



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 74798

(13) C2

(51) МПК (2006)

A61K 38/17

A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ РАКУ У ССАВЦЯ ЗА ДОПОМОГОЮ ПОЛІПЕПТИДУ, ЩО ПРОТИДІЄ ВЗАЄМОДІЇ
APRIL З ЙОГО РЕЦЕПТОРАМИ

1

2

(21) 2002053779

(22) 05.10.2000

(24) 15.02.2006

(86) PCT/US00/27579, 05.10.2000

(31) 60/157,933

(32) 06.10.1999

(33) US

(31) 60/181,807

(32) 11.02.2000

(33) US

(31) 60/215,688

(32) 30.06.2000

(33) US

(46) 30.01.2006, Бюл. № 2, 2006 р.

(72) Шнайдер Паскаль, СН, Томпсон Джеффрі, US, Качеро Тереза, US, Амброуз Крістін, US, Реннерт Пол, US

(73) БАЙОДЖЕН АЙДЕК МА ІНК., US, АПОТЕК Р ЕНД Д, С.А., СН

(56) WO, A, 99/12965, 18.03.1999

WO, A, 00/40716, 13.07.2000

HANNE M. et al.: "APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth", JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, 1998, vol. 188, pages 1185-1190

CHRISTINE MADRY et al.: "The characterization of murine BCMA gene defines it as a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily", INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, 1998, vol. 10, no. 11, pages 1693-1702

(57) 1. Спосіб лікування раку у ссавця, де ракові клітини експресують ліганд, який індукує проліферацію (APRIL), при цьому вказаний спосіб включає введення вказаному ссавцеві терапевтично ефектвної кількості композиції, що містить щонайменше один із наступних компонентів:

а) поліпептид, що має амінокислотну послідовність, ідентичну щонайменше на 80 % з послідовністю, яка представлена амінокислотами 1-184 в SEQ ID NO:8, при цьому поліпептид здатний зв'язуватися з APRIL;

b) поліпептид, що має амінокислотну послідовність, ідентичну щонайменше на 80 % з послідовністю, яка представлена амінокислотами 1-52 в SEQ ID NO:8, при цьому поліпептид здатний зв'язуватися з APRIL;

с) поліпептид, що має амінокислотну послідовність, яка представлена амінокислотами 8-41 в SEQ ID NO:8, при цьому поліпептид здатний зв'язуватися з APRIL;

d) антитіло, направлене проти SEQ ID NO:8.

2. Спосіб за п. 1, в якому поліпептид, визначений в а), b) або с), додатково містить сигнальну послідовність секретованого білка.

3. Спосіб за п. 1, в якому поліпептид, визначений в а), b) або с), додатково містить Fc-домен імуноглобуліну.

4. Спосіб за п. 3, в якому імуноглобулін являє собою IgG.

5. Спосіб за п. 4, в якому імуноглобулін являє собою імуноглобулін людини.

6. Спосіб за п. 5, в якому поліпептид містить послідовність SEQ ID NO:12.

7. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, в якому ракові клітини являють собою карциному.

8. Спосіб за п. 7, в якому карцинома вибрана з групи, що складається з карциноми легені, карциноми ободової кишки, карциноми простати та карциноми молочної залози.

9. Спосіб за будь-яким з пп. 1-8, в якому ссавець є людиною.

Даний винахід в основному відноситься до способів лікування ракового захворювання. Способи включають введення деяких антагоністів фактора некрозу пухлин (TNF).

Члени сімейства фактора некрозу пухлин (TNF), що відносяться до цитокінів, беруть участь у кількості ключових біологічних функцій, що пос-

тійно збільшується. Кожний член сімейства TNF діє при зв'язуванні з одним або більше членами відповідного сімейства рецепторних білків. У свою чергу дані рецептори передають сигнали внутрішньоклітинно для індукції широкого ряду фізіологічних або реакцій у відповідь, що відносяться до розвитку. Багато рецепторних сигналів впливають

(13) C2
(11) 74798
(19) UA

на долю клітин і часто «запускають» кінцеву диференціацію. Приклади клітинної диференціації включають проліферацію, дозрівання, міграцію і загибель.

Члени сімейства TNF представляють пов'язані з мембраною білки типу II, що мають короткий внутрішньоклітинний N-кінцевий домен, трансмембранний домен і C-кінцеві зв'язуючі рецептор домени, які лежать на зовнішній клітинній поверхні. У деяких випадках позаклітинна ділянка білка відщеплюється, створюючи секретовану форму цитокіну. Незважаючи на те, що пов'язані з мембраною білки діють локально, ймовірно, через опосередковану клітинами контактну взаємодію з їх рецепторами, секретовані форми володіють потенційною можливістю циркулювати або дифундувати, отже, можуть діяти на віддаленні. Як пов'язані з мембраною, так і секретовані форми знаходяться у вигляді тримерів, і вважають, що вони передають свій сигнал рецепторам, сприяючи утворенню рецепторних кластерів.

