні химерні молекули BAFF-R, в тому числі, але не тільки, BAFF-R-IgG-Fc і гомологи анти-BAFF-R-антитіла.

Спосіб даного винаходу може бути використаний з будь-яким станом, пов'язаним з небажаною проліферацією клітин. Зокрема, способи даного винаходу можуть бути використані для обробки пухлинних клітин, які експресують BAFF і/або BAFF-R.

Приклади раків, клітинна проліферація яких модулюється BAFF, можуть бути піддані скринінгу вимірюванням *in vitro* рівня BAFF і/або транскрипту BAFF-R, експресованого в бібліотеках пухлинних тканин. Бібліотеки пухлинних тканин, в яких BAFF і/або транскрипт BAFF-R є високо експресованими, могли б бути кандидатами. Альтернативно, можна провести скринінг на кандидатів пошуком в публічних і приватних базах даних (тобто базі даних Incyte), наприклад, з використанням повнорозмірної кДНК-послідовності BAFF людини.

Антагоністи BAFF-R даного винаходу, які використовують для лікування станів, пов'язаних з небажаною проліферацією клітин, зокрема, в пухлинній терапії, переважно інгібують зростання пухлинних клітин більше ніж на 10%, 20%, 30% або 40% і більш переважно більше ніж на 50%. Антагоністи BAFF-R одержують за допомогою скринінгу. Наприклад, антагоністи BAFF-R можуть бути вибрані на основі інгібуючої зростання активності (тобто інгібувannya більше ніж на 10%, 20%, 30%, 40% або 50%) проти клітин карциноми ободової кишки людини HT29 або клітин карциноми легені людини A549, які одержують з пухлини ободової кишки і легкого, відповідно.

Інший варіант даного винаходу забезпечує способи інгібувannya зростання В-клітин і не-В-клітин, індукованого дендритними клітинами зростання В-клітин і дозрівання або продукування імунoglobіну у тварини з використанням поліпептидів BAFF-R, таких як описані вище.

Спосіб інгібувannya зростання В-клітин і не-В-клітин, індукований дендритними клітинами зростання В-клітин і дозрівання або продукування імунoglobіну, може також включати в себе введення анти-BAFF-R-антитіла (поліклонального або моноклонального), яке зв'язується з BAFF-R і інгібує скріплення BAFF з BAFF-R. Введення антитіла за допомогою цього способу інгібує зростання В-клітин і не-В-клітин, індукований дендритними клітинами зростання В-клітин і дозрівання або проду-

кування імунoglobіну. Кількість антитіла, яка може бути відповідною для використання, може екстраполюватися із забезпечених тут даних *in vivo*. Різні способи відомі в даній області для екстраполяції доз з експериментів на тваринах, в тому числі, екстраполяція на основі ваги або площі поверхні тіла.

У деяких варіантах даного винаходу поліпептиди BAFF-R:Fc або анти-BAFF-R-антитіла вводять в кількості приблизно 1-20 мг/кг на дозу. Дози можуть надаватися два рази на тиждень, один раз на тиждень, один раз кожні два тижні або один раз на місяць, за потреби. Лікар зможе визначити правильну дозу визначенням ефективності, збалансованої проти зменшення будь-яких несприятливих ефектів цієї терапії.

В іншому варіанті даний винахід забезпечує способи використання BAFF-R або анти-BAFF-R-антитіла для лікування аутоімунних захворювань, гіпертензії, серцево-судинних порушень, нирково-дібних порушень, В-клітинних лімфо-проліферативних порушень, імуносупресивних захворювань, трансплантації органів, запалення і ВІЛ. Також включені методи використання агентів для лікування, супресії або зміни імунної відповіді, що включає в себе шлях передачі сигналу між BAFF-R і його лігандом.

Способи інгібувannya агрегації експресованого білка, в тому числі BAFF-R і BAFF-R:Fc

Даний винахід забезпечує також спосіб інгібувannya або зменшення агрегації експресованого білка, зокрема, BAFF-R людини або huBAFF-R:Fc, який має тенденцію до агрегації під час експресії, заважаючи очищенню при високих виходах. У способі даного винаходу амінокислотну послідовність білка, який має тенденцію до агрегації при експресії в рекомбінантній системі, порівнюють з амінокислотою послідовністю гомолога цього білка, який виявляє меншу активність агрегації. Ці два гомологи будуть мати консервативні домени і неконсервативні амінокислоти між ними і, можливо, розкидані в них. Звичайно, щонайменше, одна з неконсервативних амінокислот білка, який агрегувався, може бути замінена амінокислотою, що знаходиться в гомологу, для ослаблення агрегації. У деяких варіантах замінюються неполярні амінокислоти. Неполярні амінокислоти включають в себе гліцин, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, пролін, фенілаланін, метіонін, триптофан і цистеїн. У деяких варіантах неполярними амінокислотами замінюють інші неполярні амінокислоти. Переважними неполярними амінокислотами для інгібувannya або зменшення агрегації є пролін і аланін. В інших варіантах незарядженою полярною амінокислотою замінюють неполярну амінокислоту. Незаряджені полярні амінокислоти включають в себе аспарагін, глутамін, серин, треонін і тирозин.

У способі даного винаходу виробляють заміни, які переважно дозволяють білку зберігати біологічну активність. Звичайно неконсервативні амінокислоти придатні для заміни без відчутного впливу на біологічну активність.

У конкретному прикладі способу даного винаходу білок BAFF-R людини може мати амінокислотні заміни, введені в положеннях V20, P21, A22 і

L27 SEQ ID NO:5 (або V41, P42, A43 і L48 SEQ ID NO:12), і різні їх комбінації, які значною мірою ослаблюють агрегацію цього білка. Схожі стратегії можуть бути використані для інших білків, які схильні агрегуватись (при експресії в рекомбінантних системах. Не бажаючи бути пов'язаними з якою-небудь конкретною теорією дії, автори винаходу вважають, що заміну незарядженими полярними амінокислотами неполярних амінокислот додає розчинність білку і елімінує агрегацію неполярних районів між білками.

Даний винахід не обмежується в його об'ємі конкретними варіантами, описаними тут. Дійсно, різні модифікації даного винаходу, крім модифікацій, описаних тут, будуть очевидними фахівцям з кваліфікацією в даній області з попереднього опису і супутніх малюнків. Передбачається, що такі модифікації входять в об'єм прикладеної формули винаходу.

#### Приклади

##### Приклад 1

Цей приклад описує молекулярне клонування BAFF-R, нового рецептора BAFF.

#### Матеріали і способи

Оліго-dT-праймовану бібліотеку кДНК готували з клітин BJAB, лінії В-клітин людини, яка зв'язує BAFF людини, і направлено клонували в експресуючий вектор CH269. CH269 є похідним рСЕР4 (Invitrogen), яке містить промотор CMV для регулювання експресії клонованої ДНК, а також містить оріР EBV (вірусу Епштейна-Барра). Це забезпечує мультікопійну автономну реплікацію цих плазмід в клітинах, які стабільно трансформовані EBNA-1, таких як 293EBNA. Бібліотеку кДНК клітин BJAB трансфікували в клітини E. coli DH10B і висівали в 96-ямковий планшет у вигляді пулів приблизно 2500 незалежних клонів на ямку. ДНК одержували з цих пулів з використанням Qiagen BioRobot 9600. Пули ДНК трансфікували з використанням Ліпофектаміну (Life Technologies) в клітини 293EBNA, висіяні в покриті фібронектином 6-ямкові планшети. Через 48 годин після трансфекції середовище видаляли і клітини промивали промивним буфером для аналізу планшетів (20мМ HEPES, 0,5мг/мл бичачого сироваткового альбуміну, 0,1% NaN<sub>3</sub>). На моношари клітин нашаровували 100мг/мл біотинільованого рекомбінантного розчинної мус-BAFF людини (мус-huBAFF) в буфері для скріплення (ФСБ, 2% фетальна бичача сироватка, 0,1% NaN<sub>2</sub>) і інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години. мус-huBAFF (амінокислоти 136-285), використаний в цьому аналізі, експресували в *Pichia pastoris* і очищали аніонообмінною хроматографією з подальшою гелефільтрацією.

Розчин BAFF видаляли і клітини промивали і фіксували інкубуванням з сумішшю 1,8% формальдегід-0,2% глутаральдегід в ФСБ протягом 5 хвилин. Клітини знову промивали і потім інкубували протягом 30 хвилин зі стрептавідином, кон'югованим з лужною фосфатазою (SAV-AP) (Jackson ImmunoResearch) при розведенні 1:3000 з вихідного розчину в буфері для скріплення. Клітини промивали і забарвлювали сумішшю швидкий червоний/нафтолфосфатний барвник (Pierce). Клітини,

що зв'язуються з комплексом біотин-BAFF/SAV-AP, ідентифікували за присутністю червоного осаду, після обстеження під мікроскопом при низькій потужності. Вторинний скринінг спричинив виділення вихідних гліцеринових суспензій E. coli DH10B зв'язувальних BAFF пулів для окремих колоній, інокулювання в культуру у вигляді пулів з 100 і повторення аналізу скріплення BAFF, як описано вище. Позитивні пули вторинного скринінгу так само розбивали на індивідуальні клони і аналізували на скріплення BAFF після трансфекції в клітини 293EBNA, як описано вище. Визначали ДНК-послідовність незалежних зв'язувальних BAFF клонів.

#### Результати

Одним з BAFF-зв'язувальних клонів був рJST576. Він має розмір інсерту 1201п.н., без включення полі-А-хвоста. Послідовність інсерту рJST576 показана на Фіг.1А (SEQ ID NO:1). BLAST-аналіз цього клону показав гомологію в базі даних GenBank з клоном хромосоми 22 BAC HS250D10 (номер доступу Z99716). Повна послідовність рJST576 виявлена в цьому BAC. Була також знайдена гомологія з 3'-кінцем EST людини, A1250289 (клон IMAGE 2000271). Цю EST генерували з бібліотеки фолікулярної лімфоми людини. EST A1250289 одержували з Incyte і визначали послідовність цього інсерту (Фіг.1В) (SEQ ID NO:2). Ця послідовність додавала 15п.н. 5'-послідовності до послідовності рJST576, яка були суміжною з геномною послідовністю, і послідовність 23п.н., яка не була суміжною. Інша EST-послідовність мала чудову гомологію з рJST576. Відкрита рамка зчитування не була ідентифікована в цих клонах.

#### Приклад 2

У цьому прикладі автори визначають, що кДНК рJST576 містить інтрон і потім встановлюють відкриту рамку зчитування.

#### Способи

Програму прогнозування екзону GENSCAN [Burge, C. & Karlin, S.J. (1997) Mol. Biol. 268: 78-94] використали для послідовності кДНК JST576. Результати цієї програми прогнозували, що в цій кДНК присутній інтрон. Для визначення, чи був цей прогноз правильним, виконували ПЛР-аналіз на першому ланцюгу кДНК з 2 клітинних ліній, які експресують JST576. РНК очищали з приблизно 10<sup>7</sup> клітин BJAB або клітин IM-9 з використанням набору RNeasy (Qiagen) згідно з протоколом, що пропонується виробниками. РНК визначали кількісно і 5мкг використали для реакцій першого ланцюга кДНК з використанням набору для попередньої ампліфікації Superscript (Life Technologies). Як оліго-dT, так і випадкові гексамери використали для генерування продукту першого ланцюга. Синтез першого ланцюга виконували згідно з протоколом, що рекомендується. Потім три варіанти (по одному з кожної реакції) по 10 нг JST576 або без ДНК використали як матриці для ПЛР з використанням олігонуклеотидів, які фланкують передбачений інтрон. Олігонуклеотидами, використаними в цій реакції, є 5'-оліго BAF-225 [5'-GGCCGAGTGCTTCGACCTGCT-3'] (SEQ ID NO:33) або BAF-226 [5'-GGTCCGCCACTGCGTGGCCCTG-3'] (SEQ ID NO:34) і 3'-оліго BAF-191 [5'-

CAACAAGACGGCCGGCCCTGA-3'] (SEQ ID NO:35). Кожна реакція містила 1xPfb-буфер (Stratagene), 200мкМ dNTP, 10% ДМСО, 150нг кожного оліго і 1,25 одиниць полімерази Turbo Pfu (Stratagene). Реакції проводили протягом 35 циклів при 94°C протягом 30сек., 60°C протягом 1хв. і 72°C протягом 1,5хв. Десятьмкл кожної реакції піддавали електрофорезу в 1% агарозному гелі. Інші продукти з реакцій BAF-225/191 BJBAB і IM-9 очищали з використанням набору для очищення ПЛР-продукту до високої чистоти (Roche Molecular Biochemicals) і масу продукту піддавали ДНК-секвенуванню. Крім того, ПЛР-продукти, що використали праймери BAF-225 і BAF-191, генерували з кДНК В-клітин, що покояться, субклонували і індивідуальні клони секвенували. Тут 5мкл кДНК В-клітин (Clontech), що покояться, використали в ПЛР-реакції з праймерами BAF-225 і BAF-191, як описано детально вище. Потім ПЛР-продукт очищали з використанням набору для очищення ПЛР-продукту до високої чистоти і концентрували. Для субклонування ПЛР-фрагмента кінці цього фрагмента фосфорильовали і затупляли з використанням набору для лігування Sure Clone (Amersham Pharmacia Biotech), відповідно до рекомендацій виробників. Одержаний продукт клонували в EcoRV-сайт pBluescriptII (Stratagene) і трансформували в *E. coli*. Індивідуальні колонії вирощували, одержували мініпрепарат плазмідної ДНК. Шість незалежних колоній секвенували.

#### Результати

Зріла нуклеотидна і амінокислотна послідовності JST576, передбачені програмою GENSCAN, показані на Фіг.2А (SEQ ID NO:3). ПЛР-продукти з реакцій BJBAB і IB-9, що охоплюють передбачений інтрон, показані на Фіг.2В і підтверджують існування інтрону в кДНК-клони JST576. Передбачений розмір ПЛР-продукту з кДНК JST576 дорівнює приблизно 788п.н. для BAF-225/BAF-191 і 767п.н. для BAF-226/BAF-191. ПЛР-продукти, одержані з матриці JST576, мають приблизно цей розмір (доріжки 10 і 11). ПЛР-продукти, одержані з використанням BAF-225/BAF-191 на оліго-dT-праймованому першому ланцюгу кДНК або BJBAB, або IM-9 (доріжки 2 і 6), мають однаковий розмір і є значно більш короткими, ніж продукт з кДНК JST576. Передбачений розмір цього фрагмента без передбаченого інтрону дорівнює 484п.н. Розмір ПЛР-продуктів узгоджується з цим розміром. Такі ж результати були одержані, якщо РНК BJBAB або IM-9 праймували випадковими гексамерами (доріжки 4 і 8). Реакції з використанням BAF-226/BAF-191 не працювали на матрицях першого ланцюга кДНК. Таким чином, здається, що інтрон, передбачений програмою GENSCAN, не існує в кДНК JST576. Послідовність сплайсованого продукту з РНК BJBAB і IM-9 підтверджували секвенуванням основної маси ПЛР-продукту, і вона відображена в послідовності, показаній на Фіг.2С (SEQ ID NO:4). Ця послідовність є ідентичною послідовності, показаній на Фіг.2 А (SEQ ID NO:3), за винятком відсутності ко дона аланіну (GCA) при нуклеотиді 149 (показаного малими буквами). Результати секвенування 6 незалежних клонів з реакції ОТ-ПЛР на кДНК В-клітин, що покояться, показують,

що використовуються обидва акцепторних сайти сплайсингу. Переважним акцепторним сайтом є, очевидно, продукт, що приводить до одного залишку аланіну (5/6 клонів). Однак, послідовність, передбачену GENSCAN, (SEQ ID NO:3), яка містить два аланіни, спостерігали в 1/6 клонах. Таким чином, була встановлена відкрита рамка зчитування для JST576 людини і був визначений сплайсинговий варіант, який відрізняється однією амінокислотою. Відкрита рамка зчитування передбачає білок з 184 амінокислот, показаний на Фіг.2D (SEQ ID NO:5). Залишок аланіну (A), надрукований жирним шрифтом, представляє сплайсинговий варіант. Цей білок автори називають BAFF-R. Розшифрована амінокислотна послідовність BAFF-R включає в себе гідрофобний район із залишків 72-100 (алгоритм Hopp-Woods) і потенційний трансмембранний сегмент із залишків 84-102, як показав аналіз з використанням алгоритму TMPred. За цим районом йде високозаряджений відрізок амінокислот, який може функціонувати як стоп-сигнал перенесення. BAFF-R не має N-кінцевої сигнальної послідовності і є мембранним білком типу III, схожим з іншими BAFF-зв'язувальними білками BCMA [Laabi, et al. (1992) EMBO J. 11: 3897-3904 і TACI (von Bulow and Bram, (1997) Science 278: (138-141)]. Передбачено, що N-кінець є позаклітинним доменом BAFF-R і містить мотив із 4 залишками цистеїну при залишках 19-35, що не є схожим з будь-яким іншим членом сімейства TNF-рецепторів. Передбачено, що C-кінець BAFF-R є внутрішньоклітинним доменом.

#### Приклад 3

Тут автори визначають ДНК-послідовність зліва від передбачуваного ініціюючого метіоніну для BAFF-R людини, що включає стоп-кодон в рамці зчитування.

#### Способи

Праймер BAF-254 (5'GGGCGCCTACAATCTCAGCTA 3') (SEQ ID NO:36) одержували відносно геномної послідовності, присутньої в ВАС HS250d10 (номер доступу GenBank Z99716), зліва від передбачуваної АТС, і використали в ПЛР-реакції з оліго BAF-236 (5'GGCGGACCAGGTCGAAGCACTC 3') (SEQ ID NO:37). Матрицею в цій реакції була кДНК першого ланцюга, одержана з РНК селезінки людини (Clontech) з використанням набору для попередньої ПЛР-ампліфікації, як описано виробником (Life Technologies). Ця ПЛР-реакція містила 3мкл реакції першого ланцюга, 1xPfu-буфер (Stratagene), 10% ДМСО, 0,2мМ dNTP, 150нг кожного праймера і 1,25 одиниць полімерази Pfu Turbo (Stratagene). ПЛР-продукт очищали з використанням набору для очищення ПЛР-продукту до високої чистоти (Roche Molecular Biochemicals) відповідно до інструкцій виробника. Кінці ПЛР-продукту затупляли і фосфорильовали з використанням набору для лігування Sure Clone (Amersham Pharmacia Biotech), клонували в сайт EcoRV pBSK2 (Stratagene) і трансформували в клітини DH5. Колонії, одержані в результаті лігування, використали для одержання мініпрепарату з використанням системи Wizard (Promega) і потім секвенували з використанням приладу ABI.

#### Результати

Послідовність ПЛР-продукту підтверджує, що ця мРНК містить послідовність безпосередньо зліва (проти ходу транскрипції) від АТГ, яка міститься в геномній послідовності. Ця послідовність підкреслена в послідовності, показаній на Фіг.3. Присутність в рамці зчитування зліва стоп-кодону і відсутність іншого метіоніну вказує на те, що метіонін, виявлений в кДНК JST578, є правильним ініціюючим метіоніном.

#### Приклад 4

Цей приклад описує клонування кДНК мишачого BAFF-R.

#### Способи

Приблизно один мільйон фагових бляшок піддавали скринінгу з бібліотеки кДНК мишачої клітинної лінії A20, придбаної з Stratagene (La Jolla, CA), відповідно до докладних інструкцій виробника. кДНК JST576, BAFF-R людини розщеплювали EcoNI і піддавали електрофорезу в плавкому при низькій температурі 1% гелі. Фрагмент 425п.н. вирізали з геля і оцінювали. Додавали три об'єми води і фрагмент геля кип'ятили протягом 5 хвилин. Фрагмент мітили 50мкКи  $^{32}\text{P}$ -dCTP (Amersham) в реакційній суміші, що містить 50мМ Tris pH8, 5мМ MgCl<sub>2</sub>, 10мкМ β-меркаптоетанол, 200мМ HEPES pH6,5, 20мкМ dNTP (за винятком dCTP), 0,27 одиниць pd(N)6-гексануклеотидів (Amersham Pharmacia Biotech) і 1 одиницю ферменту Кленова (USB) і витримували протягом ночі при кімнатній температурі. Приблизно один мільйон імпульсів на мл зонда інкубували з фільтрами в буфері для скринінгу бляшок (50мМ Tris, 1% ДСН, 1М NaCl, 0,1% пірофосфат натрію, 0,2% ПВП, 0,2% фікол, 0,2% BCA) протягом ночі при 65°C. Фільтри промивали в 2хSSC і 0,1% ДСН при 50°C протягом 1,5 годин (3х2л) і потім експонували на рентгенівській плівці протягом 2 днів. Ідентифікували приблизно 36 позитивних бляшок. З них 6 очищали. Фагміди вивільняли з використанням протоколу вирізування *in vivo*, детально описаного Stratagene. Одержані колонії вирощували і потім одержували міні-репарат ДНК (Qiagen). Клоні кДНК секвенували.

#### Результати

Консенсусна нуклеотидна послідовність мишачого BAFF-R представлена у вигляді Фіг.4А (SEQ ID NO:8), а амінокислотна послідовність представлена на Фіг.4В (SEQ ID NO:9). Три з цих клонів містили делецію з 10 амінокислот 119-129 у внутрішньоклітинному домені мишачого BAFF-R. Зіставлення послідовностей BAFF-R людини і миші ілюструє, що 4 залишки цистеїну у позаклітинному домені є консервативними, що положення ініціюючого метіоніну є схожим і що С-кінцевий район цих білків є висококонсервативним (Фіг.4С), причому останні 24 залишки є ідентичними. Ці послідовності мали загалом приблизно 56%-ну ідентичність.

#### Приклад 5

У цьому прикладі описана здатність рекомбінантного розчинного BAFF людини зв'язуватися з клітинами, котрансфікованими плазмідою rJST576 і GFP-репортерною плазмідою.

#### Матеріали і способи

Репортерна плазміда кодує мембранопрікріплену молекулу GFP і забезпечує можливість ідентифікації трансфікованих клітин від нетрансфікованих клітин. Клітини 293EBNA котрансфікували цією репортерною плазмідою і rJST576 з використанням Ліпофектаміну 2000 (Life Technologies). Через 18-20 годин після трансфекції клітини відділяли від чашок 5мМ ЕДТА в ФСБ і рахували. Клітини промивали два рази FACS-буфером (ФСБ, що містить 10% фетальну бичачу сироватку, 0,1% NaN<sub>3</sub>) і  $2,5 \times 10^5$  клітин інкубували протягом 1 години на льоду з біотинільованим мус-huBAFF, розведеним в FACS-буфері в діапазоні концентрацій 8нг/мл-5мкг/мл. Клітини промивали FACS-буфером і інкубували протягом 30 хвилин зі стрептавідином, кон'югованим з фікоерітрином (SAV-PE) (Jackson Immune-Research), при розведенні 1:100 з вихідного розчину. Клітини знову промивали FACS-буфером і ресуспендували в 1% параформальдегіді в FACS-буфері. Ці клітини аналізували за допомогою FACS на GFP- і PE-флуоресценцію і результати форматували в 4-квадрантній точковій діаграмі. Точки в двох правих квадрантах представляють клітини, які експресують репортер трансфекції GFP. Точки в двох верхніх квадрантах представляють клітини, що мають пов'язаний біотинільований мус-huBAFF, причому це скріплення виявлялося за допомогою SAV-PE. Клітини у верхньому правому квадранті є трансфікованими клітинами, які зв'язують біотинільований мус-huBAFF.

#### Результати

Незабарвлені клітини і клітини, забарвлені тільки SAV-PE, показують, що приблизно 50% є GFP-позитивними і були котрансфіковані репортерною плазмідою (Фіг.5). Коли клітини, котрансфіковані репортером GFP і rJST576, забарвлюють 1мкг/мл біотинільованого мус-huBAFF, майже всі клітини в нижньому правому квадранті зміщаються вгору, що свідчить про скріплення BAFF. Схожий результат спостерігається, якщо котрансфікують плазміду, яка експресує huTACI, замість rJST576. Відомо, що TACI зв'язує BAFF. Ці клітини забарвлювали п'ятикратним розведенням біотинільованого мус-huBAFF від 5мкг/мл до 8нг/мл, і у міру зниження концентрації біотинільованого мус-huBAFF інтенсивність зміщення зменшувалась.

#### Приклад 6

У цьому прикладі описана здатність рекомбінантного розчинного BAFF людини або рекомбінантного розчинного BAFF миші зв'язуватися з клітинами, котрансфікованими rJST576 і GEP-репортерною плазмідою.

#### Матеріали і способи

Котрансфекції в 293EBNA проводили, як описано в прикладі 5. Через 18-20 годин після трансфекції клітини відділяли, рахували і забарвлювали для FACS-аналізу аналогічно прикладу 5 з наступними модифікаціями. Клітини інкубували протягом 1 години на льоду з 5мкг/мл або мишачого, або людського рекомбінантного розчинного flag-BAFF з подальшим промиванням за допомогою інкубування протягом 30 хвилин з 5мкг/мл моноклонального антитіла M2 проти flag (Sigma Aldrich) і потім виявляли інкубуванням промитих клітин протягом

30 хвилин з PE-кон'югованим осячим антитілом проти мишачого IgG (Jackson ImmunoResearch) при розведенні 1:100 з вихідного розчину. Клітини знову промивали, фіксували параформальдегідом і аналізували за допомогою FACS на GFP- і PE-позитивні клітини.

#### Результати

Приблизно 50% цих клітин є GFP-позитивними і, отже, були котрансфіковані репортерною плазмідом (Фіг.6). Коли клітини, котрансфіковані GFP-репортером і rJST576, забарвлюють 5мкг/мл або людського, або мишачого рекомбінантного розчинного flag-BAFF, майже всі ці клітини в нижньому правому квадранті зміщуються вгору. Це вказує на те, що як мишачий, так і людський BAFF зв'язується з клітинами, трансфікованими rJST576.

#### Приклад 7

У цьому прикладі описана нездатність мишачого рекомбінантного розчинного APRIL зв'язуватися з клітинами, котрансфікованими rJST576 і GFP-репортерною плазмідом.

#### Матеріали і способи

Котрансфекції в 293EBNA проводили, як описано в прикладі 5. Через 18-20 годин після трансфекції клітини відділяли, рахували і забарвлювали для FACS-аналізу аналогічно прикладу 5 з наступними модифікаціями. Клітини інкубували протягом 1 години на льоду з 1мкг/мл мишачого рекомбінантного розчинного мус-APRIL з подальшим промиванням за допомогою інкубування протягом 30 хвилин з 5мкг/мл моноклонального антитіла проти мишачого APRIL з подальшою 30-хвилинною інкубацією промитих клітин з 5мкг/мл біотинільованого антитіла проти щурячого IgG2b (Pharmingen), і нарешті виявляли інкубуванням промитих клітин протягом 30 хвилин з SAV-PE. Клітини знову промивали, фіксували параформальдегідом і аналізували FACS на GFP- і PE-позитивні клітини.

#### Результати

Приблизно 50% цих клітин є GFP-позитивними і, отже, були котрансфіковані репортерною плазмідом (Фіг.7). Коли клітини, котрансфіковані GFP-репортером і rJST576, забарвлюють 1мкг/мл мишачого мус-APRIL, ніякі з цих клітин в нижньому правому квадранті не переміщуються вгору. Це відрізняється від клітин, котрансфікованих плазмідом, яка експресує TACI людини замість rJST576. У цих трансфікованих клітинах майже всі клітини були позитивними відносно скріплення мишачого мус-APRIL. Заздалегідь було показано, що як BAFF, так і APRIL зв'язуються як з TACI, так і з BCMA. Таким чином, той факт, що APRIL не зв'язується з BAFF-R, експресованим на rJST576-трансфікованих клітинах, свідчить про специфічність BAFF-R у відношенні BAFF.

#### Приклад 8

Цей приклад описує здатність BAFF-R, експресованого з rJST576, коімунопреципітуватися рекомбінантним розчинним людським flag-BAFF.

#### Матеріали і способи

Клітини 293EBNA трансфікували з використанням Ліпофектаміну 2000 rJST576, тільки вектором (контроль) або плазмідом, яка експресує huTACI, як позитивний контроль на скріплення BAFF. Після 20 годин інкубування середовище для

трансфекції відстоювали, клітини промивали ФСБ і середовище замінювали <sup>35</sup>S-середовищем для мічення (9 частин DMEM без метіоніну і цистеїну: 1 частина повної DMEM, доповненої 10% діалізованою фетальною бичачою сироваткою, 4мМ глутаміну і 100мкКи/мл <sup>35</sup>S-метіоніну і цистеїну (Translabel, ICN Radiochemicals)). Клітини інкубували в цьому середовищі протягом шести годин, після чого середовище видаляли. Клітини промивали ФСБ і потім солюбілізували в 250мкл буфера для екстракції (1% Brij 98, 150мМ NaCl, 50мМ Tris pH7,5). Коімунопреципітації проводили інкубуванням 75мкл екстрактів <sup>35</sup>S-мічених клітин з 5мкг рекомбінантного розчинного людського flag-BAFF в 1мл DMEM-10% фетальна теляча сироватка-0,1% NaN<sub>3</sub> протягом ночі при 4°C. Додавали моноклональне антитіло M2 проти flag, 10мкг, і протеїн Сефарози і інкубування продовжували протягом 2 годин. Гранули Сефарози збирали центрифугуванням, промивали FACS-буфером і ресуспендували в ДСН-буфері для нанесення з бета-меркаптоетанолом як відновлювальним агентом. Проби кип'ятили 5 хвилин, центрифугували протягом короткого часу для осадження гранул Сефарози і аліквоту піддавали електрофорезу на ДСН-ПААГ. Гель інкубували з Enlightning (New England Nuclear), сушили і експонували на плівці при -80°C.

#### Результати

Ця коімунопреципітація зв'язує flag-BAFF з гранулами протеїн Сефарози через антитіло M2 проти flag. Вона також осаджує будь-які білки в клітинному екстракті, які зв'язуються з flag-BAFF, і ці радіоактивні білки будуть детектуватися авто-радіографією. Оскільки клітини 293EBNA не зв'язують BAFF, контроль з пустим вектором показує фон, властивий цій процедурі (Фіг.8). Коли екстракти з клітин, трансфікованих TACI, коімунопреципітують з використанням flag-BAFF, спостерігають смугу з видимою молекулярною масою приблизно 12кДа. Передбачена молекулярна маса для BAFF-R, експресованого з rJST576, дорівнює 18,9кДа. Невідповідність між передбаченою і молекулярною масою, яка спостерігається, могла б бути зумовлена аномальною електрофоретичною рухливістю внаслідок заряду або конформації BAFF-R. Іншою можливістю є те, що смуга 12кДа є протеолітичним фрагментом BAFF-R.

#### Приклад 9

Цей приклад описує генерування розчинних форм BAFF-R. Можуть бути сконструйовані олігонуклеотидні праймери, комплементарні rJST576, для ПЛР-ампліфікації позаклітинного домену BAFF-R при відсутності трансмембранного і внутрішньоклітинного доменів. Звичайно включають велику частину «ніжки», або амінокислотного району між ліганд-зв'язувальним доменом і трансмембранним доменом. Можна варіювати кількістю району «ніжки», включеного для оптимізації активності (сили) одержаного розчинного рецептора.

Цей ампліфікований фрагмент міг би бути сконструйований з відповідними сайтами рестрикції для забезпечення можливості клонування з різними гетерологічними лідерними послідовностями на 5'-кінці цього фрагмента і з різними Ig-злитими химерними злитими векторами на 3'-кінці. Альтернативно, можна вбудувати стоп-сигнал на 3'-кінці позаклітинного домену BAFF-R і одержати розчинну форму цього рецептора або використати інший C-кінцевий злитий партнер без вдавання до застосування підходу з використанням Ig-зливої химери. Можна також створити N-кінцевий злитий білок, що складається з партнера по злиттю, що містить сигнальну послідовність, за якою йде N-кінцевий позаклітинний домен BAFF-R. Одержані вектори можуть експресуватись в більшості систем, що використовуються в біотехнології, в тому числі в дріжджах, клітинах комах, бактеріях і клітинах ссавців, і існують приклади для всіх типів експресії. Різні Fc-домени людини можуть бути приєднані для оптимізації або елімінації взаємодій FcR і комплекменту за бажанням. Альтернативно, мутовані форми цих Fc-доменів можуть бути використані для селективного видалення взаємодій FcR або комплекменту або приєднання N-пов'язаних цукрів до Fc-домену, що має певні переваги. Приклад зливої молекули BAFF-R:Fc показаний на Фіг.9. Ця молекула містить лідерну послідовність типу I з мишачого гена Ig-k, пов'язану сайтом рестрикції Aat2 з позаклітинним доменом BAFF-R (амінокислоти 2-71, як показано на Фіг.2D), який, в свою чергу, пов'язаний сайтом рестрикції Sail з Fc-доменом IgG1 людини.

#### Приклад 10

У цьому прикладі автори показують профіль експресії BAFF-R в тканинах і клітинних лініях людини з використанням Нозерн-блот-аналізу.