Сімейство рецепторних білків TNF характеризується наявністю одного і більше багатих цистеїном доменів. Кожний багатий цистеїном домен утворює пов'язану через дисульфідний зв'язок ядерний домен, який бере участь у створенні тріохмірної структури, яка утворює зв'язуючу ліганд «кишеню». Рецептори є пов'язаними з мембраною білками типу I, в яких позаклітинний домен кодується N-кінцем, потім трансмембранним доменом і C-кінцевим внутрішньоклітинним доменом. Внутрішньоклітинний домен відповідальний за передачу сигналу рецептором. Деякі рецептори включають внутрішньоклітинний «домен загибелі», який може передавати клітинам сигнал про апоптоз, і вони можуть являти собою ефективні індуктори загибелі клітин. Інша група рецепторів може в слабкій мірі індукувати загибель; виявляється, що вони втрачають «домен загибелі». Третя група рецепторів не індукє загибель клітин. Всі групи рецепторів можуть передавати сигнали про проліферацію або диференціацію клітин замість загибелі, в залежності від типу клітин або наявності інших сигналів.

Добре вивченим прикладом плюрипотентної природи активності сімейства TNF є номінантний член, TNF. TNF може існувати у вигляді пов'язаного з мембраною цитокіну або може бути відщеплений і секретований. Обидві форми зв'язуються з двома TNF-рецепторами, TNF-R55 і TNF-R75. Спочатку описаний за його здатністю безпосередньо вбивати пухлинні клітини, TNF також регулює велику множину імунних процесів, включаючи індукцію гострих запальних реакцій, а також підтримку гомеостазу в лімфоїдних тканинах. Внаслідок того, що даний цитокін може грати подвійну роль в різних патологічних процесах, були розроблені агоністи і антагоністи як модифікатори захворювання. Наприклад, TNF і $LT\alpha$ (який також передає сигнали через TNF-рецептори) використали для лікування ракових захворювань, особливо з периферичною локалізацією, таких, як лімбічна саркома. При даному процесі безпосередня передача сигналів цитокінами через рецептор індукє загибель пухлинних клітин [Aggarwal and Natarajan, 1996. Eur Cytokine Netw 7:93-124].

У імунологічних процесах агенти, які блокують передачу сигналів через TNF-рецептори (наприклад, анти-TNF-mAb, розчинні злиті TNF-R-білки), використали для лікування захворювань, подібних ревматоїдному артриті і запальному захворюванню кишечника. При цих патологіях TNF діє, індукуючи клітинну проліферацію і ефекторну функцію, загострюючи тим самим аутоімунне захворювання, і в цьому процесі блокування зв'язування TNF з його рецептором(ами) має терапевтичну користь [Beutler, 1999. J. Rheumatol 26 Suppl. 57:16-21].

Виявилося, що відкрита нещодавно система ліганд/рецептор піддається аналогічній регуляції. Лімфотоксин-бета ($LT\beta$), член сімейства TNF, який утворює гетеродимери з $LT\alpha$, зв'язується з $LT\beta$ -R. Деякі пухлинні клітини аденокарциноми, які експресують $LT\beta$ -R, можуть загинути або зазнати диференціації при обробці агоністичними анти- $LT\beta$ -R-mAb [Browning et al., 1996. J. Exp. Med. 183:867-878]. Було показано в імунологічних процесах, що анти- $LT\beta$ -mAb або розчинний злитий $LT\beta$ -R-Ig-білок може блокувати розвиток запальних захворювань кишечника, можливо, діючи на взаємодію дендритних клітин і Т-клітин [Maskey et al., 1998. Gastroenterology 115:1464-1475].

Система TRAIL також має потенційну можливість застосування як протипухлинної терапії. TRAIL взаємодіє з рядом пов'язаних з мембраною і розчинних рецепторів. Два з цих рецепторів, TRAIL-R1 і TRAIL-R2 (також названі DR4 і DR5) передають загибель, індукуючи сигнали пухлинним клітинам, але не нормальним клітинам, які експресують додаткові TRAIL-рецептори, які не індукують загибель. Вважають, що ці додаткові рецептори функціонують як пастки. Застосування розчинного TRAIL для знищення пухлинних клітин засноване на виборчій експресії рецепторів-пасток в нормальній, але не пухлинній тканині [Gura, 1997. Science 277:768].

Пухлинні клітини самі по собі часто експресують різні рецептори-пастки, які блокують імунне розпізнавання або ефекторні функції. Дійсно, деякі пухлини гіперекспресують рецептори-пастки TRAIL, ймовірно, для того, щоб уникнути опосередкованої TRAIL загибелі [Sheikh et al., 1999. Oncogene 18:4153-4159]. Це обмежує застосовність TRAIL як протипухлинного агента при деяких процесах. Подібні спостереження були зроблені відносно рецептора-пастки для FAS-L, який гіперекспресується в пухлинних клітинах легень і ободової кишки [Pitti et al., 1998. Nature 396:699-703], і для антагоніста IL-1-рецептора [Mantovani et al., 1998. Ann. NY Acad. Sci. 840:338-351]. Рецептори-пастки також використовуються вірусними геномами для захисту заражених клітин хазяїна від захисних механізмів хазяїна.