#### Матеріали і способи

Різні лінії В-клітин і не-В-клітин вирощували при відповідних умовах. РНК одержували з приблизно  $10^7$  клітин з використанням набору RNeasy (Qiagen). Ці РНК визначали кількісно і 20мкг кожної проби піддавали електрофорезу на 1,2% формальдегідному гелі, як описано [Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989]. Гель блотували на найлонову мембрану (BMB) і потім зшивали з використанням ультрафіолету (УФ). Декілька Нозерн-блотів людини (12 lane multi-tissue, human II і Immune system II) купували у Clontech. Фільтри передгібридизували при 65°C в буфері ExpressHyb (Clontech) протягом 30 хвилин і потім гібридизували з випадково праймованим  $^{32}$ P-міченим EcoNI-фрагментом з 3'-кінця JST576 протягом приблизно 3 годин. Фільтри промивали при кімнатній температурі в  $2 \times \text{SSC}/0,05\%$  ДСН протягом 45 хвилин і потім при 50°C в  $0,1 \times \text{SSC}/0,1\%$  ДСН протягом 45 хвилин. Фільтр експонували на рентгенівській плівці протягом 4 днів з використанням 2 посилюючих екранів. Крім того, декілька Нозерн-блотів людини (12 lane multi-tissue, human II і Immune system II) купували у Clontech, гібридизували із зондом JST576 і обробляли, як описано вище.

#### Результати

мРНК для BAFF-R, очевидно, переважно експресується в органах імунної системи на цьому рівні детектування. Найвищий рівень спостерігається в селезінці і лімфатичних вузлах, але мРНК виявляється також в PBL, тимусі, тонкій кишці і ободовій кишці (Фіг.10 А, В і С). Наближений розмір мРНК дорівнює 4,5т.п.н.; очевидно, є дві популяції мРНК в пробах, де цей ген не є вискоекспресованим. Дві мРНК можуть існувати також в селезінці і лімфатичних вузлах. Це може вказувати на те, що BAFF-R має альтернативні сайти приєднання поліА, або на те, що РНК зазнає альтернативному сплайсингу. При випробуванні клітинних ліній на присутність мРНК BAFF-R, детектується та ж сама мРНК розміром 4,5т.п.н. Тільки В-клітинні лінії експресують мРНК BAFF-R (Фіг.11). мРНК не детектується в клітинних лініях U266, RPMI8226 і Daudi або в перевірених не-В-клітинних лініях.

#### Приклад 11

У цьому прикладі автори показують, що експресія JST576 обмежується клітинними лініями, які зв'язують BAFF.

#### Матеріали і способи

Клітинні лінії купували з ATCC і вирощували у вказаних умовах. Різні лінії В-клітин і не-В-клітин вирощували у відповідних умовах. РНК одержували з приблизно  $10^7$  клітин з використанням набору RNeasy (Qiagen). Ці РНК визначали кількісно і 20мкг кожної проби піддавали електрофорезу на 1,2% формальдегідному гелі, як описано [Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989]. Гель блотували на найлонову мембрану (BMB) і потім зшивали з використанням ультрафіолету (УФ). Фільтр гібридизували з міченим фрагментом JST576 і потім промивали, як в прикладі 10. Клітини перевіряли на їх здатність зв'язувати BAFF з використанням FACS-аналізу. Приблизно  $2,5 \times 10^5$  клітин збирали і промивали. FLAG-мічений BAFF, розведений в ФСБ+5% ФБС і 0,05% азид натрію (FACS-буфері), інкубували з цими клітинами в діапазоні концентрацій 8-0,125мкг/мл протягом 30 хвилин на льоду. Клітини промивали FACS-буфером і інкубували протягом 30 хвилин на льоду з моноклональним антитілом M2 проти FLAG (Sigma) при 5мкг/мл. Клітини знову промивали FACS-буфером і потім інкубували з розведенням 1:5000 козячих антитіл проти мишачого IgG, кон'югованих з PE (Jackson ImmunoResearch), протягом 30 хвилин на льоду. Клітини промивали, як описано вище, і потім аналізували на проточному сортері FACSCalibur (Becton-Dickinson) з використанням програмного забезпечення CellQuest.

#### Результати

Результати експериментів зі скріплення BAFF показані в таблиці 1. Клітинними лініями, які зв'язують BAFF, є Ramos, Namalwa, IM-9, NC-37, Raji, BJAB і SKW6.4. Рівень скріплення показаний числом знаків +. Клітинними лініями, які не зв'язують BAFF, є U266, RPMI 8226, Daudi, U937, Jurkat, HT29, A549, SW480 і ME260. Здатність клітинних ліній зв'язувати BAFF корелює з присутністю мРНК BAFF-R, показаною на Фіг.11.

Таблиця 1

Лінія клітин	Тип	Скріплення BAFF
BJAB	Лімфома Беркітта	+++
IM-9	Лімфобласт IgG	+++
NC-37	Лімфобласт EB V+	++
Ramos	Лімфома Беркітта EBV-	++
Raji	Лімфома Беркітта	++
SKW6.4	Лімфобласт IgM	++
Namalwa	Лімфома Беркітта	+
Daudi	Лімфома Беркітта EBV+	-
U266	Плазмацитома	-
RPMI 8226	Плазмацитома	-
U937	Моноцит	-
Jurkat	T-клітинний лейкоз	-
HT29	Колоректальна аденокарцинома	-
A549	Карцинома легкого	-
SW480	Колоректальна аденокарцинома	-
ME260	Меланома	-

## Приклад 12

Цей приклад описує здатність злитого білка huBAFF-R:huIgG, який експресується і секретується в кондиціоноване середовище тимчасово трансфікованими клітинами 293EBNA, коїмунопреципітувати рекомбінантний розчинний біотинільований мус-huBAFF.

## Матеріали і способи

Клітини 293EBNA трансфікували з використанням Ліпофектаміну 2000 (Life Technologies) або плазмідом pJST618, яка експресує huBAFF-R (aa2-71):Fc, плазмідом, яка експресує huBCMA:huIgG як позитивний контроль на скріплення BAFF, або плазмідом, яка експресує huFN14:huIgG як негативний контроль на скріплення BAFF. Після 24 годин інкубації кондиціоновані середовища збирали.

Електрофорез в ДСН-ПААГ проводили змішуванням рівного об'єму 2-х буферів для електрофорезу з ДСН, з відновлювальним агентом або без відновлювального агента, з кондиціонованим середовищем і кип'ятінням протягом 5 хвилин. Потім проби піддавали електрофорезу на 4-20% ДСН-поліакриламідному гелі. Відомі кількості очищеного huBCMA:Fc піддавали електрофорезу в сусідніх доріжках для визначення кількості злитого білка hlgG в кондиціонованих середовищах. Пробу переносили на мембрани (Immobilon P, Millipore) за допомогою Вестерн-блоту в 0,01M CAPS pH11-10% MeOH-буфері. Мембрани блокували 5% знежиреним сухим молоком (NFDМ) в TEST, зондували розведенням 1:3000 козячого антитіла проти IgG людини, кон'югованого з HRP (Jackson ImmunoResearch), протягом 1 години, промивали в TBST і експонували на плівку. Коїмунопреципітації виконували інкубуванням 200мкл кондиціонованих середовищ з 200нг рекомбінантного розчинного flag-BAFF людини в 1мл DMEM - 10% фетальна бичача сироватка - 0,1% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> протягом ночі при 4°C. Додавали протеїн Сефарози і інкубації продовжували протягом 2 годин. Гранули Сефарози збирали центрифугуванням, промивали FACS TBST-буфером і ресуспендували в буфері для нанесення з ДСН, що містить бета-

меркаптоетанол як відновлювальний агент. Пробу кип'ятили 5 хвилин, центрифугували протягом короткого часу для осадження гранул Сефарози і аліквоту піддавали електрофорезу на ДСН-ПААГ. FLAG-huBAFF, 50нг, піддавали електрофорезу як позитивний контроль. Пробу переносили на PVDF-мембрани (Immobilon P, Millipore) за допомогою Вестерн-блоту в 0,01M CAPS pH 11/10% MeOH-буфері. Мембрани блокували 5% NFDМ-TBST, зондували 1мкг/мл антитілом анти-FLAG M2-HRP протягом 1 години, промивали в TBST і експонували на плівці.

## Результати

Коїмунопреципітація осаджує різні злиті білки рецепторне через взаємодію партнера злитого білка з протеїн Сефарозою. Вона осаджує також будь-які білки, взаємодіючи зі злитими білками R:IgG, такі як flag-BAFF. Кондиціоновані середовища з клітин, які експресують hBCMA:Fc, були здатні коїмунопреципітувати flag-BAFF, як очігувалося, оскільки смуга, яка комігрує з flag-BAFF, спостерігається на Вестерн-блоті (Фіг.12). Кондиціоновані середовища з клітин, які експресують hFN14:Fc, не коїмунопреципітують flag-BAFF. Кондиціоновані середовища з клітин, які експресують BAFF-R:Fc, здатні коїмунопреципітувати flag-BAFF. Смуга, яка комігрує з flag-BAFF, спостерігається на Вестерн-блоті і має схожу інтенсивність зі смугою, коїмунопреципітованою huBCMA:huIgG.

## Приклад 13

Цей приклад ілюструє здатність злитого білка BAFF-R:Fc, в цьому випадку huBAFF-R (aa2-71):huIgG, блокувати скріплення huBAFF з клітинами BJAB.

## Матеріали і способи

Злитий білок huBAFF-R(2-71)-huIgG, що обговорюється в прикладі 9, генерували, і відповідна йому ДНК-конструкція була названа pJST618. Цю конструкцію тимчасово трансфікували в клітини 293EBNA і кондиціоноване середовище збирали. Злитий білок очищали кислотної елюцією з протеїн А-Сефарози з подальшою гель-фільтраційною хроматографією. Біотинільований мус-huBAFF, 200нг/мл, передінкубували або з 50мкл FACS-буфера, або з п'ятикратним серійним розведенням, в діапазоні від 5мкг/мл до 200нг/мл, очищеного huBAFF-R:Fc протягом 30 хвилин на льоду. Потім клітини BJAB ( $2,5 \times 10^5$  клітин) інкубували з цими розчинами на льоду протягом однієї години. Клітини промивали FACS-буфером і забарвлювали SAV-PE. Клітини аналізували за допомогою FACS на PE-флуоресценцію і результати формували у вигляді графіків, що перекриваються. Альтернативно, 200нг/мл біотинільованого BAFF передінкубували з двократним серійним розведенням hBAFF-R:Fc, hTACLFc або hLTBR:Fc. Клітини забарвлювали на скріплення біотинільованого BAFF, як описано вище.

## Результати

Фіг.13А показує перекриття графіків, побудованих для скріплення huBAFF з BJAB в присутності різних концентрацій huBAFF-R:Fc. Чорна лінія, помічена «А», представляє скріплення фону SAV-PE, а червона лінія, помічена «Е», представляє

клітини, забарвлені біотинільованим мус-huBAFF без передінкубації з BAFF-R:Fc. Передінкубація біотинільованого мус-huBAFF з 5мкг/мл huBAFF-R:Fc приводить до зміщення в цьому графіку майже до рівня фону (крива В). Передінкубація або з 1мкг/мл (крива С), або з 200нг/мл (крива D) huBAFF-R-huIgG приводила до приблизно чотирьократно зменшення в скріпленні біотинільованого мус-huBAFF.

Фіг.13В показує, що як BAFF-R:Fc, так і TACiFc здатні блокувати скріплення BAFF з клітинами BJAB. Передінкубація з LTBR:Fc не має блокуючої BAFF дії.

#### Приклад 14

Цей приклад описує здатність злитого білка BAFF-R:IgG блокувати BAFF-індуковану проліферацію В-клітин.

#### Матеріали і способи

Для аналізу проліферації *in vitro* мишачі В-клітини виділяли з селезінок мишей C57B16 (8-тижневого віку) з використанням колонки для витягання В-клітин (колонка Collect™ для витягання мишачих В-клітин: Cedarlane Laboratories Limited, Ontario, Canada). Очищені В-клітини аналізували за допомогою FACS, і було виявлено, що вони на >90% є позитивними відносно B220-фарбування. В-клітини інкубували в 96-ямкових планшетах ( $10^5$  клітин на лунка в 50мл середовища RPMI, доповненого 10% ФБС) протягом 72 годин в присутності і за відсутності 2мг/мл козячих антитіл проти  $\mu$ -ланцюга людини (Sigma Chemical Co.); контроль hlgG (10мг/мл), huBAFF-R:Fc (10мг/мл). Проби висівали в трьох повторностях і з вказаними концентраціями мус-huBAFF. Клітини короткочасно мітили протягом додаткових 18 годин [ $^3$ H]тимідином (1мкКі/ямка) і збирали. Включення [ $^3$ H]тимідину піддавали моніторингу з використанням рідинного сцинтиляційного підрахунку. Злитий білок huBAFF-R:Fc, що одержується як в прикладі 13, використали в цьому аналізі; як обговорювалося в прикладі 9, його генерували з супернатанту rJST618-трансфікованих клітин 293EBNA. Супернатант збирали, наносили на Протеїн А-колонку, елюювали кислотою, нейтралізували і потім піддавали гель-фільтраційній хроматографії для одержання не утримуючого агрегатів білка huBAFF-R:Fc. BAFF, що використовується в цьому аналізі, експресували в *Pichia pastoris* і очищали аніонообмінною хроматографією з подальшою гель-фільтрацією.

#### Результати

Фіг.14 показує, що BAFF може костимулювати зростання В-клітин в присутності анти- $\mu$ -антитіл (квадрати) і hlgG (трикутники). Один BAFF (ромби) не здатний індукувати проліферацію В-клітин. Інкубування з 10мг/мл huBAFF-R:Fc (зірочки) приводить до повного інгібування BAFF-індукованої проліферації В-клітин.

#### Приклад 15

#### Матеріали і способи

#### Миші

Шеститижневих самиць мишей BALB/c одержували з Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) і утримували в умовах загороджень в Biogen Animal Facility.

#### Реагенти і схеми лікування

Рецепторні злиті білки містять Fc-район IgG людини. Миші (5 на групу) одержували 200мкг злитих білків (мишачий BAFF-R:Fc або людський BAFF-R:Fc) 2× на тиждень протягом 4 тижнів внутрішньоочеревино (ip). Контрольні миші одержували поліклональний IgG людини (Panglobulin™) (HlgG), 200мкг 2× на тиждень протягом 4 тижнів. Через три дні після останньої дози брали кров через очноямковий синус, потім мишей евтанізували і витягували селезінки, лімфатичні вузли і кістковий мозок для аналізу.

#### Проточний цитометричний аналіз

Під час умертвіння реєстрували ваги селезінок. Суспензії окремих клітин готували з селезінок і крові після лізування еритроцитів в гіпотонічному розчині. Суспензії окремих клітин готували також з пахових лімфатичних вузлів і кісткового мозку. Проточну цитометрію виконували з використанням mAB проти B220, IgM, IgD і CD21. Субпопуляції В-клітин селезінки визначали як фолікулярні (B220+, IgM<sup>низ</sup>, CD21<sup>низ</sup>), маргінальної зони (B220+, IgM<sup>вис</sup>, CD21<sup>вис</sup>) і новоутворені (B220+, IgM<sup>вис</sup>, CD21-). Коротко,  $\sim 1,5 \times 10^6$  клітин інкубували з 10мкг/мл Fc Block (Pharmingen) протягом 10 хвилин на льоду для блокування Fc-рецепторів з подальшим додаванням флуоресцентно мічених mAB і інкубування на льоду протягом 30 хвилин. Клітини промивали 1х і ресуспендували в 0,5% параформальдегіді. Результати флуоресценції клітин одержували на проточному цитометрі FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA) і аналізували з використанням програми CellQuest (Becton Dickinson).)

#### Результати

Після курсу 4-тижневого лікування мишачим або людським BAFF-R:Fc спостерігали помітне зменшення ваги селезінок з мишей, оброблених мишачим і людським BAFF-R:Fc (Фіг.15), в порівнянні з контрольними обробленими людським IgG мишами. Було виявлено, що видиме зниження насиченості клітинами селезінки відбувається внаслідок зменшення числа В-клітин селезінки. Середнє число всіх B220+ В-клітин селезінки у оброблених мишачим і людським BAFF-R:Fc мишей,  $1,8 \times 10^6$  і  $2,6 \times 10^6$  клітин, відповідно, було значуще зменшеним в порівнянні з числом В-клітин у контрольних оброблених HlgG тварин, які мали середнє  $19,8 \times 10^6$  клітин (Фіг.16). Випробування різних субпопуляцій В-клітин селезінок, фолікулярних, маргінальної зони і новоутворених, показало, що число В-клітин в кожній субпопуляції зменшувалось у оброблених BAFF-R:Fc мишей (таблиця 2), хоча В-клітини фолікулярні і маргінальної зони мали найвище зменшення.