APRIL (ліганд, що індукє проліферацію) є новим членом TNF-сімейства білків. На основі досліджень з експресії і функціонування APRIL можна передбачити, що цей білок використовується пухлинними клітинами для індукції швидкої проліферації. Лінії пухлинних клітин, оброблені розчинним APRIL-білком, або трансфіковані кДНК APRIL, швидко ростуть в умовах *in vitro*. Трансфіковані APRIL клітини, імплантовані мишам з імунодефіцитом швидко ростуть у вигляді пухлин. Нарешті,

людські пухлинні клітини, але не нормальна тканина, експресують високі рівні мРНК APRIL. На основі цих спостережень можна передбачити, що APRIL зв'язується з рецептором, який також експресується пухлинними клітинами, приводячи до аутокринної або паракринної активації пухлинних клітин. Крім того, можливо, що APRIL діє при інших хворобливих станах так, що активування або блокування шляху з участю APRIL буде мати додаткову застосовність. Наприклад, знижена або підвищена експресія APRIL може грати роль в аномаліях розвитку, оскільки розвиток також часто характеризується ретельно регульованим балансом між проліферацією клітин і загибеллю клітин. Аналогічно APRIL може діяти при захворюваннях, пов'язаних з проліферацією клітин таких, які виникають при деяких аутоімунних захворюваннях (наприклад, вовчаку) або при запальних захворюваннях, де відбувається швидке збільшення клітинних популяцій (наприклад, бактеріальний сепсис).

Засновуючись на популярності використання агоністів і антагоністів TNF і членів сімейства TNF-рецепторів як модуляторів захворювання, шлях з участю APRIL сам по собі представляє важливу мішень для розробки лікарських препаратів. Це особливо вірно для лікування ракових захворювань, оскільки, як виявилось, пухлинні клітини продукують і використовують APRIL для підтримки їх власного зростання і, отже, мало ймовірно, що вони продукують рецептори-пастки або інші антагоністи шляху з участю APRIL. Таким чином, шлях з участю APRIL унікально відрізняється, наприклад, від шляхів з участю TRAIL або FAS-L, яким можна перешкодити за допомогою пухлинних рецепторів-пасток.

Види лікування ракових захворювань, що існують в цей час, є неадекватними для багатьох типів пухлин за рахунок слабкої ефективності, незначного впливу на виживаність, токсичності, яка викликає важкі побічні ефекти, або їх комбінацій. Отже, є потреба в ідентифікації і розробці додаткових способів лікування розвитку ракових захворювань, які можуть забезпечити ефективність, не викликаючи важких побічних ефектів. Отже, антагоністи шляху з участю APRIL, включаючи анти-APRIL-mAbs, анти-APRIL рецепторні-mAbs, розчинні APRIL рецепторні-Ig злиті білки, природні антагоністи, невеликі молекули-антагоністи і хімічні, фармацевтичні або інші антагоністи будуть корисними.

Для цієї мети заявники ідентифікували опосередкований В-клітинами білок (BCM або BCMA) як рецептор APRIL.

Заявники встановили, що BCMA є рецептором для фактора некрозу пухлин, APRIL. APRIL представляє ту ж молекулу, описану раніше в WO9912965, яка включена тут для відомо. APRIL-рецептор визначений надалі як «APRIL-R». Даний винахід направлений на способи лікування і фармацевтичні препарати для застосування з метою лікування видів ссавців, що вже мають ракове захворювання або при ризику його розвитку. Дані суб'єкти включають суб'єктів, вже уражених раковим захворюванням, або які вже піддавались протипухлинній терапії.

Способи і композиції за даним винаходом від-

буваються частково внаслідок відкриття того, що деякі агенти, які являють собою агенти для лікування ракових захворювань, визначені тут як антагоністи APRIL-R, включаючи, наприклад, анти-APRIL-R-антитіла, можна застосовувати для лікування суб'єктів при ризику розвитку ракового захворювання, як тут визначено, або при необхідності лікування ракового захворювання.

Терапевтичні агенти для лікування ракового захворювання можна вводити будь-яким шляхом введення, який сумісний з вибраним агентом, і можуть бути представлені з будь-яким фармацевтично прийнятним носієм, який відповідає шляху введення. Переважними шляхами введення є парентеральні і, зокрема, внутрішньовенний, внутрішньоочеревинний і внутрішньосуглобний. Лікування також переважно провести протягом тривалого періоду часу амбулаторно. Вважається, що добові дози агентів для лікування ракового захворювання будуть знаходитися в межах приблизно 0,01-1000мкг/кг маси тіла, і більш переважно приблизно 10-300мкг/кг маси тіла, хоча точні дози будуть варіювати в залежності від конкретного агента, що використовується для лікування ракового захворювання і конкретного стану суб'єкта і анамнезу.

Лікування за даним винаходом придатне для знищення в основному клональної популяції (колонії) трансформованих клітин в організмі ссавця або придушення або ослаблення зростання колонії, яку звичайно відносять як до пухлини. Як такі вони придатні для продовження життя і для підтримки якості життя у суб'єктів при ризику виникнення або вже уражених раковим захворюванням.

На Фігурі 1 показана послідовність (SEQ ID NO:1) нуклеїнової кислоти кДНК мишачого APRIL і на основі її амінокислотна послідовність (SEQ ID NO:3) у вигляді карти у векторі pCCM213.10. Представлене підкресленим є тус-епітопом і амінокислотами з FasL. Початок послідовності, що кодує позаклітинний домен APRIL, вказаний стрілками.