Таблиця 2

Результати обробки BAFF-R:Fc в зменшенні субпопуляцій  
В-клітин селезінки

	Субпопуляція В-клітин селезінки ( $10^6 \times$ клітин $\pm$ SD)		
	Фолікулярні	Маргінальна зона	Новоутворені
IgG людини	14,5 $\pm$ 2,4	1,1 $\pm$ 0,3	1,5 $\pm$ 0,2
mBAFF-R:Fc	0,7 $\pm$ 0,1	0,06 $\pm$ 0,02	0,4 $\pm$ 0,1
hBAFF-R:Fc	1,4 $\pm$ 0,5	0,05 $\pm$ 0,02	0,5 $\pm$ 0,2

Миші одержували 200мкг HlgG, mBAFF-R:Fc або hBAFF-R:Fc в дні 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22 і 25. Мишей евтанізували в день 28 і селезінки витягували для аналізу субпопуляцій В-клітин.

Дослідження процента B220+ В-клітин, що містяться в пахових лімфатичних вузлах (LN), показало, що середнє популяцій В-клітин помітно знижувалося у оброблених мишачим і людським BAFF-R:Fc мишей, 12,3% $\pm$ 1,4 і 18,6% $\pm$ 1,3, відповідно, в порівнянні з контрольними обробленими HlgG мишами, які мали середнє 30,8% $\pm$ 4,1 В-клітин (Фіг.17). Подібні результати одержували при дослідженні В-клітин периферичної крові. 42,5% $\pm$ 2,9 лімфоцитів з одержуваних IgG людини мишей були В-клітинами, тоді як тільки 21,2% $\pm$ 6,1 і 8,3% $\pm$ 4,5 лімфоцитів були В-клітинами з оброблених мишачим і людським BAFF-R:Fc мишей, відповідно (Фіг.18).

Хоча популяції новоутворених (незрілих) В-клітин і популяції зрілих В-клітин зменшувались в оброблених BAFF-R:Fc мишах, не було впливу на попередники В-клітин в кістковому мозку (дані не показані).

#### Обговорення

Ці результати передбачають, що *in vivo* блокада BAFF злитим білком розчинного рецептора BAFF-R приводить до інгібування виживання і/або дозрівання В-клітин.

Ці результати передбачають також можливість потенційного застосування злитого білка BAFF-R як терапевтичного лікарського засобу з клінічними застосуваннями для опосередкованих В-клітинами захворювань. Ці захворювання могли б включати захворювання, які є аутоімунними за природою, такі як системний червоний вовчак, важка псевдопаралітична міастенія, аутоімунна гемолітична анемія, ідіопатична тромбоцитопенічна пурпура, антифосфоліпідний синдром, хвороба Шагаса, хвороба Грейвса, гранулематоз Вегенера, нодозний поліартеріїт і швидко прогресуючий гломерулонефрит. Цей терапевтичний агент міг би також знайти застосування в порушеннях плазматичних клітин, таких як множинна міелома, макроглобулінемія Вальденстрема, хвороба з ураженням важких ланцюгів імуноглобуліну, первинний або імуноцит-асоційований амілоїдоз і моноклональна гаммапатія невстановленої етіології (MGUS). Онкологічні мішені могли б включати в себе В-клітинні карциноми, лейкоз і лімфоми.

#### Приклад 16

У цьому прикладі описана характеристика видної панелі мишачих моноклональних антитіл, індукованих проти позаклітинного домену BAFF-R. Всі антитіла впізнають позаклітинний домен BAFF-

R, і набір цих антитіл володіє антагоністичними властивостями, що полягають в тому, що вони запобігають подальшому скріпленню BAFF з BAFF-R.

#### Матеріали і способи

Мишей RBF імунізували і повторно імунізували huBAFF-R:Fc. Спленоцити з імуних мишей зливали з мишачим мієломним штамом FL653, похідним штаму P3-X63-Ag8.653, для генерування гібридом стандартними способами.

Кондиціоновані середовища з гібридомних клонів, секретуючих антитіла проти позаклітинного домену huBAFF-R, аналізували за допомогою FACS. FACS-аналізи скріплення виконували з клітинами 293EBNA, котрансфікованими плазмідами, експресуючими повнорозмірний huBAFF-R або mBAFF-R і GFR, як в прикладі 5. Гібридомне кондиціоноване середовище розводили 1:10 в FACS-буфері і інкубували з трансфікованими клітинами протягом 30 хвилин на льоду. Клітини промивали FACS-буфером і скріплення виявляли інкубуванням з розведенням 1:100 антимишачого IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch) протягом 30 хвилин на льоду. Клітини знову промивали FACS-буфером і респендували в 1% параформальдегіді в FACS-буфері. Клітини аналізували за допомогою FACS на GFP- і PE-флуоресценцію і одержані дані формували в 4-квадрантній точковій діаграмі, як описано в прикладі 5. Аналізи блокування BAFF виконували інкубуванням 10мкг/мл протеїн А-очищеного анти-BAFF-R-mAb або контрольного антитіла (MOP C21) з клітинами BJAB протягом 30 хвилин на льоду. Після промивання клітини інкубували з 250нг/мл біотинільованого huBAFF протягом 30 хвилин на льоду. Клітини знову промивали і скріплення BAFF виявляли інкубуванням з SAV-PE. Клітини аналізували за допомогою FACS на PE-флуоресценцію і дані будували у вигляді графіків, що перекриваються.

#### Результати

Спостерігали, що супернатанти з десяти клонів зв'язують трансфіковані huBAFF-R клітини. Точкові діаграми даних FACS чотирьох з десяти анти-BAFF-R-супернатантів показані на Фіг.19А. Ефективність трансфекції була приблизно 50%, причому майже всі трансфіковані клітини зміщалися у верхній правий квадрант після фарбування супернатантів. Жоден з цих десяти супернатантів не зв'язувався з клітинами 293EBNA, трансфікованими mBAFF-R (дані не показані). Кондиціоновані середовища з цих клонів, які були позитивними відносно скріплення з BAFF-R, випробовували на їх здатність блокувати взаємодію BAFF з BAFF-R, експресованим на поверхні клітин BJAB. Клітини

BJAB експресують BAFF-R на їх поверхні і не експресують детектованих кількостей BCMA або TACI [Thompson et al. (2001) Science Aug 16]. Дві з десяти гібридом, клони 2 і 9, продукували mAB, які були здатні блокувати взаємодію BAFF-R з BAFF. (Клон 2 був депонований ATCC 6 вересня 2001 року як «анти-BAFF-R-клон №2.1» (ізотоп IgG1-каппа) і був позначений ATCC №\_\_\_\_; клон 9 був депонований ATCC 6 вересня 2001 року як «анти-BAFF-R-клон №9.1» (ізотип IgG1-каппа) і був позначений ATCC №\_\_\_\_). Перекриття графіків на Фіг.19B показують, що передінкубація 10мкг/мл або клону 2 mAB (крива (b)), або 9 (крива (c)) зміщує криву скріплення BAFF в більше ніж 10 разів, ліворуч, майже до сигналу контролю без BAFF (крива (a)). Самий правий графік (крива (d)) показує зміщення, коли контрольні mAB MOP C21, що не блокують анти-BAFF-R mAB або контролю без білка, інкубували з клітинами перед скріпленням BAFF.

#### Приклад 17

Цей приклад описує конструювання, послідовність і характеристику білка з амінокислотними замінами в hBAFF-R (2-71)-Fc, які приводять до збільшеної розчинності цієї рекомбінантно експресованої молекули.

#### Матеріали і способи

Дволанцюгові олігонуклеотидні касети з липкими кінцями використали для введення замін в залишках-мішенях лігуванням в ті ж самі сайти в гені hBAFF-R (2-71):IgG1. Експресійні плазмідні трансфікували в клітини 293EBNA з використанням Ліпоектаміну 2000, як в прикладі 5. Агрегацію визначали проведенням електрофорезу в ДСН-ПААГ у невідновлювальних умовах кондиціонованих середовищ через 20 годин після трансфекції, з подальшим Вестерн-перенесенням і детектування з HRP-кон'югованим антитілом проти IgG людини (1:100, Jackson ImmunoResearch) і ECL-детектування (детектування електрохемілюмінесценції), як в прикладі 12.

Експерименти з імунопреципітації виконували з використанням 100мкл кондиціонованих середовищ через 20 годин після трансфекції в 1мл DMEM/10% ФБС/0,2% NaA3 з 200нг flag-huBAFF. Проби качали протягом 30 хвилин при 4°C, додавали 30мкл протеїн Сефарози на пробірку і качання продовжували протягом додаткових 30 хвилин. Гранули Сефарози осаджували і промивали три рази 1мл холодного ФБС.

Гранули суспендували в 2х ДСН-відновлювальному буфері і наносили на (4-20%)-акриламідні гелі. Після Вестерн-перенесення, як описано вище, здатність імунопреципітувати flag-BAFF виявляли інкубуванням фільтрів з 1мкг/мл HRP-кон'югованого антитіла M2 проти flag (Sigma) з подальшим ECL-детектування.

#### Результати

Хоча людський BAFF-R:Fc є високоагрегованим, мишачий BAFF-R:Fc є лише слабо (<10%) агрегованим. Делеційний аналіз показав, що вся С-кінцева частина BAFF-R могла бути делетована від A71 до V36 (останнім Cys багатого цистеїном домену (CRD) є C35) без зменшення утворення агрегатів. Це дозволяє вважати, що N-кінцевий

район і CRD-район hBAFF-R є необхідними для утворення агрегатів.

Спочатку генерували декілька химер «миша-людина»-BAFF-R:Fc, в яких різні кількості N-кінцевої послідовності BAFF-R людини замінювали гомологічною мишачою послідовністю і аналізували відносно дії на агрегацію білка. Амінокислотні послідовності для цих і подальших замін в hBAFF-R:Fc показані на Фіг.20. Ця Фіг. показує BAFF-R-частину як людського (Фіг.9), так і мишачого BAFF-R:Fc дикого типу з нумерацією, відповідною амінокислотним залишкам з повнорозмірного людського (Фіг.2d) (SEQ ID NO:5) або мишачого BAFF-R (Фіг.4b) (SEQ ID NO:9). Фіг.20 також показує клони hBAFF-R:Fc із замінами, причому замінені залишки показані жирним шрифтом, червоним кольором, підкресленням. Очевидно, химери, що містять менше ніж перші 21, мишачих залишків (Q21), перед перемиканням на людські залишки, агрегуються схоже з hBAFF-R:Fc дикого типу; однак, химери, що містять, щонайменше, перші 39 мишачих залишків, агрегуються в помітно меншій мірі, подібно до mBAFF-R. Серед додаткових дев'яти залишків, що розрізняються між цими двома химерними BAFF-R:Fc-конструкціями, чотири з них розрізняються між мишею і людиною. Це дозволяє думати, що, щонайменше, один з людських залишків між C19 і L27, в районі, внутрішньому відносно CRD, є необхідним для агрегації.

Конструкції із замінами людських залишків залишками, відповідними мишачим залишкам, тільки в цих 4 сайтах або їх субпопуляцію одержували стандартними способами. Коли тільки ці 4 залишки V20N P21Q A22T L27P були замінені в людській BAFF-R-частині, цей модифікований BAFF-R:Fc не агрегувався. hBAFF-R (V20N P21Q A22T L27P):Fc все ще був здатний взаємодіяти з BAFF, як показано аналізом імунопреципітації. Заміну V20N L27P також зменшувала агрегацію hBAFF-R:Fc з приблизно 90% до приблизно 10%. Проміжні рівні агрегації спостерігали з P21Q L27P (40%), L27P (60%), V20N L27A (60%) і V20N L27S (60%). Жодна з наступних замін не знижувала агрегацію білка: V20N P21Q A22T; V20N A22T; V20NP21Q; V20N і P21Q.

#### Приклад 18

Цей приклад показує, що p21-Arc є білком, асоційованим з BAFF-R. Способом, використаним для визначення такої взаємодії, була імунопреципітація.

#### Способи

Одержували конструкцію, що містить кДНК, яка кодує внутрішньоклітинний домен BAFF-R (BAFF-R-i.c.d.) з тус, міченим на N-кінці, і субклонували її в плазміді CH269 в сайтах NheI (51) і XhoI (3'). Клітини 293E трансфікували цією конструкцією і лізували через 72 години буфером для лізису, що містить в 150мМ NaCl, 50мМ Трис-HCl, pH7,5, 1мМ Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 50мМ NaF і 1% Brij 97. Клітинні лізати освітлювали з використанням настільної центрифуги при 10000g протягом 5 хвилин і імунопреципітували моноклональним антитілом проти тус, 9E10. Імунопреципітанти розділяли електрофорезом в 10-20%-ДСН-ПААГ при відновлювальних умовах і транс-блотували на мембрану PVDF.

Блоковані білки візуалізували 0,2% розчином Ронсеау S і зони, відповідні білкам, специфічно пов'язаним з BAFF-R, вирізали і піддавали аналізу секвенування N-кінцевої амінокислотної послідовності. Неоднозначний пошук в ненадмірній базі даних з використанням алгоритму PATTERN SEARCH виконували відносно одержаних даних за N-кінцевою послідовністю.

#### Результати

Один з білків, специфічно асоційованих з цитоплазматичним доменом тус-міченого BAFF-R, має видиму молекулярну масу 21кДа. Цей білок однозначно ідентифікований як p21-Arc (споріднений актину білковий комплекс). p21-Arc є компонентом семисубодиничного білка, названого комплексом Arc2/3, який, як було показано, бере участь в полімеризації актину [Welch et al. (1997) J.Cell Biol. 138: 357]. Нещодавно повідомлялося, що актинзв'язувальний білок, філамін, зв'язується з фактором 2, асоційованим з рецептором фактора некро-

зу пухлин (TRAF2) [Leonardi et al. (2000) J. Biol. Chem. 275: 271]. Таким чином, ідентифікація p21-Arc в коімунопреципітатах цитоплазматичного домену BAFF-R передбачає, що p21-Arc або безпосередньо пов'язаний з BAFF-R, або опосередковано пов'язаний з BAFF-R через його асоціацію з TRAF2 і/або іншим білком TRAF, який, в свою чергу, зв'язується з BAFF-R.

З попереднього докладного опису конкретних варіантів даного винаходу повинно бути очевидним, що були описані єдині в своєму роді результати. Хоча конкретні варіанти були детально описані тут, це було зроблено як приклад тільки для цілей ілюстрації і не призначається для обмеження об'єму прикладеної далі формули винаходу. Зокрема, автор винаходу передбачає, що різні заміни, зміни і модифікації можуть бути вироблені у відношенні даного винаходу без відходу від ідеї і об'єму даного винаходу, що визначається формулою даного винаходу.