На Фігурі 2 показана послідовність (SEQ ID NO:4) нуклеїнової кислоти і на основі її амінокислотна послідовність (SEQ ID NO:6) конструкції FLAG-людського APRIL для експресії в клітинах ссавців. Карта вказує сигнальну послідовність (1-15); FLAG-епітоп (AA 16-23) і початок послідовності, що кодує позаклітинний домен людського APRIL (32-кінець).

На Фігурі 3А показана послідовність (SEQ ID NO:7) нуклеїнової кислоти і амінокислотна послідовність (SEQ ID NO:8) повної довжини людського BCMA. На Фігурі 3В показана послідовність (SEQ ID NO:11) нуклеїнової кислоти рJST538, плазміді, що кодує людську зливу конструкцію APRIL-R-hlgGfC, і на основі її амінокислотна послідовність (SEQ ID NO:12).

На Фігурі 4 показано зв'язування тус-мишачого APRIL з мишачою В-клітинною лімфою лінії A20. У трьох окремих дослідах була показана наявність специфічного зв'язування APRIL з клітинами A20 у порівнянні з А) незабарвленими клітинами і клітинами, забарвленими тільки R1532, В) клітинами, забарвленими RANKL-L і R1532 і С) клітинами, забарвленими APRIL, і невідповідною кролячою сироваткою.

На Фігурі 5 показано зв'язування мус-мишачого APRIL з людською В-клітинною лімфоною лінії RAJI. У двох окремих дослідах була показана наявність специфічного зв'язування APRIL з клітинами RAJI у порівнянні з А) незабарвленими клітинами і клітинами, забарвленими тільки R1532, і клітинами, забарвленими RANK-1 і R1532 і В) клітинами, забарвленими APRIL, і невідповідною кролячою сироваткою.

На Фігурі 6 показано, що зв'язування APRIL з клітинами A20 (А) і клітинами RAJI (В) є конкурентним з використанням розчинного білка BAFF або розчинного білка BCMA-Ig.

На Фігурі 7 показано зв'язування FLAG-людського APRIL з клітинами різних ліній: А) клітинами A20, В) клітинами HT29, С) клітинами NIH3T3. Специфічне зв'язування показано з використанням детекції біотинільованих анти-FLAG-mAb M2 у порівнянні зі зв'язуванням, що спостерігається з невідповідними ізотипними контрольними mAb і без додавання FLAG-APRIL.

На Фігурі 8 показана імунопреципітація мус-іAPRIL з використанням злитого BCMA-Fc-білка. Верхня ліва панель показує специфічну hBCMA-Fc/мус-mAPRIL і позитивну контрольну імунопреципітацію у порівнянні з верхніми правими негативними контролями. У нижніх панелях показано, що кількості навантаженого білка були еквівалентними.

На Фігурі 9 показані досліди з ELISA, що демонструють, що FLAG-h APRIL зв'язується зі злитим hBCMA-Fc-білком. Різні рецепторні злиті Fc-білки наносили на планшети для ELISA і зв'язували з FLAG-міченими лігандами. А) Детектування пов'язаних лігандів виявило, що тільки APRIL і hBAFF специфічно зв'язуються з hBCMA-Fc, але не hCD40-Fc. В) Титрування дози, що показує, що сигнал ELISA, виявлений після зв'язування hAPRIL або hBAFF на покритих hBCMA-Fc планшетах, мав лінійну залежність по відношенню до кількості даного білка.

На Фігурі 10 показана імунопреципітація FLAG-hAPRIL і FLAG-hBAFF злитим hBCMA-Fc-білком. Верхні 4 панелі показують еквівалентність білкових навантажень при кожній реакції імунопреципітації, в той час, як нижні панелі показують, що hAPRIL і hBAFF імунопреципітувались hBCMA-Fc, але не hTRAIN-Fc.

На Фігурі 11 показаний аналіз BiaCore зв'язування мус-mAPRIL, FLAG-hBAFF і FLAG-mBAFF з hBCMA, hLTбета-рецептором або hTNF-R80 або контролем, що показує специфічне зв'язування тільки з hBCMA.

На Фігурі 12 показано зв'язування APRIL з трансфікованими BCMA клітинами. Клітини 293EBNA трансфікували плазмідом, яка експресує повну довжину hBCMA. Клітини збирали через 48 год. з використанням 5мМ EDTA і забарвлювали мус-hAPRIL. Панель А показує, що міра фарбування залежить від дози. Панель В показує, що фарбування знижувалося до фонового рівня з використанням розчинного білка BCMA-Ig.

На Фігурі 13 показано зростання клітин NIH3T3, імплантованих підшкірно мишам з імунодефіцитом (Nu/Nu), оброблених контрольними реагентами або білком BCMA-Ig. На даній моделі

клітини NIH3T3 утворюють фібросаркому.

На Фігурі 14 показане зростання людської карциноми ободової кишки SW480, імплантованої підшкірно мишам з імунодефіцитом (Nu/Nu), оброблених контрольними реагентами або злитим білком hBCMA-Ig.