#### УТОЧНЕНИЙ СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

- <110> Biogen, Inc.  
Thompson, Jeffrey S  
Ambrose, Christine M
- <120> Рецептор нуклеїнових кислот і поліпептидів
- <130> BIOG-0086
- <150> 60/233,152  
<151> 2000-09-18
- <150> 60/234, 140  
<151> 2000-09-21
- <150> 60/268,499  
<151> 2001-02-13
- <150> 60/312,185  
<151> 2001-08-14
- <160> 37
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1  
<211> 1201

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Homo sapiens

<400> 1  
gcaccatgag gcgaggggccc cggagcctgc ggggcaggga cgcgccagcc cccacgcctt 60  
gcgtcccggc cgagtgtctt gacctgtctg tccgccactg cgtggcctgc gggtccttgc 120  
gcacgcccgc gccgaaaccg ggtaaggggg acccacgggg cgcgcggcgc cggcagctgc 180  
ggggagaacg gggcccgat cgcagggcg caggcagagc cccgacccc gggggcgcg 240  
agggctgaaa ggaccctgtg ggagggcct ggagggggccc gcgatcacg cgtggccctc 300  
accgcgcct ctctccctcc ccttgtccac cgcgcccggt ctgtccctcc cctcccggc 360  
cagcctcgcc cccctccgcc cctcccgte ccgctcctc cctccctcg gccccctggc 420  
ctccctccct gtccctccc gaagcagccg gggccagcag cctgcgccc aggaaggcgc 480  
tgacgcgcga ggagtgggt ggcgcgggg cggcgaggc ggcgctgccc ctgcccgggc 540  
tgctctttgg cgccccgcg ctgctgggcc tggcactggt cctggcgctg gtctgtgtg 600  
gtctgtgtgg ctggagcgcg cgacagcgcc ggcttcgctg cgcgtccctc gcagaggccc 660  
ccgacggaga caaggacgcc ccagagcccc tggacaaggt catcattctg tctccggaa 720  
tctctgatgc cacagctcct gcctggcctc ctctgggga agacccagga accacccac 780  
ctggccacag tgtccctgtg ccagccacag agctgggctc cactgaactg gtgaccacca 840  
agacggccgg ccctgagcaa caatagcag gagccggcag gaggtggccc ctgcccctcc 900  
tctggacccc cagccagggg cttggaatc aaattcagct cttactcca gcatgcacat 960  
gccctcttct tgggaccag ctaaccctgc agaagcacg aactacaga ccacagcatt 1020  
cagcccccct ggagtttgg gtgcttgcct ttggcttcag acctcaccat ctttgacagc 1080  
ccttgaaagg gttagccag ctctgttcc tgtgccttca aaaggctggg gcactatgag 1140  
taaaagaccg cttttaaaat ggggaaggca ccattaagcc aaaatgaatc tgaaaaaga 1200  
c 1201

&lt;210&gt; 2

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Homo sapiens

<400> 2  
gtcgaccac gcgtccgccc acgctccggg tgcggcgggc tggcaccat gaggcgaggg 60  
ccccggagcc tgcggggcag ggacgcgcca gcccacgc cctgcgtccc ggccgagtgc 120  
ttcgacctgc tggtcggcca ctgctggccc tgcgggctcc tgcgcagccc gcggccgaaa 180  
ccgggtaagg gggaccacg gggcgcgcg cgcggcagc tgcggggaga acggggcccc 240  
gatcgccagg gcgcagcag agccccgacc cccggggcg cggagggctg aaaggaccct 300  
gtgggcaagg cctggagggg cccgcgatca ccgctggccc ctacacggcg cctctctccc 360  
tcccctgtgc caccgcccc cggctgtccc tcccctccc ggccagcctc gccccctcc 420  
gcccctcccc gtccccgctc ctccctccc tgggccccct ggctccctc cctgtccct 480  
cccgaagcag ccggggccag cagccctgcg ccagagcgg cgtgcagccc gcaggagtgc 540  
gtggggcgcg gggccggcga ggcggcgctg cccctgccc ggctgctctt tggcgcccc 600  
gcgtgctgg gcctggcact ggtcctggcg ctggtcctgg tgggtctggt gagctggagg 660  
cggcgacagc ggcggcttgc cggcgctcc tccgagagg ccccgacgg agacaaggac 720  
gcccagagc cctggacaa ggtcatcatt ctgtctccg gaatctctga tgccacagct 780  
cctgcctggc ctctctctgg ggaagaccca ggaaccacc cacttgcca cagtgtccct 840  
gtgccagcca cagagctggg ctccactgaa ctggtgacca ccaagacggc cggccctgag 900  
caacaatagc agggagccgg caggaggtgg cccctgccct cctctggac cccagccag 960  
gggcttgaa atcaaatcca gctcttact cc 992

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 906

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Homo sapiens

<400> 3  
ggcgccggc accatgaggc gagggcccg gagcctcgg ggagggagc cgcagcccc 60  
cagccctgc gtcccgccg agtgcttcca cctgctggtc cgcactcgc tggcctcgg 120  
gtcctgcgc acgcgcggc cgaaaccggc agccggggcc agcagccctg cgcacggac 180

105

83458

106

```

ggcgctgcag ccgcaggagt cgggtgggcgc gggggccggc gaggcggcgc tgcccctgcc 240
cgggctgctc tttgggcccc ccgcgctgct gggcctggca ctggctcctg cgctggctcct 300
ggtgggtctg gtgagctgga ggcggcgaca ggcggcgtt cgcggcgcgt cctccgcaga 360
ggcccccgac ggagacaagg acgccccaga gccctggac aaggtcatca ttctgtctcc 420
gggaatctct gatgccacag ctctgcctg gcctcctcct ggggaagacc caggaaccac 480
cccacctggc cacagtgtcc ctgtgccagc cacagagctg ggctccactg aactggtgac 540
caccaagacg gccggccctg agcaacaata gcaggagacc gcaggagagt gggccctgcc 600
ctccctctgg acccccagcc aggggcttgg aaatcaaatt cagctcttca ctccagcatg 660
cacatgccct ctttctggga ccaggctaac cctgcagaag cacagacact acagaccaca 720
gcattcagcc cccatggagt ttggtgtgct tgcctttggc ttcagacctc accatctttg 780
acagcccttg aaggtggtag cccagctcct gttcctgtgc cttcaaaagg ctggggcact 840
atgagtaaaa gaccgctttt aaaatgggga aggcaccatt aagccaaat gaatctgaaa 900
aaagac

```

```

<210> 4
<211> 903
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 4
ggcgcgcgc accatgaggc gagggccccg gagcctgcgg ggcagggacg cgcagcccc 60
cacgcccctgc gtcccgcccg agtgcttcga cctgctggtc cgcactgcg tggcctgcgg 120
gtcctctgcgc acgcgcgcgc cgaaccggc cggggccagc agcctgcgc ccaggacggc 180
gttgagcccg caggagtcgg tgggcgcggg ggcggcgag gcggcgctgc ccctgcccgg 240
gtctgtctttt ggcccccccg cgctgctggg cctggcactg gtctggcgc tggctctggt 300
gggtctggtg agctggaggg ggcgacagcg gcgcttcgc ggcgcgtcct ccgcagaggg 360
ccccgacgga gacaaggacg cccagagacc cctggacaag gtcactatc tgtctccggg 420
aatctctgat gccacagctc ctgcctggcc tcctcctggg gaagaccag gaaccacccc 480
acctggccac agtgtccctg tgccagccac agagctgggc tccactgaac tggtgaccac 540
caagacggcc ggccctgagc aacaatagca gggagccggc aggaggtggc ccctgcccctc 600
cctctggacc cccagccagg ggcttgaaa tcaaattcag ctcttctc cagcatgcac 660
atgcccctctt tctgggacca ggctaaccct gcagaagcac agacactaca gaccacagca 720
ttcagccccc atggagtttg gtgtgcttgc ctttgcttc agacctcacc atctttgaca 780
gcccttgaa ggtgtagccc agctcctgtt cctgtgcctt caaaaggctg gggcactatg 840
agtaaaagac cgcttttaaa atggggaagg caccattaag ccaaaatgaa tctgaaaaaa 900
gac

```

```

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

```

```

<400> 5
Met Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro
1 5
Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys
20 25 30
Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Ala Gly
35 40 45
Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val
50 55 60
Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Leu Pro Leu Pro Gly Leu Leu Phe
65 70 75 80
Gly Ala Pro Ala Leu Leu Gly Leu Ala Leu Val Leu Ala Leu Val Leu
85 90 95

```

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

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

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

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

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

Thr Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln Gln  
180 185

<210> 6  
<211> 1187  
<212> DHK  
<213> Homo sapiens

<400> 6  
gggagcctac aatctcagct actcgggagg ctgaggcaga gaattgtttg aaccggggag 60  
gcagagcttg cagtgcgccc agatagcgcc attgcactcc agcctgggag acagagcgag 120  
actcgcgtctc aaaaaaaaaa aaagaaaaga aagggggggc ccagggcgagc tcggtccac 180  
ccagcaggcg ggggcggggc agggcagagt gctccccccg ccccccgctt cctccccgag 240  
ggccccggag ccagctcag cctcagtcct cgcagcttgt gcggcggcgt cggcaccatg 300  
aggcgagggc cccggagcct gcggggcagg gacgcgccag cccccacgcc ctgcgtcccg 360  
gcccagtgct tcgacctgct ggtccgccac tgcgtggcct gcgggctcct gcgcacgccg 420  
cggcgaaac cggccggggc cagcagccct gcgcccagga cggcgctgca gccgcaggag 480  
tcgggtggcg cggggggcgg caggcgggcg ctgcccctgc cgggctgct ctttggcgcc 540  
cccgcgctgc tgggcctggc actggtcctg gcgctggtcc tgggtgggtc ggtgagctgg 600  
aggcggcgac agcggcggtc tcgcggcgag tcctccgcag agggcccccga cggagacaag 660  
gacgccccag agccctcgga caaggtcatc attctgtctc cgggaatctc tgatgccaca 720  
gtcctcgtct ggctcctcc tggggaagac ccaggaacca cccacactgg ccacagtgtc 780  
cctgtgccag ccacagagct gggctccact gaactggtga ccaccaagac ggccggccct 840  
gagcaacaat agcaggagag cggcaggagg tggcccctgc cctccctctg gacccccagc 900  
caggggcttg gaaatcaaat tcagctcttc actccagcat gcacatgccc tctttctggg 960  
accaggctaa ccctgcagaa gcacagacac tacagaccac agcattcagc ccccatggag 1020  
tttggtgtgc ttgcctttg cttcagacct caccatcttt gacagccctt gaaggtggta 1080  
gcccagctcc tgttctctgt ccttcaaaag gctggggcac tatgagtaaa agaccgcttt 1140  
taaaatgggg aaggcaccat taagcaaaa tgaatctgaa aaaagac 1187

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

<400> 7  
Thr Arg Glu Ala Glu Leu Ala Val Ser Arg Asp Ser Ala Ile Ala Leu  
1 5 10 15

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

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

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

Pro Gly Ala Gln Leu Ser Leu Ser Pro Arg Ser Leu Cys Gly Gly Val  
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 8  
<211> 1943  
<212> DHK  
<213> Mus musculus

<400> 8  
gaattcggca cgagcccaga ctcggaactg tcccagctgc atgaggcggc gacatggggc 60  
ccaggagact cgggtccga agccagagga gccgggacag ctcggtgccc acccagtgc 120  
atcagaccga gtgcttcgac cctctggtga gaaactgcgt gtccgtgtgag ctcttcacac 180  
cgccggacac tggacataca agcagcctgg agcctgggac agctctgcag cctcaggagg 240  
gctccgcgct gagaccgac gtggcgctgc tcgtcggtgc ccccgactc ctgggactga 300  
tactggcgct gaccctggtg ggtctagtga gtctggtgag ctggaggtgg cgtcaacagc 360  
tcaggacggc ctcccagac acttcagaag gagtccagca agagtccctg gaaaatgtct 420  
ttgtaccctc ctcaaaaacc cctcatgcct cagctcctac ctggcctccg ctcaaagaag 480  
atgcagacag cgccctgcca cgccacagcg tcccgggtgcc cgccacagaa ctgggctcca 540  
ccgagctggt gaccaccaag acagctggcc cagagcaata gcagcagtg aggctggaac 600  
ccagggatct ctactgggct tgtggaactc acccaacagc ttgggaaaga acttgccct 660  
tcagtgcagg agtcctttgc ctggggggcg aaccggcag aaccagacac tacaggccac 720  
atgagattgc ttttgtgtta gctcttgact tgagaacgtt ccatttctga gatggttttt 780  
aagcctgtgt gccttcagat ggttgatag acttgagggt tgcataattt atctctgtag 840  
tgagtccgag actggaaact taatctcgtt ctaaaaattt tggattactg ggctggaggt 900  
atggctcagc agttcggttt gtgtgctgtt ctaggcagg actccagttg ttcagcttc 960  
cggaactcag atctggcagc ttaagaccac ctgtcactcc agcccctgga acatccttgc 1020  
ctccaaaggc accagcactc atttgctcta gagcacacac acacacacac acacacacac 1080  
acacacacac acacacacat atgcatgcat gcacacttaa aaatgtcaaa attagcggt 1140

```

ggagaaattc atgggtcaaca gcgcttactg tgattccaga ggatgagagt ttgattccca 1200
gaatgcactg cgggtggctc attactgagc ataacttttg cttcagggga cctgatgcct 1260
ctggacttca tgggcatctg tattcacgtg cacatcctac acacacacac acacacacac 1320
acagacatac acacacacac actcttttac aaatgataaa atataagata ggcattggtgg 1380
tacacacott taatccaac attggggaag caaaggcagg caggtactg agttggaggc 1440
catcctggtc tacatagcaa gttccaggct aaccagagct aaatggtgag accaagtctc 1500
aaaataatac tccccccca aaaaaaaaaa acttttaaat tttgattttt ttcttttatt 1560
attatttttt atattaattt catggtgttt agaagtggta tacttagatg gtgactaaga 1620
ggaggtaaag ccatcaggac tgagccccta acatacaagg agaaagcaga gacaatgaac 1680
acgcccctct cctgctgtgt gccagctctg gaccaccagc cagagggcaa tcatcagatg 1740
tgggccctag aaccttcaga gccgaaagct aaatcaatct catttctttg taaagctatt 1800
tagccttagg tgttttgta cgggtgatata aaatggacta acacaggcac tatgagtaag 1860
aagcttttct ttgagctggg aaaggtactg ttaaaccaaa attaattctga ataaaaaaag 1920
gctaagggga agacacttaa aaa 1943

```

<210> 9

<211> 175

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 10

<211> 184

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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



113

83458

114

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

Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln Gln  
100

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

<220>  
<221> сигнальний білок  
<222> (1) .. (63)  
<223> кодує сигнальний білок

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (64) .. (66)  
<223> введення сайту рестрикції

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (67) .. (276)  
<223> кодує екстрацелюлярний домен BAFF-R

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (277) .. (279)  
<223> введення сайту рестрикції

<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (280)..(960)  
 <223> кодує Fc IgG1 людини

```

<400> 11
atggagacag acacactcct gttatgggtg ctgctgtctt gggttccagg ttccactggt 60
gacgtcaggc gagggccccc gagcctgcgg ggcaggggacg cgcagccccc cagccctgc 120
gtcccggccc agtgcttcga cctgctgtgc cgcactgcgg tggcctgcgg gctcctgcgc 180
acgccggcggc cgaaacccgc cggggccagc agccctgcgc ccaggacggc gctgcagccg 240
caggagtcgg tgggcgcggg ggcggcgag ggcggcgtcg acaaaactca cacatgccca 300
ccgtgccagc cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tctcttccc cccaaaaccc 360
aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc 420
cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 480
aagacaaagc cggcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 540
gtctgcacc aggaactggc gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 600
ctccagcccc ccattcgaga aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 660
ctgtacaccc tgcccccatt ccgggatgag ctgaccaaga accagggtcag cctgacctgc 720
ctggtcaaa gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 780
gagaacaact acaagaccac gctcccgtg ttggactccg acggctcctt cttcctctac 840
agcaagtcga ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 900
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tcccgggaaa 960
tga 963

```

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

<220>  
 <221> СИГНАЛ  
 <222> (1)..(21)  
 <223> СИГНАЛЬНА ПОСЛІДОВНІСТЬ

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (22)..(22)  
 <223> кодується областю з введенням сайтом рестрикції

<220>  
 <221> БЛОК  
 <222> (23)..(92)  
 <223> BAFF-R позаклітинний домен

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (93)..(93)  
 <223> кодується областю з введенням сайтом рестрикції

<220>  
 <221> БЛОК  
 <222> (94)..(320)  
 <223> Fc IgG1 людини

```

<400> 12
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1      5      10      15

```

Gly	Ser	Thr	Gly	Asp	Val	Arg	Arg	Gly	Pro	Arg	Ser	Leu	Arg	Gly	Arg
			20					25					30		
Asp	Ala	Pro	Ala	Pro	Thr	Pro	Cys	Val	Pro	Ala	Glu	Cys	Phe	Asp	Leu
		35					40					45			
Leu	Val	Arg	His	Cys	Val	Ala	Cys	Gly	Leu	Leu	Arg	Thr	Pro	Arg	Pro
	50					55					60				
Lys	Pro	Ala	Gly	Ala	Ser	Ser	Pro	Ala	Pro	Arg	Thr	Ala	Leu	Gln	Pro
	65				70					75				80	
Gln	Glu	Ser	Val	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Glu	Ala	Ala	Val	Asp	Lys	Thr
				85					90					95	
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
			100					105					110		
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
		115					120					125			
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
	130					135					140				
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
	145				150					155					160
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
				165					170					175	
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
			180					185					190		
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
		195					200					205			
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
	210					215					220				
Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
	225				230					235					240
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
				245					250					255	
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
			260					265					270		
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
		275					280					285			
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
	290					295					300				
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys
	305				310					315					320

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 70

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 13

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

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

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

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

Gly Ala Gly Glu Ala Ala  
65 70

<210> 14

<211> 65

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

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

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

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

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

Leu  
65

<210> 15

<211> 73

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (1) .. (1)

<223> заміна

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (2) .. (2)

<223> заміна

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (5) .. (5)

<223> заміна

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (6) .. (6)

<223> заміна

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (7) .. (7)

<223> заміна

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (10) .. (10)

<223> заміна

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (12) .. (12)

<223> заміна

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (15) .. (15)

<223> заміна

121

83458

122

&lt;400&gt; 15

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

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

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

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

Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala  
65 70

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 73

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; ВАРИАНТ

&lt;222&gt; (1) .. (1)

&lt;223&gt; заміна

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; ВАРИАНТ

&lt;222&gt; (2) .. (2)