На Фігурі 15А показане зростання людської карциноми ободової кишки HT29, імплантованої підшкірно мишам з імунодефіцитом, оброблених контрольними реагентами або злитим білком hBCMA-Ig. На Фігурі 15В показане зростання людської карциноми легень A549, імплантованої підшкірно мишам з імунодефіцитом (Nu/Nu), оброблених контрольними реагентами або злитим білком hBCMA-Ig.

Визначення

Для того, щоб більш чітко і стисло з'ясувати суть заявленого винаходу, надаються наступні визначення спеціальних термінів, використаних в подальшому описі і прикладеній формулі винаходу.

Далі винахід буде описаний при зверненні до подальшого докладного опису, в який включені наступні визначення:

Терміни «APRIL-рецептор» або «APRIL-R», що використовуються тут, включають природну послідовність APRIL-R і варіанти APRIL-R. APRIL-R можна виділити з різних джерел таких, як типи мишачих або людських тканин або з іншого джерела, або одержати рекомбінантними або синтетичними методами. Крім того, термін APRIL-R додатково відноситься до поліпептиду, який здатний зв'язуватися з членом сімейства фактора некрозу пухлини, APRIL, або його гомологами, або фрагментами. Прикладом APRIL-R є BCMA.

Термін «BCMA» або «BCM» відноситься до нового білка для дозрівання В-клітин, як описано у [Gras et al. (1995), International Immunology, 7:1093-1106, «BCMAp»: an integral membrane protein in the golgi apparatus of human mature B lymphocytes; Y. Laabi et al. (1995), EMBO J., 11, 3897-3904, «A new gene BCM on Chromosome 16 is fused to the interleukin 2 gene by a t (4; 16) (q26;p13) translocation in a malignant T cell lymphoma»].

«Природна послідовність APRIL-R» включає поліпептид, що має таку ж амінокислотну послідовність, як APRIL-R, виділений з природи. Подібну природну послідовність APRIL-R можна виділити з природних джерел або можна одержати рекомбінантними або синтетичними методами. Природна послідовність APRIL-R може представляти усічені або секретовані форми APRIL-R (тобто розчинні форми, що включають, наприклад, послідовність позаклітинного домену), що є в природних умовах, варіантні форми (наприклад, альтернативно сплайсовані форми), що є в природних умовах, і природні алельні варіанти APRIL-R. У одному втіленні винаходу природна послідовність APRIL-R є зрілою або природною послідовністю поліпептиду APRIL-R повної довжини, що включає амінокислоти 1-184 за SEQ ID NO:8, або його фрагмента.

«Позаклітинний домен APRIL-R» або «APRIL-R ECD» відноситься до форми APRIL-R, яка в основному вільна від трансмембранного або цитоплазматичного доменів APRIL-R. Звичайно позаклітинний домен APRIL-R буде включати менше 1%

таких трансмембранного і цитоплазматичного доменів і переважно буде мати менше 0,5% таких доменів. Необов'язково APRIL-R ECD буде включати амінокислотні залишки 1-51 або 1-52, або 1-53 SEQ ID NO:8. У переважному втіленні APRIL-ECD включає амінокислотні залишки 4-51 за SEQ ID NO:8 або більш переважно амінокислотні залишки 8-41 за SEQ ID NO:8. Фахівцям в даній області, очевидно, зрозуміло, що трансмембранний домен, встановлений для поліпептиду APRIL-R за даним винаходом, ідентифікований відповідно до критеріїв, що звичайно використовуються в даній області для ідентифікації даного типу гідрофобних доменів. Точні межі трансмембранного домену можуть варіювати, але найбільш ймовірно не більш, ніж приблизно на 5 амінокислот з кожного кінця домену, детально вказаного тут.

«Варіант APRIL-R» означає активний APRIL-R, як вказано нижче, що має ідентичність амінокислотної послідовності щонайменше на 80% з APRIL-R, що має виведену амінокислотну послідовність, показану в SEQ ID NO:5 для повної довжини природної послідовності APRIL-R, або з послідовністю APRIL-R ECD. Подібні варіанти APRIL-R включають, наприклад, поліпептиди APRIL-R, в яких один або більш амінокислотних залишків вставлені або видалені в кінці або на С-кінці послідовності за SEQ ID NO:8. Звичайно варіант APRIL-R буде мати ідентичність амінокислотної послідовності щонайменше приблизно на 80% або 85%, більш переважно ідентичність амінокислотної послідовності щонайменше приблизно на 90% і ще більш переважно ідентичність амінокислотної послідовності щонайменше на 95% з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:8.

«Процент (%) ідентичності амінокислотної послідовності» по відношенню до послідовностей APRIL-R, ідентифікованих тут, визначається як процент амінокислотних залишків в послідовності-кандидатів, які співпадають з амінокислотними залишками в послідовності APRIL-R, після розташування послідовностей і введення «проломів», якщо необхідно, для досягнення максимальної процентної ідентичності послідовності і без урахування будь-яких консервативних заміщень як частини ідентичності послідовності. Розташування з метою визначення процента ідентичності амінокислотної послідовності можна досягнути різними шляхами, які відомі фахівцям в даній області, наприклад, з використанням широко доступного комп'ютерного програмного забезпечення такого, як програмне забезпечення BLAST, ALIGN або Megalign (DNASTAR). Фахівці в даній області можуть визначити відповідні параметри для визначення розташування, включаючи будь-які алгоритми, необхідні для максимального розташування на повній довжині послідовностей, які порівнюються.

Термін «мічений епітоп», коли тут використовується, відноситься до химерного поліпептиду, що включає APRIL-R, або послідовність його домену, злиті з «міченим поліпептидом». Мічений поліпептид має достатню кількість залишків для забезпечення епітопу, проти якого можна одержати антитіла, або який може бути ідентифікований якимсь іншим агентом, який, до того ж, є досить

коротким, щоб не заважати активності APRIL-R. Мічений поліпептид переважно також є досить унікальним в тому плані, що антитіла в основному не реагують перехресно з іншими епітопами. Відповідні мічені епітопи звичайно включають щонайменше 6 амінокислотних залишків і звичайно приблизно від 8 до приблизно 50 амінокислотних залишків (переважно приблизно від 10 до приблизно 20 залишків).

«Виділений», коли використовується для опису різних поліпептидів, розкритих тут, означає поліпептид, який був ідентифікований і виділений і/або витягнутий з компонента його природного оточення. Забруднюючими компонентами його природного оточення є речовини, які звичайно будуть заважати діагностичним або терапевтичним застосуванням поліпептиду, і можуть включати ферменти, гормони і інші білкові і не білкові розчинені речовини. У переважних втіленнях поліпептид повинен бути очищеним (1) до міри, достатньої для одержання щонайменше 15 залишків N-кінцевої або внутрішньої амінокислотної послідовності з використанням секвенатора з чашкою, що обертається, або (2) до гомогенності при проведенні SDS-PAGE в невідновлюючих і невідновлюючих умовах з використанням Кумасі синього або, переважно, срібного забарвлення. Виділений поліпептид включає поліпептид *in situ* всередині рекомбінантних клітин, оскільки щонайменше один компонент з природного оточення APRIL-R не буде бути присутнім. Однак, звичайно виділений поліпептид буде одержаний щонайменше з однією стадією очищення.

Термін «антитіло» використовується в самому широкому значенні і, зокрема, включає окремі моноклональні антитіла проти APRIL-R (включаючи агоністичні, антагоністичні і нейтралізуючі антитіла) і композиції на основі анти-APRIL-R-антитіл з поліепітопною специфічністю. Термін «моноклональне антитіло», в тому значенні, як він тут використовується, відноситься до антитіла, одержаного з популяції в основному гомогенних антитіл, тобто окремі антитіла, що складають популяцію, є ідентичними, за винятком можливих мутацій, що мають місце в природних умовах, які можуть бути присутніми в міnorних кількостях.

«Очищений препарат» або «в основному очищений препарат» поліпептиду, в тому значенні, як цей термін тут використовується, означає поліпептид, який відділений від інших білків, ліпідів і нуклеїнових кислот, з якими він знаходиться в природних умовах. Переважно поліпептид також відділений від інших речовин, наприклад, антитіл, матриксів і т.д., які використовуються для його очищення.

Терміни «проведення лікування», «лікування» і «терапія», в тому значенні, як вони тут використовуються, відносяться до лікувальної терапії, профілактичної терапії і превентивної терапії.

Терміни «пептиди», «білки» і «поліпептиди» використовуються тут рівнозначно.

«Біологічно активний», в тому значенні, як цей термін тут використовується, означає той, що володіє активністю *in vivo* або *in vitro*, яка може здійснюватися прямо або опосередковано. Біологічно активні фрагменти можуть мати, наприклад, 70%

амінокислотну гомологію з активним сайтом рецептора, більш переважно щонайменше 80% і найбільш переважно 90% гомологію. Ідентичність або гомологія по відношенню до рецептора визначається тут у вигляді процента амінокислотних залишків в послідовності-кандидатові, які ідентичні залишкам APRIL-R в SEQ ID NO:8.

Термін «сравець», в тому значенні, як він тут використовується, відноситься до будь-якої тварини, віднесеної до ссавця, включаючи людей, корів, коней, собак, мишей і кішок. У переважному втіленні винаходу сравець є людиною.

У практиці даного винаходу будуть використовуватися, якщо не указано інакше, звичайні методи клітинної біології, культивування клітин, молекулярної біології, трансгенної біології, мікробіології, рекомбінантної ДНК і імунології, які відомі в даній області. Такі методи описані в літературі.

Далі будуть детально представлені переважні втілення даного винаходу. Даний винахід відноситься до використання APRIL-R і пов'язаних з APRIL-R молекул для впливу на зростання і дозрівання В-клітин і клітин, що не відносяться до В-клітин, особливо, якщо вони відносяться до пухлинних клітин. Винахід також відноситься до використання APRIL-R і пов'язаних з APRIL-R молекул для впливу на відповіді імунної системи, що є необхідним при порушеннях, пов'язаних з імунною системою. Крім того, винахід включає лікування ракового захворювання і імунних порушень за допомогою використання APRIL-R або пов'язаного з APRIL-R гена за допомогою методів генної терапії.