&lt;223&gt; заміна

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; ВАРИАНТ

&lt;222&gt; (10) .. (10)

&lt;223&gt; заміна

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; ВАРИАНТ

&lt;222&gt; (12) .. (12)

&lt;223&gt; заміна

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; ВАРИАНТ

&lt;222&gt; (15) .. (15)

&lt;223&gt; заміна

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; ВАРИАНТ

&lt;222&gt; (16) .. (16)

&lt;223&gt; заміна

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; ВАРИАНТ

&lt;222&gt; (17) .. (17)

&lt;223&gt; заміна

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; ВАРИАНТ

&lt;222&gt; (20) .. (20)

&lt;223&gt; заміна

&lt;400&gt; 16

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

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

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

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

123

83458

124

Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala  
65 70

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

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

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

<220>

<221> ВАРИАНТ  
<222> (5) .. (5)  
<223> заміна

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (6) .. (6)  
<223> заміна

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (7) .. (7)  
<223> заміна

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

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

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

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (16) .. (16)  
<223> заміна

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (17) .. (17)  
<223> заміна

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (20) .. (20)  
<223> заміна

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (22) .. (22)  
<223> заміна

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (23) .. (23)  
<223> заміна

<220>  
<221> ВАРИАНТ

&lt;222&gt; (24) .. (24)

&lt;223&gt; заміна

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; ВАРИАНТ

&lt;222&gt; (29) .. (29)

&lt;223&gt; заміна

&lt;400&gt; 17

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

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

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

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

Val	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Glu	Ala	Ala
65					70			

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 73

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; ВАРИАНТ

&lt;222&gt; (1) .. (1)

&lt;223&gt; заміна

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; ВАРИАНТ

&lt;222&gt; (2) .. (2)

&lt;223&gt; заміна

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; ВАРИАНТ

&lt;222&gt; (5) .. (5)

&lt;223&gt; заміна

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; ВАРИАНТ

&lt;222&gt; (6) .. (6)

&lt;223&gt; заміна

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; ВАРИАНТ

&lt;222&gt; (7) .. (7)

&lt;223&gt; заміна

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; ВАРИАНТ

&lt;222&gt; (10) .. (10)

&lt;223&gt; заміна

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; ВАРИАНТ

&lt;222&gt; (12) .. (12)

&lt;223&gt; заміна

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; ВАРИАНТ

&lt;222&gt; (15) .. (15)

&lt;223&gt; заміна

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; ВАРИАНТ

&lt;222&gt; (16) .. (16)

&lt;223&gt; заміна

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; ВАРИАНТ

&lt;222&gt; (17) .. (17)

&lt;223&gt; заміна

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; ВАРИАНТ

&lt;222&gt; (20) .. (20)

&lt;223&gt; заміна

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; ВАРИАНТ

&lt;222&gt; (22) .. (22)

&lt;223&gt; заміна

<220>  
 <221> ВАРИАНТ  
 <222> (23) .. (23)  
 <223> заміна

<220>  
 <221> ВАРИАНТ  
 <222> (24) .. (24)  
 <223> заміна

<220>  
 <221> ВАРИАНТ  
 <222> (29) .. (29)  
 <223> заміна

<220>  
 <221> ВАРИАНТ  
 <222> (33) .. (33)  
 <223> заміна

<400> 18

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

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

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

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

Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala  
 65 70

<210> 19  
 <211> 70  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> ВАРИАНТ  
 <222> (22) .. (22)  
 <223> заміна

<220>  
 <221> ВАРИАНТ  
 <222> (23) .. (23)  
 <223> заміна

<220>  
 <221> ВАРИАНТ  
 <222> (24) .. (24)  
 <223> заміна

<220>  
 <221> ВАРИАНТ  
 <222> (29) .. (29)  
 <223> заміна

<400> 19



```

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

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

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

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

Gly  Ala  Gly  Glu  Ala  Ala
65      70

```

```

<210> 20
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> BAPIAHT
<222> (22) .. (22)
<223> заміна

```

```

<220>
<221> BAPIAHT
<222> (24) .. (24)
<223> заміна

```

```

<220>
<221> BAPIAHT
<222> (29) .. (29)
<223> заміна

```

```

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

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

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

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

Gly  Ala  Gly  Glu  Ala  Ala
65      70

```

```

<210> 21
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> BAPIAHT
<222> (22) .. (22)
<223> заміна

```

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BAPIAHT

&lt;222&gt; (23) .. (23)

&lt;223&gt; заміна

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BAPIAHT

&lt;222&gt; (29) .. (29)

&lt;223&gt; заміна

&lt;400&gt; 21

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

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 70

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BAPIAHT

&lt;222&gt; (22) .. (22)

&lt;223&gt; заміна

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BAPIAHT

&lt;222&gt; (29) .. (29)

&lt;223&gt; заміна

&lt;400&gt; 22

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

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 70

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

<220>  
 <221> BAPIAHT  
 <222> (23) .. (23)  
 <223> заміна

<220>  
 <221> BAPIAHT  
 <222> (24) .. (24)  
 <223> заміна

<220>  
 <221> BAPIAHT  
 <222> (29) .. (29)  
 <223> заміна

<400> 23  
 Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr  
 1 5 10 15  
 Pro Cys Val Gln Thr Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg His Cys Val  
 20 25 30  
 Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser  
 35 40 45  
 Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala  
 50 55 60  
 Gly Ala Gly Glu Ala Ala  
 65 70

<210> 24  
 <211> 70  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> BAPIAHT  
 <222> (23) .. (23)  
 <223> заміна

<220>  
 <221> BAPIAHT  
 <222> (29) .. (29)  
 <223> заміна  
 <400> 24  
 Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr  
 1 5 10 15  
 Pro Cys Val Gln Ala Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg His Cys Val  
 20 25 30  
 Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser  
 35 40 45  
 Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala  
 50 55 60  
 Gly Ala Gly Glu Ala Ala  
 65 70

<210> 25  
 <211> 70  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> BAPIAHT  
 <222> (29) .. (29)  
 <223> заміна

<400> 25  
 Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr  
 1 5 10 15  
 Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg His Cys Val  
 20 25 30  
 Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser  
 35 40 45  
 Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala  
 50 55 60  
 Gly Ala Gly Glu Ala Ala  
 65 70

<210> 26  
 <211> 70  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> BAPIAHT  
 <222> (22) .. (22)  
 <223> заміна

<220>  
 <221> BAPIAHT  
 <222> (29) .. (29)  
 <223> заміна

<400> 26  
 Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr  
 1 5 10 15  
 Pro Cys Asn Pro Ala Glu Cys Phe Asp Ser Leu Val Arg His Cys Val  
 20 25 30  
 Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser  
 35 40 45  
 Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala  
 50 55 60  
 Gly Ala Gly Glu Ala Ala  
 65 70

<210> 27  
 <211> 70  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BAPIAHT

&lt;222&gt; (22) .. (22)

&lt;223&gt; заміна

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BAPIAHT

&lt;222&gt; (29) .. (29)

&lt;223&gt; заміна

&lt;400&gt; 27

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

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 70

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BAPIAHT

&lt;222&gt; (22) .. (22)

&lt;223&gt; заміна

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BAPIAHT

&lt;222&gt; (23) .. (23)

&lt;223&gt; заміна

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BAPIAHT

&lt;222&gt; (24) .. (24)

&lt;223&gt; заміна

&lt;400&gt; 28

Arg	Arg	Gly	Pro	Arg	Ser	Leu	Arg	Gly	Arg	Asp	Ala	Pro	Ala	Pro	Thr
1				5					10					15	
Pro	Cys	Asn	Gln	Thr	Glu	Cys	Phe	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	His	Cys	Val
			20					25					30		
Ala	Cys	Gly	Leu	Leu	Arg	Thr	Pro	Arg	Pro	Lys	Pro	Ala	Gly	Ala	Ser
		35					40					45			
Ser	Pro	Ala	Pro	Arg	Thr	Ala	Leu	Gln	Pro	Gln	Glu	Ser	Val	Gly	Ala
	50					55					60				

Gly Ala Gly Glu Ala Ala  
65 70

<210> 29

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> BAPIAHT

<222> (22)..(22)

<223> заміна

<220>

<221> BAPIAHT

<222> (24)..(24)

<223> заміна

<400> 29

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

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

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

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

Gly Ala Gly Glu Ala Ala  
65 70

<210> 30

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> BAPIAHT

<222> (22)..(22)

<223> заміна

<220>

<221> BAPIAHT

<222> (23)..(23)

<223> заміна

<400> 30

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

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

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

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

Gly Ala Gly Glu Ala Ala  
65 70

<210> 31

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> BAPIAHT

<222> (23)..(23)

<223> замінна

<400> 31

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

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

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

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

Gly Ala Gly Glu Ala Ala  
65 70

<210> 32

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> BAPIAHT

<222> (22)..(22)

<223> замінна

<400> 32

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

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

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

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

Gly Ala Gly Glu Ala Ala  
65 70

<210> 33

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігонуклеотидний праймер

143

83458

144

<400> 33  
ggccgagtgcc ttcgacctgc t

21

<210> 34  
<211> 21  
<212> днк  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Олігонуклеотидний праймер  
<400> 34  
gggtccgccac tgcgtggcct g

21

<210> 35  
<211> 21  
<212> днк  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Олігонуклеотидний праймер  
<400> 35  
caccsaagacg gccggccctg a

21

<210> 36  
<211> 21  
<212> днк  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Олігонуклеотидний праймер  
<400> 36  
gggcccctac aatctcagct a

21

<210> 37  
<211> 25  
<212> днк  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Олігонуклеотидний праймер  
<400> 37  
ggcggaccag caggtcgaag cactc

25



## Послідовність кДНК-клону JST576

```

1      GCACCATGAG GCGAGGGCCC CGGAGCCTGC GGGGCAGGGA CGCGCCAGCC
51     CCCACGCCCT GCGTCCCGGC CGAGTGCTTC GACCTGCTGG TCCGCCACTG
101    CGTGGCCTGC GGGTCCTGC GCACGCCCGG GCGGAACCG GGTAAAGGGG
151    ACCACCGGGG CGCGCGGCGC CGGCAGCTGC GGGGAGAACG GGGCCCCGAT
201    CGCCAGGGCG CAGGCAGAGC CCCGACCCCC GGGGGCGCGG AGGGCTGAAA
251    GGACCCCTGT GGCAGGGGCT GAGGGGGCCC GCGATCACCG CGTGGCCCTC
301    ACCGCCGCTT CTCTCCCTCC CCTTGTCCAC CGCCCCCGG CTGTCCCTCC
351    CCTCCCGGCG CAGCCTCGCC CCCCTCCGCC COTCCCGGTC CCGCTCCTC
401    CCTCCCTCG GCGCCCTGCG CTCCCTCCCT GTCCCTCCCG GAAGCAGCGG
451    GGGCCAGCAG CCTGCGGCC AGGACGGCGC TGCAGCGCA GAGTGGGTG
501    GCGCGGGGG CGGCGAGGC GCGCTGCCC CTGCCCGGG TGCTCTTTG
551    CGCCCCCGG CTGCTGGGCC TGGCACTGCT CTTGGCGCTG GTCTGTGGT
601    GTCTGGTGAG CTGAGGCGG CGACAGCGGC GGCTTCCGG CGCTCCTCC
651    GCAGAGGCC CCGACGAGA CAAGGACGCC CCAGAGCCCC TGGACAAGGT
701    CATCATCTG TCTCCGGAA TCTCTGATG CACAGCTCCT GCTTGGCCTC
751    CTCTGGGGA AGACCCAGG ACCACCCAC CTGGCCACAG TGTCCCTGTG
801    CCAGCCACAG AGCTGGGCT CACTGAAGT GTGACCAACA AGACGGCCGG
851    CCTGAGCAA CAATAGCAG GAGCCGGCAG GAGGTGGCCC CTGCCCTCCC
901    TCTGGACCCC CAGCCAGGG CTTGGAATC AAATTGAGT CTTACTCCA
951    GCATGCACAT GCCCTCTTC TGGGACCAAG CTAACCTGC AGAAGCACAG
1001   ACACTACAGA CCACAGCATT CAGCCCCAT GGAGTTTGT GTGCTTGCTT
1051   TTGGCTTCAG AACTCAACAT CTTGACAGC CTTGAAGGT GTAGCCCAAG
1101   CTCTGTTC TGTGCTTCA AAAGGCTGG GCACTATGAG TAAAAGACCG
1151   CTTTTAAAT GGGGAAGCA CCATTAAGCC AAAATGAATC TGA AAAAAGA
1201   C

```

Фиг. 1A

## Послідовність EST AI250289

```

1      GTGACCCAC GCGTCCGCC ACGGTCCGG TGGGCGGGG TGGGACCAT
51     GAGGCGAGGG CCCCGAGGCC TGGGGGCGG GACGCGCCA GCGCCACGC
101    CTTGCGTCCC GCGCGAGTGC TTGACCTGC TGGTCCGCA CTGCGTGGC
151    TGGGGGCTCC TGGCGACGCC GCGGCCGAAA CCGGTAAGG GGGACCCAG
201    GGGCGCGCG CGCCGCGAGC TGGGGGAGA ACGGGGCCC GATCGCCAG
251    GCGCAGGCAG AGCCCCGACC CCCGGGGCG CCGAGGGCTG AAAGGACCTT
301    GTGGGCAGGG CTTGAGGGG CCCGCGATCA CCGCTGGCC CTCACCGCG
351    CCTCTCTCCC TCCCTTGTG CACCGCCCC CGGCTGTCCC TCCCTCCCC
401    GGCCAGCCTC GCGCCCCCTC GCGCTCCCC GTCCCGGCTC CTCCCTCCCC
451    TCGGCCCCCT GGCCTCCCTC CTTGTCCCT CCCGAAGCAG CCGGGGCCAG
501    CAGCCCTGCG CCCAGGACGG CGCTGCAGCC GCAGGAGTCG GTGGGCGCG
551    GGGCCGCGA GCGGCGCTG CCCCTGCCG GGTGCTCTT TGGCGCCCC
601    GCGCTGCTGG GCCTGGCACT GTCTCTGGG CTGGTCTGG TGGTCTGGT
651    GAGCTGGAGG CGCGGACAGC GCGGCTTCG CGCGCGTCC TCCGCAAGG
701    CCCCAGACGG AGACAAGGAC GCCCAGAGC CCTGGACAA GGTCAATCAT
751    CTGTCTCCG GAATCTCTGA TGCCACAGCT CTTGCTGGC CTCTCTCTG
801    GGAAGACCA GGAACCAACC CACTGGCCA CAGTGTCCCT GTGCGAGCA
851    CAGAGCTGG CTCCACTGAA CTGGTGACCA CCAAGACGG CCGCCCTGAG
901    CAACAATAGC AGGGAGCCG CAGGAGTGG CCCCTGCCCT CCTCTGGAC
951    CCCAGCCAG GGGCTTGGAA ATCAAATCA GCTCTTCACT CC

```

Фиг. 1B

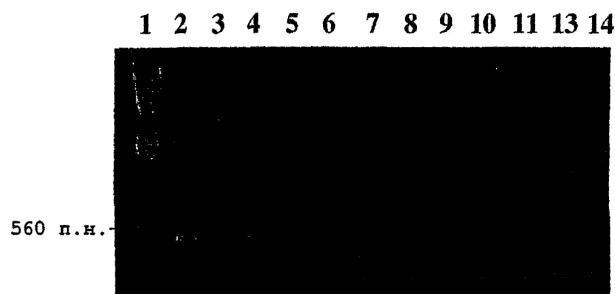
Послідовність JST576, передбачена GENSCAN

```

1   GCGCGCGCCG ACCATGAGGC GAGGGCCCCG GAGCCTGCGG GGCAGGGACG
51  CGCCAGCCCC CACGCCCTGC GTCCCGGCCG AGTGCTTCGA CCGCTGGTC
101 CGCCACTGCG TGGCCTGCGG GCTCCTGCGC ACGCCGCGGC CGAAACCGGC
151 AGCCGGGGCC AGCAGCCCTG CGCCAGGAC GGCCTGCGAG CCGCAGGAGT
201 CCGTGGGCGC GGGGGCCGCG GAGGCGGCGC TGCCCTTGCC CGGGCTGCTC
251 TTTGGCGCCC CCGCGCTGCT GGGCCTGGCA CTGGTCCTGG CGCTGGTCCT
301 GGTGGGTCTG GTGAGCTGGA GCGGCGGACA GCGGCGGCTT CGCGGCGCGT
351 CCTCCGCAGA GGCCCCCGAC GGAGACAAGG ACGCCCCAGA GCCCCTGGAC
401 AAGGTCATCA TTCTGTCTCC GGAATCTCT GATGCCACAG CTCCTGCCTG
451 GCCTCCTCCT GGGGAAGACC CAGGAACCAC CCCACCTGGC CACAGTGTCC
501 CTGTGCCAGC CACAGAGCTG GGCTCCACTG AACTGGTGAC CACCAAGACG
551 GCGGGCCCTG AGCAACAATA GCAGGGAGCC GGCAGGAGGT GGCCCTGCC
601 CTCCCTCTGG ACCCCAGCC AGGGGCTTGG AAATCAAATT CAGCTCTTCA
651 CTCCAGCATG CACATGCCCT CTTTCTGGGA CCAGGCTAAC CCTGCAGAAG
701 CACAGACACT ACAGACCACA GCATTGAGCC CCCATGGAGT TTGGTGTGCT
751 TGCCTTTGGC TTCAGACCTC ACCATCTTTG ACAGCCCTTG AAGGTGGTAG
801 CCCAGTCCT GTTCCTGTGC CTTCAAAGG CTGGGGCACT ATGAGTAAAA
851 GACCGCTTTT AAAATGGGA AGGCACCATT AAGCCAAAT GAATCTGAAA
901 AAAGAC