APRIL-R і його гомологи, продукуювані хазяями, трансформованими послідовностями за винаходом, а також нативний APRIL-R, очищений способами, відомими в даній області, або одержаний з відомих амінокислотних послідовностей, придатні в різних способах протиракових, протипухлинних і імунорегуляторних застосувань. Вони також придатні при терапії і способах, направлених на інші захворювання.

Інший аспект винаходу відноситься до застосування поліпептиду, кодованого виділеною нуклеїновою кислотою, що кодує APRIL-R, в «антисмисловій» терапії. У тому значенні, як цей термін тут використовується, «антисмислова» терапія відноситься до введення або продукції *in situ* олігонуклеотидів або їх похідних, які специфічно гібридизують в клітинних умовах з клітинною мРНК і/або ДНК, що кодує ліганд, який цікавить, для того, щоб інгібувати експресію кодованого білка, тобто шляхом інгібування транскрипції і/або трансляції. Зв'язування може відбуватися на основі комплементарності пар основ або, наприклад, у разі зв'язування з ДНК-дуплеками за допомогою специфічних взаємодій в основному жолобку подвійної спіралі. В основному «антисмислова» терапія відноситься до ряду методів, як правило, що використовуються в даній області, і включає будь-яку терапію, засновану на специфічному скріпленні з олігонуклеотидними послідовностями.

«Антисмислову» конструкцію за даним винаходом можна доставити, наприклад, у вигляді експресуючої плазміди, яка, при транскрипції в клітині, продукує РНК, яка є комплементарною

щонайменше до частини клітинної мРНК, яка кодує Кау-ліганд. Альтернативно «антисмислова» конструкція може бути олігонуклеотидним зондом, який одержують *ex vivo*. Такі олігонуклеотидні зонди переважно являють собою модифіковані олігонуклеотиди, які стійкі до ендогенних нуклеаз і тому стабільні в умовах *in vivo*. Прикладами молекул нуклеїнових кислот для використання як «антисмислових» олігонуклеотидів є фосфорамідатні, фосфотіоатні і метилфосфонатні аналоги ДНК [дивись, наприклад, патенти США 5176996, 5264564 і 5256775]. Крім того, є огляд із загальних підходів до конструювання олігомерів, придатних для «антисмислової» терапії, наприклад, у [Van Der Krol et al. (1988) *Biotechniques* 6:958-976; і Stein et al. (1988) *Cancer Res* 48:2659-2668], спеціально включених тут для відомої.

APRIL-R за винаходом, як обговорювалося вище, є членом сімейства TNF-рецепторів. Білок, його фрагменти або гомологи можуть мати широкі терапевтичні і діагностичні застосування.

Поліпептиди за винаходом специфічно взаємодіють з APRIL, поліпептидом, раніше описаним в WO99/12964, включеної тут для відомої. Однак пептиди і способи, розкриті тут, створюють можливість для ідентифікації молекул, які специфічно взаємодіють з APRIL-R або його фрагментами.

Заявлений винахід в деяких втіленнях включає способи застосування пептидів, похідних APRIL-R, які володіють здатністю зв'язуватися з APRIL. Фрагменти APRIL-R можна одержати декількома шляхами, наприклад, рекомбінацією, з допомогою ПЛР, протеолітичним розщепленням або хімічним синтезом. Внутрішні або кінцеві фрагменти поліпептиду можна одержати видаленням одного або більше нуклеотидів з одного кінця або обох кінців нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид. Експресія ДНК, що мутувала, дає фрагменти поліпептиду.

Фрагменти поліпептиду також можна синтезувати хімічним шляхом з використанням методів, відомих в даній області, таких, як звичайний спосіб Мерріфілда з використанням *f*-мос-або *t*-мос в твердій фазі. Наприклад, пептиди і послідовності ДНК за даним винаходом можна довільно розділити на фрагменти бажаної довжини без перекриття фрагмента або розділити на фрагменти бажаної довжини, що перекриваються. Способи такі, як ці, описані більш детально нижче.

Одержання розчинних форм APRIL-R

Розчинні форми APRIL-R часто можуть ефективно передавати сигнали, і, отже, їх можна вводити як лікарський препарат, який вже імітує природну мембранну форму. Можливо, що заявлені тут APRIL-R секретуються в природних умовах у вигляді розчинних цитокінів, однак, якщо немає, то можна перекоординувати ген для вимушеної секреції. Для створення розчинної секретованої форми APRIL-R необхідно видалити на рівні ДНК N-кінцеві трансмембранні області і деяку ділянку стовбурової області і замінити їх лідерною послідовністю типу I і, альтернативно, лідерною послідовністю типу II, що дозволить протікати ефективному розщепленню у вибраній експресуючій системі. Фахівці в даній області можуть змінювати розміри стовбурової області, що залишилася в

експресуючій конструкції для секреції з метою оптимізації як властивостей зв'язування ліганду, так і ефективності секреції. Наприклад, конструкції, що включають всі можливі стовбурові довжини, тобто N-кінцеве усікання, можна приготувати таким чином, що вийдуть білки, що починаються з амінокислот 1-52. З даного типу аналізу будуть одержані стовбурові послідовності з оптимальною довжиною.