```

Фір. 2A



Фір. 2B

## Послідовність JST576 без інтрону

```

1   GCGCGCGCGC ACCATGAGGC GAGGGCCCCG GAGCCTGCGG GGCAGGGAAG
51  CGCCAGCCCC CACGCCCTGC GTCCCGGCGC AGTGCTTCGA CTTGCTGGTC
101 CGCCACTGCG TGGCCTGCGG GCTCCTGCGC ACGCCGCGGC CGAAACCGGC
151 CGGGGCCAGC AGCCCTGCGC CCAGGACGGC GCTGCAGCCG CAGGAGTCGG
201 TGGGCGCGGG GGCCGCGGAG GCGGCGCTGC CCCTGCCCCG GCTGCTCTTT
251 GGGCGCCCCG CGCTGCTGGG CCTGGCACTG GTCCTGGCGC TGGTCCTGGT
301 GGGTCTGGTG AGCTGGAGGC GGCACAGCG GCGGCTTCGC GGCAGTCCTT
351 CCGCAGAGGC CCCCAGCGGA GACAAGGACG CCCCAGAGCC CCTGGACAAG
401 GTCATCATTC TGTCTCGGG AATCTCTGAT GCCACAGCTC CTGCCTGGCC
451 TCCTCCTGGG GAAGACCCAG GAACCACCCC ACCTGGCCAC AGTGTCCCTG
501 TGCCAGCCAC AGAGCTGGGC TCCACTGAAC TGGTGACCAC CAAGACGGCC
551 GGCCCTGAGC AACAATAGCA GGGAGCCGGC AGGAGGTGGC CCCTGCCCTC
601 CCTCTGGACC CCCAGCCAGG GGCTTGAAA TCAAATTCAG CTCTTCACTC
651 CAGCATGCAC ATGCCCTCTT TCTGGGACCA GGCTAACCTT GCAGAAGCAC
701 AGACACTACA GACCACAGCA TTCAGCCCCC ATGGAGTTTG GTGTGCTTGC
751 CTTTGGCTTC AGACCTCACC ATCTTTGACA GCCCTTGAAG GTGGTAGCCC
801 AGCTCCTGTT CTTGTGCCTT CAAAAGGCTG GGGCACTATG AGTAAAGAC
851 CGCTTTTAAA ATGGGGAAGG CACCATTAAG CCAAATGAA TCTGAAAAAA
901 GAC

```

## Фіг. 2C

Амінокислотна послідовність BAFF-R людини

```

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

```

## Фіг. 2D

```

GGGCGCCTAC AATCTCAGCT ACTCGGGAGG CTGAGGCAGA GAATTGTTTG AACCCGGGAG
                                     * T R E

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

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

CCAGCAGGCG GGGCGGGG AGGCGAGGT GCTCCCCCG CCCCCGCTT CCTCCCCGAG
P A G G G G A G Q S A P P A P R F L P E

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

AGGCGAGGGC CCCGAGCCT GCGGGGCAGG GACGCGCCAG CCCCCACGCC CTGCGTCCCC
R R G P R S L R G R D A P A P T P C V P

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

CGGCCGAAAC CGGCCGGGCG CAGCAGCCCT GCGCCAGGA CGGCGCTGCA GCCGAGGAG
R P K P A G A S S F A P R T A L Q P Q E

TCGGTGGGCG CGGGGCGCG CGAGGCGGCG CTGCCCTGCG CCGGGCTGCT CTTTGGCGCC
S V G A G A G E A A L P L P G L L F G A

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

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

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

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

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

GAGCAACAAT AGCAGGGAGC CGGCAGGAGG TGGCCCTGCG CCTCCCTCTG GACCCCGAGC
E Q Q *

CAGGGGCTTG GAAATCAAAT TCAGCTCTTC ACTCCAGCAT GCACATGCCG TCTTTCTGGG
ACCAAGGTAA CCTGCGAGAA GCACAGACAC TACAGACCAC AGCATTCAGC CCCCATGGAG
TTTGGTGTGC TTGCCTTTGG CTTTCAGACCT CACCATCTTT GACAGCCCTT GAAGGTGGTA
GCCCAGCTCC TGTTCTCTGT CCTTCAAAAG GCTGGGGCAC TATGAGTAAA AGACCGCTTT
TAAATGGGG AAGGCACCAT TAAGCCAAA TGAATCTGAA AAAAGAC

```

## Послідовність мишачого BAFF-R

```

1   GAATTCGGCA CGAGCCGAGA CTCGGAAGTG TCCAGAGCTGC ATGAGGCGGC
51  GACATGGGCG CCAGGAGACT CCGGGTCCGA AGCCAGAGGA GCCGGGACAG
101 CTGGGTGCCC ACCCAGTGCA ATCAGACCGA GTGCTTCGAC CCTCTGGTGA
151 GAAACTGCGT GTCCTGTGAG CTCTCCACA CGCCGGACAC TGGACATACA
201 AGCAGCCTGG AGCCTGGGAC AGCTCTGCAG CCTCAGGAGG GCTCCGCGCT
251 GAGACCCGAC GTGGCGCTGC TCGTCGGTGC CCCCGCACTC CTGGGACTGA
301 TACTGGCGCT GACCTGGTG GGTCTAGTGA GTCTGGTGA CTGGAGGTGG
351 CGTCAACAGC TCAGGACGGC CTCCCAGAC ACTTCAGAAG GAGTCCAGCA
401 AGAGTCCCTG GAAATGTCT TTGTACCCTC CTCAGAAACC CCTCATGCTT
451 CAGCTCCTAC TTGGCCTCCG CTCAAAGAAG ATGCAGACAG CGCCCTGCCA
501 CGCCACAGCG TCCCGGTGCC CGCCACAGAA CTGGGCTCCA CCGAGCTGGT
551 GACCACCAAG ACAGCTGGCC CAGAGCAATA GCAGCAGTGG AGGCTGGAAC
601 CCAGGGATCT TACTGGGCT TGTGGACTTC ACCCAACAGC TTGGGAAAGA
651 ACTTGGCCCT TCAGTGACGG AGTCCTTTGC CTGGGGGGCG AACCCGGCAG
701 AACCAGACAC TACAGGCCAC ATGAGATTGC TTTTGTGTTA GCTCTTGACT
751 TGAGAACGTT CCATTTCTGA GATGGTTTTT AAGCCTGTGT GCCTTCAGAT
801 GGTTGGATAG ACTTGAGGGT TGCATATTTA ATCTCTGTAG TGAGTCGGAG
851 ACTGGAAGCT TAATCTCGTT CTAAAAATTT TGGATTACTG GGCTGGAGGT
901 ATGGCTCAGC AGTTCGGTTT GTGTGCTGTT CTAGCCGAGG ACTCCAGTTG
951 TTCAGCTTCC CGGAAGTCAG ATCTGGCAGC TTAAGACCAC CTGTCACTCC
1001 AGCCCCTGGA ACATCCTTGC CTCCAAAGGC ACCAGCACTC ATTTGCTCTA
1051 GAGCACACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACACACAT
1101 ATGCATGCAT GCACACTTAA AAATGTCAAA ATTAGCGGCT GGAGAAATTC
1151 ATGGTCAACA GCGCTTACTG TGATTCCAGA GGATGAGAGT TTGATTCCCA
1201 GAATGCACCTG CCGGTGGCTC ATTACTGAGC ATAACCTTTG CTTCAGGGGA
1251 CCTGATGCCT CTGGAATTCA TGGGCATCTG TATTCACGTG CACATCCTAC
1301 ACACACACAC ACACACACAC ACAGACATAC ACACACACAC ACTCTTTTAC
1351 AAATGATAAA ATATAAGATA GGCATGGTGG TACACACCTT TAATCCCAAC
1401 ATTGGGGAAG CAAAGGCAGG CAGGTAACTG AGTTGGAGGC CATCCTGGTC
1451 TACATAGCAA GTTCCAGGCT AACCAGAGCT AAATGGTGAG ACCAAGTCTC
1501 AAAATAATAC TCCCCCCCCA AAAAAAAAAA ACTTTTAAAT TTTGATTTTT
1551 TTCTTTTATT ATTATTTTTT ATATTAAATT CATGGTGTGT AGAAGTGGTA
1601 TACTTAGATG GTGACTAAGA GGAGGTAAAG CCATCAGGAC TGAGCCCTTA
1651 ACATACAAGG AGAAAGCAGA GACAATGAAC ACGCCCCCTC CTGCTGTGT
1701 GCCAGCTCTG GACCACCAGC CAGAGGGCAA TCATCAGATG TGGGCCCTAG
1751 AACCTTCAGA GCCGAAAGCT AAATCAATCT CATTTCTTTG TAAAGCTATT
1801 TAGCCCTTAGG TGTTTTGTTA CGGTGATATA AAATGGACTA ACACAGGCAC
1851 TATGAGTAAG AAGCTTTTCT TTGAGCTGGG AAAGGTACTG TTAACCCAA
1901 AITAATCTGA ATAAAAAAG GCTAAGGGGA AGACACTTAA AAA

```

Фіг. 4А

Амінокислотна послідовність мишачого BAFF-R

```

MGARRLRVRSQRSRDSSVPTQCNQTECFDPLVRNCVSCEL
FHTPDTGHTSSLEPGTALQPQEGSALRPD VALLVGAPALLG
LILALTLVG LVSLVSW RWRQQLRTASPDTSEGVQQESLEN
VFVPSSETPHASAPTWPLKEDADSALPRHSVPVPATELGS
TELVTTKTAGPEQ

```

Фіг. 4В

```

          10      20      30      40      50
hBAFFR    M-RR-GPRSLRGRDAPAPTPCVPAECFDLLVRHCVACGLLRTPRFPKAPAGASSPAPRTAL
          ||  ||  ||:|:|: ||  ||:| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
mBAFFR    MGARRLRVRSQQRSDSSVPTQCNQTECFDPLVRNCVSCELFHTP--DTGHTSSLEPGTAL
          10      20      30      40      50

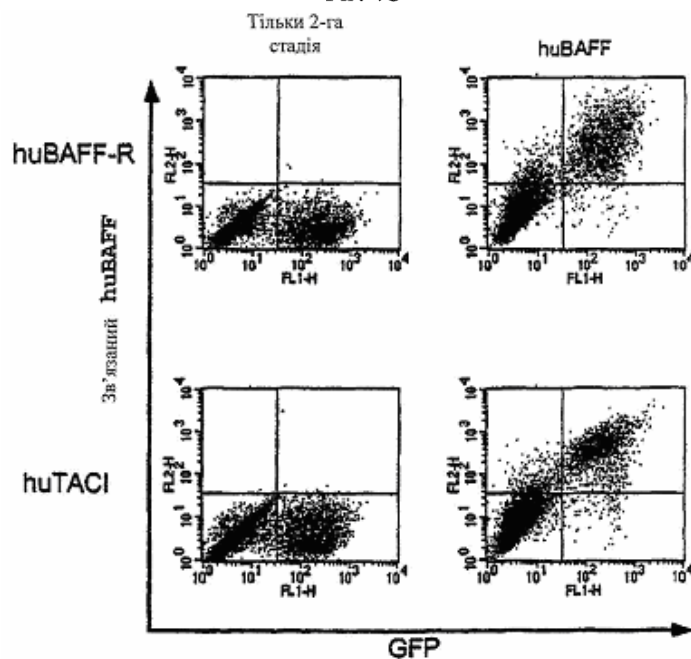
          60      70      80      90      100     110
hBAFFR    QPQESVGAGAGEAALPLPGLLFGAPALLGLALVLALV-LVGLVSWRRRQRRLRGASSAEA
          ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
mBAFFR    QPQE-----GSALRPDVALLVGAPALLGLILALTIVGLVSLVSWRRRQ--LRTAS----
          60      70      80      90      100

          120     130     140     150     160     170
hBAFFR    PDGDKDAP-EPLDKVILLSPGISDATAPAWPPPGEDPGTTPPGHVSVPVPATELGSTELVT
          || : : | | : : : | | : | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
mBAFFR    PDTSEGVQOESLENVFPSSSETPHASAPTWPPLKEDADGALPRHSVPVPATELGSTELVT
          110     120     130     140     150     160

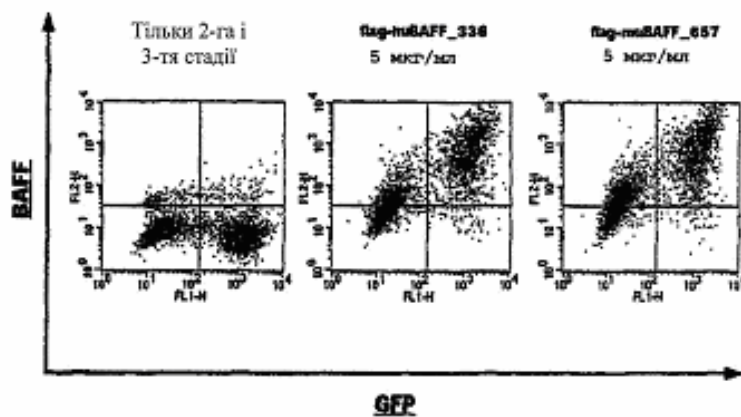
          180
hBAFFR    TKTAGFEQQ
          ||| | | | |
mBAFFR    TKTAGPEQ
          170

```

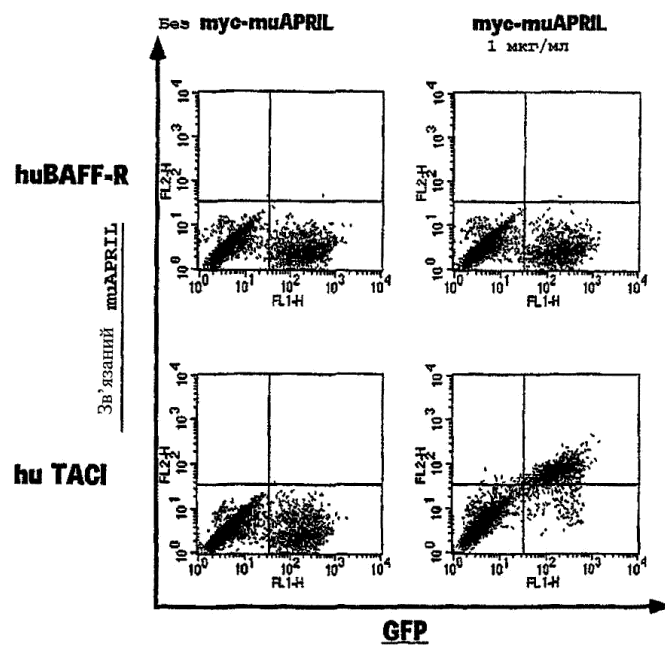
Фиг. 4С



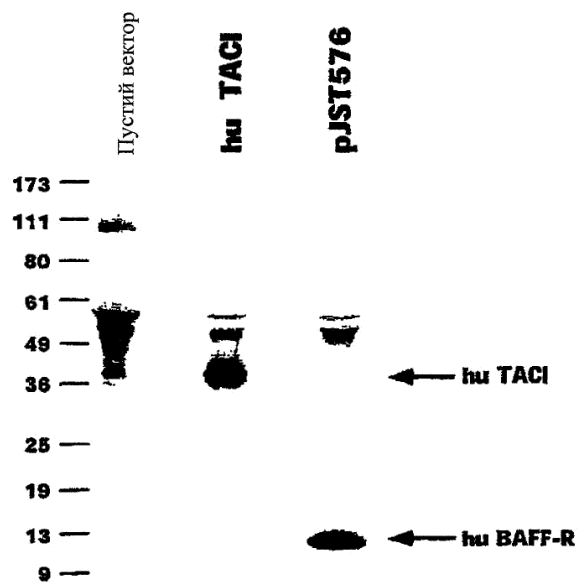
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



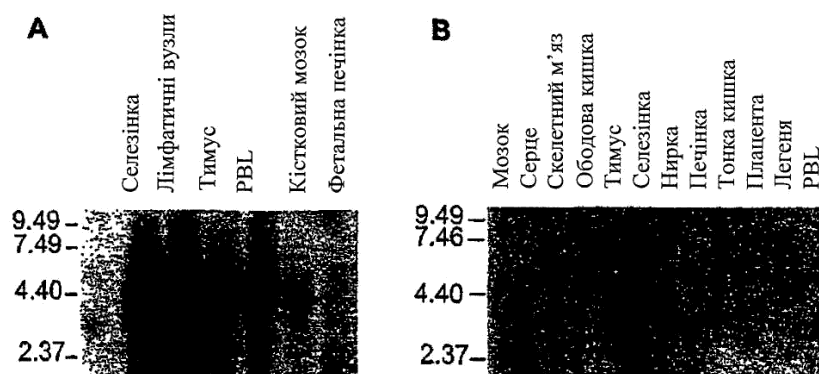
Фиг. 8

```

1  ATGGAGACAGACACTCCTGTTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGT
   M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
61  GACGTCAGGCGAGGGCCCCCGGAGCCTGCGGGGCGAGGACGCGCCAGCCCCCAGGCCCTGC
   D V R R G P R S L R G R D A P A P T P C
121 GTCCCGGCGGAGTGCTTCGACCTGCTGGTCCGCCACTGCGTGGCCTGCGGGCTCCTGCGC
   V P A E C F D L L V R H C V A C G L L R
181 ACGCCGCGGCGGAAACCGGCGGGGCCAGCAGCCCTGCGCCAGGACGCGCTGCAGCCG
   T P R F K P A G A S S P A P R T A L Q P
241 .CAGGAGTCGGTGGGCGCGGGGCCGGCGAGGCGGCGGTCGACAAACTCACATGCCCA
   Q E S V G A G A G E A A V D K T H T C P
301 CCGTCCCCAGCACCTGAATCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCC
   P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P
361 AAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGACGTGAGC
   K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S
421 CACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATATGCC
   H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A
481 AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCACC
   K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T
541 GTCCTGCACCCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC
   V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A
601 CTCCAGCCCCCATCGAGAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAG
   L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q
661 GTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTCAAGCTGACCTGCG
   V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C
721 CTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG
   L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P
781 GAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTAC
   E N N Y K T T P P V L D S D G S F P L Y
841 AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG
   S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V
901 ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGAAA
   M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K
961 TGA
   •

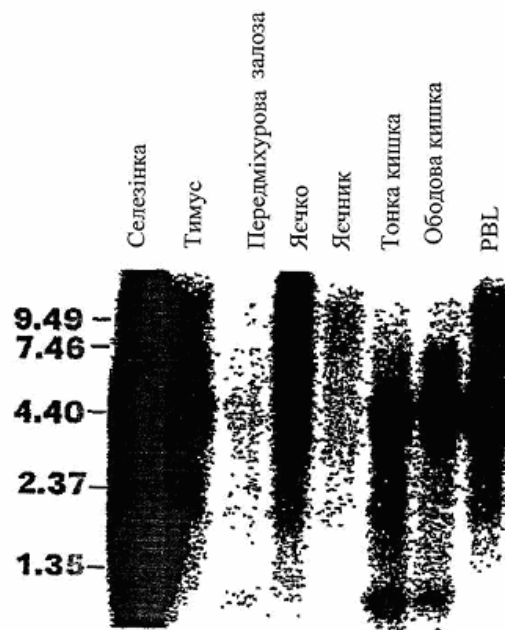
```

Фиг. 9

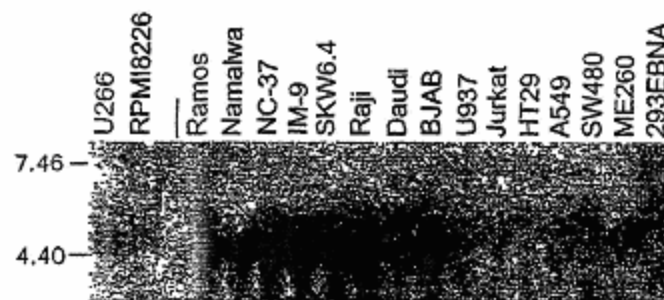


Фиг. 10

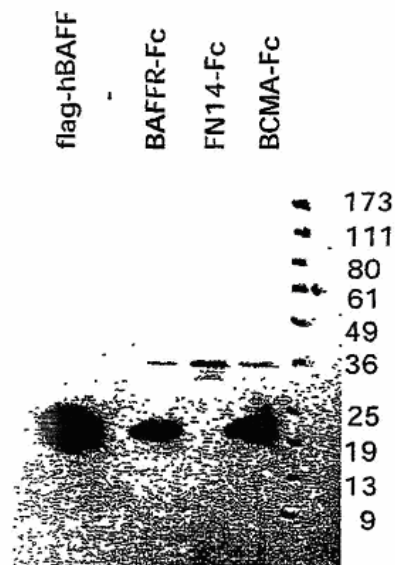




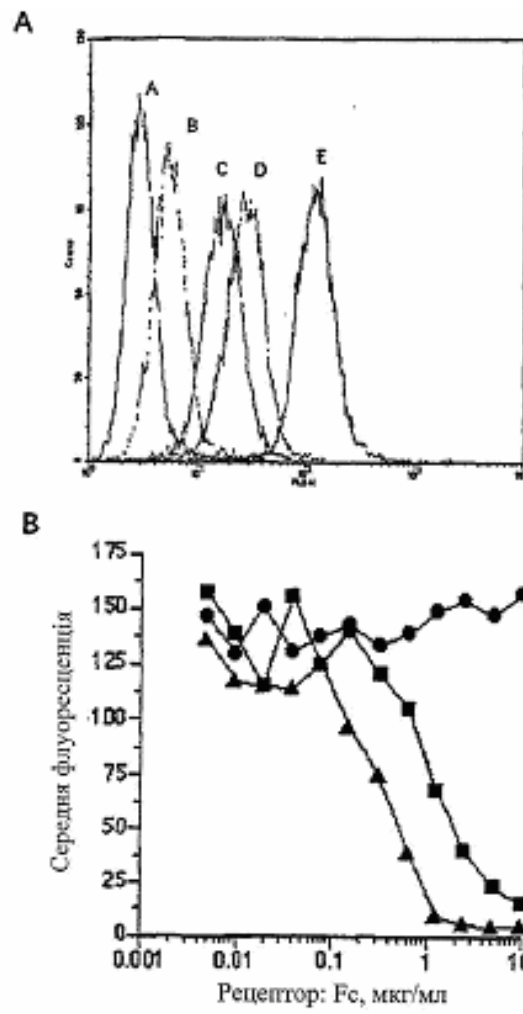
Фиг. 10C



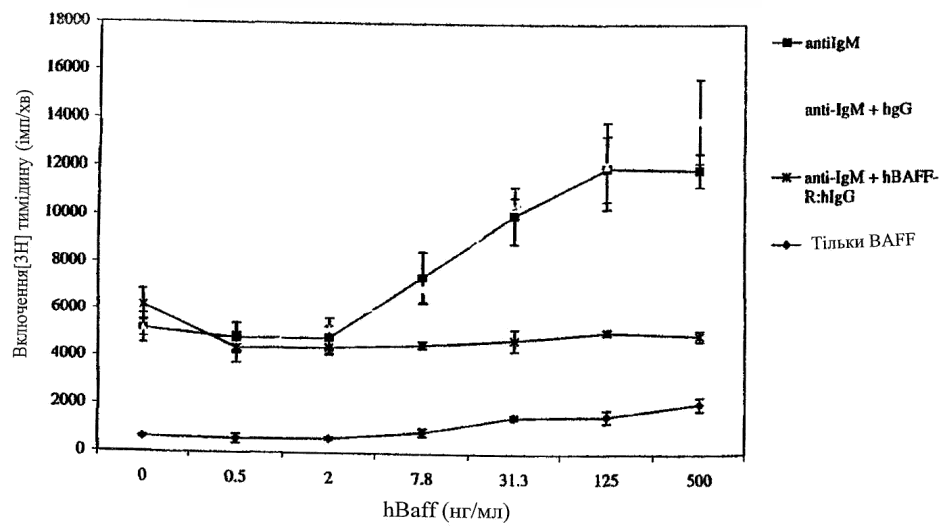
Фиг. 11



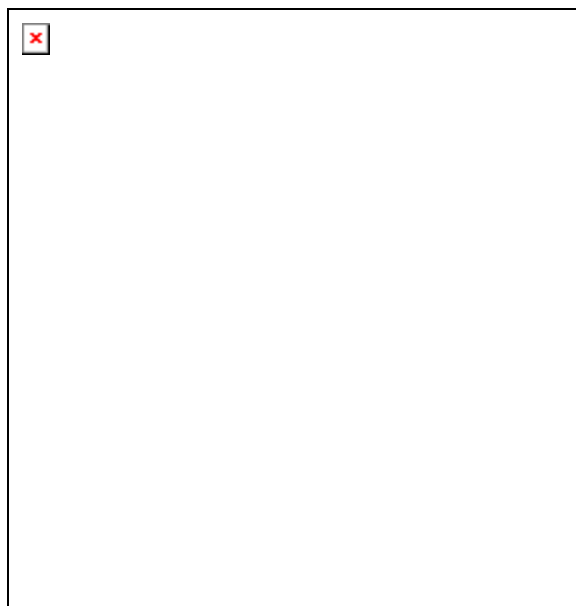
Фиг. 12



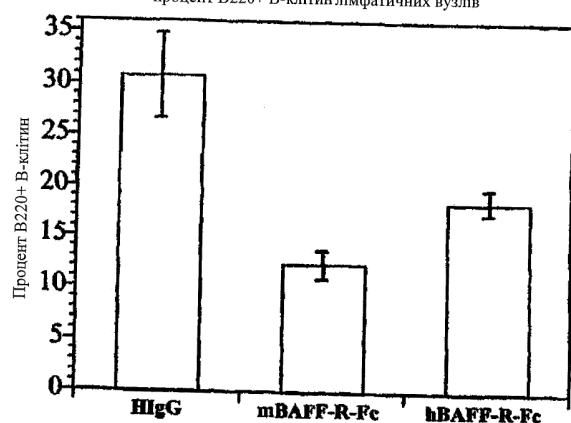
Фиг. 13



Фиг. 14

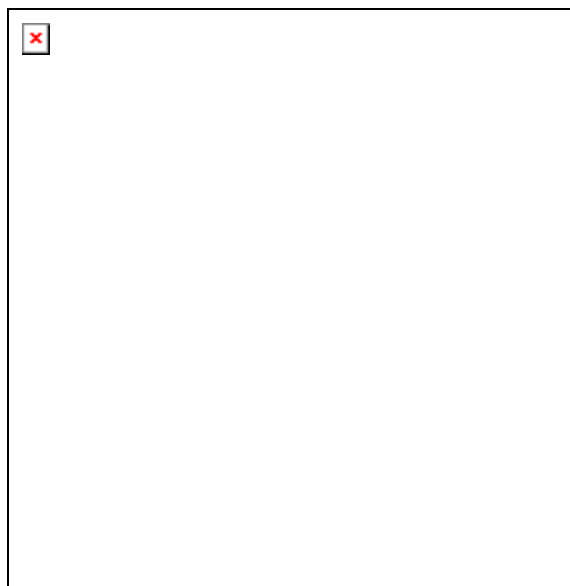


Лікування людським і мишачим BAFF-R-Fc зменшує процент B220+ В-клітин лімфатичних вузлів

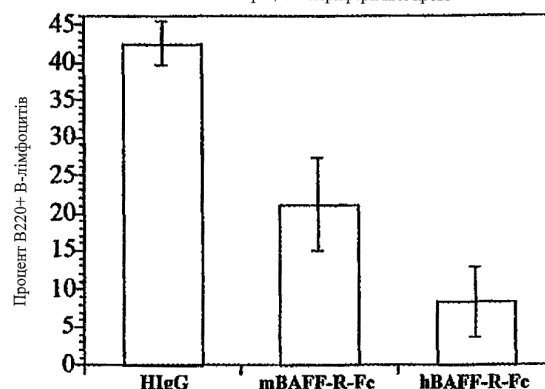


Миші одержували 200 мкг HIgG, mBAFF-R-Fc або hBAFF-R-Fc в дні 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22 до 25. Мишей етанізували в день 28, лімфатичні вузли (LN) витягували і аналізували на B220+ В-клітини

Fig. 17



Результати лікування BAFF-R-Fc в зменшенні B220+ В-лімфоцитів периферичної крові



Миші одержували 200 мкг HIgG, mBAFF-R-Fc або hBAFF-R-Fc в дні 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22 і 25. Периферичну кров брали перед умертвленням в день 28 і визначали процент 220+ В-лімфоцитів.

Fig. 18

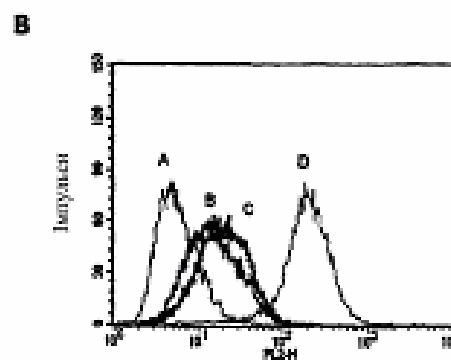
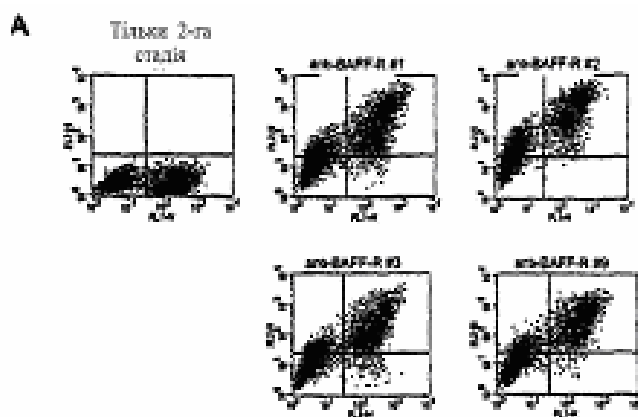
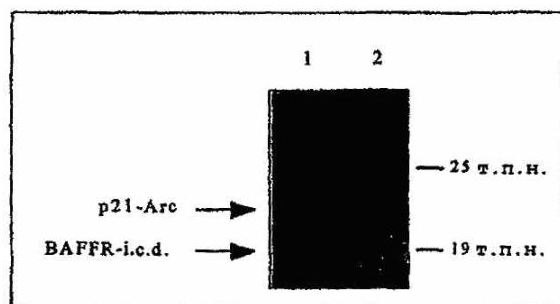


Fig. 19

	10	20	30	40	50	60	70	% аіраіаііі
hBAFFR	--RR-GPRSLRGRDAPAPTFCVPAECFDLLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA							90
mBAFFR	GARRLRVRSQRSRDSVPTQCNQTECFDPLVRNCVSCLELHTP-DTGHTSLEPGTALQPQE-----GSAL							10
JST659	GARRLRVRSQRSRDSVPTQCNQTECFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA							90
JST660	GARRLRVRSQRSRDSVPTQCNQTECFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA							90
JST661	GARRLRVRSQRSRDSVPTQCNQTECFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA							10
JST662	GARRLRVRSQRSRDSVPTQCNQTECFDPLVRNCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA							10
JST663	--RR-GPRSLRGRDAPAPTFCNTECFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA							10
JST673	--RR-GPRSLRGRDAPAPTFCNTECFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA							10
JST674	--RR-GPRSLRGRDAPAPTFCNTECFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA							10
JST675	--RR-GPRSLRGRDAPAPTFCNTECFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA							10
JST672	--RR-GPRSLRGRDAPAPTFCNTECFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA							35
JST676	--RR-GPRSLRGRDAPAPTFCVQAEFCFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA							35
JST671	--RR-GPRSLRGRDAPAPTFCVPAECFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA							60
JST677	--RR-GPRSLRGRDAPAPTFCNPAECFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA							60
JST678	--RR-GPRSLRGRDAPAPTFCNPAECFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA							60
JST664	--RR-GPRSLRGRDAPAPTFCNTECFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA							90
JST668	--RR-GPRSLRGRDAPAPTFCNTECFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA							90
JST665	--RR-GPRSLRGRDAPAPTFCNPAECFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA							90
JST666	--RR-GPRSLRGRDAPAPTFCVQAEFCFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA							90
JST667	--RR-GPRSLRGRDAPAPTFCNPAECFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAA							90

Фіг. 20



Фіг. 21