Одержання антитіл, реагуючих з APRIL-R

Винахід також включає антитіла, специфічно реагуючі із заявленим APRIL-R і його корецепторами. Антибілок/антипептид-антисироватку або моноклональні антитіла можна одержувати стандартними методами [дивись, наприклад, *Antibodies: A Laboratory Manual* ed. by Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)]. Ссавця, такого як миша, хом'ячок і кролик, можна імунізувати імуногенною формою пептиду. Методи для надання імуногенності білку або пептиду включають кон'югацію на носіях або інші методи, добре відомі в даній області.

Імуногенну ділянку APRIL-R або його корецепторів можна вводити в присутності ад'юванта. За протіканням імунізації можна простежувати за встановленням титрів антитіл в плазмі або сироватці. Можна використати стандартні ELISA або інші імуноаналізи з імуногеном як антигеном для оцінки рівнів антитіл.

У переважному втіленні цільові антитіла є імуноспецифічними для антигенних детермінант APRIL-R або його корецепторів, наприклад, антигенних детермінант поліпептиду за SEQ ID NO:8 або тісно пов'язаного людського або надлюдського гомолога ссавців (наприклад, на 70, 80 або 90% гомологічного, більш переважно на 95% гомологічного). У ще одному переважному втіленні даного винаходу анти-APRIL-R або anti-APRIL-R корецептори-антитіла значною мірою не реагують перехресно (тобто реагують специфічно) з білком, який, наприклад, менше, ніж на 80% гомологічний по відношенню до SEQ ID NO:8, переважно менше, ніж на 90% гомологічний по відношенню до SEQ ID NO:8 і найбільш переважно менше, ніж на 95% гомологічний по відношенню до SEQ ID NO:8. Вираз «значною мірою не реагують перехресно» означає, що антитіло має афінність зв'язування для негомологічного білка, яка складає менше 10%, більш переважно менше 5% і навіть більш переважно менше 1% афінності зв'язування для білка за SEQ ID NO:8.

Термін «антитіло», в тому значенні, як він тут використовується, призначений для включення його фрагментів, які також є специфічно реагуючими з APRIL-R або його рецепторами. Антитіла можуть бути фрагментовані з використанням звичайних методів, і фрагменти піддані скринінгу на застосовність таким же чином, як описано вище для суцільних антитіл. Наприклад, F(ab')₂-фрагменти можна одержати обробкою антитіла пепсином. Одержаний F(ab')₂-фрагмент можна обробити для відновлення дисульфідних зв'язків з одержанням Fab'-фрагментів. Антитіла за даним винаходом додатково призначені для включення біоспецифічних і химерних молекул, що володіє анти-APRIL-R- або анти-APRIL-R-корецептори-

активністю. Таким чином, як моноклональні, так і поліклональні антитіла (Ab), направлені проти APRIL-R і їх корецепторів, і фрагменти антитіл такі, як Fab' і F(ab')₂ можна використати для блокування дії APRIL-R і його відповідних корецепторів.

Різні форми антитіл можна також приготувати з використанням стандартних методів рекомбінантної ДНК [Winter and Milstein, *Nature* 349:293-299 (1991), спеціально включений тут для відомої]. Наприклад, можна сконструювати химерні антитіла, в яких домен зв'язування антигену з антитіла тварини пов'язаний з людським константним доменом [наприклад, Cabilly et al., патент США №4816567, включений тут для зведення]. Химерні антитіла можуть знизити імуногенні відповіді, що спостерігаються на антитіла тваринного походження, коли використовуються в клініці для лікування людини.

Крім того, можна синтезувати рекомбінантні «гуманізовані антитіла», які розпізнають APRIL-R або його корецептори. «Гуманізовані» антитіла є химерами, що включають в основному людські послідовності IgG, в які вставлені області, відповідальні за специфічне зв'язування з антигеном. Тварин імунізують бажаним антитілом, виділяють відповідні антитіла і видаляють ділянку послідовностей варіабельної області, відповідальної за специфічне зв'язування з антигеном. Області зв'язування антигену від тварин потім клонують у відповідне положення генів людських антитіл, в яких видалені області зв'язування антигену. «Гуманізовані» антитіла зводять до мінімуму застосування гетерологічних (тобто міжвидових) послідовностей в людських антитілах і, таким чином, малоімовірно, що вони будуть викликати імунні відповіді у обробленого суб'єкта.

Конструкцію різних груп рекомбінантних антитіл також можна провести приготуванням химерних або «гуманізованих» антитіл, що включають варіабельні домени і людські константні домени (CH1, CH2, CH3), виділені з різних класів імуноглобулінів. Наприклад, антитіла з підвищеними валентностями сайту зв'язування антигену можна одержати рекомбінантним методом при клонуванні сайту зв'язування антигену у вектори, що несуть людські константні області ланцюгів [Agulanandam et al., *J. Exp. Med.* 177:1439-1450 (1993), включений тут для відомої].

Крім того, звичайні методи рекомбінантної ДНК можна використати для зміни афінності зв'язування рекомбінантних антитіл з їх антигенами зміною амінокислотних залишків в оточенні сайтів зв'язування антигену. Афінність зв'язування антигену «гуманізованого» антитіла може бути підвищена мутагенезом, заснованим на молекулярному моделюванні [Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:10029-33 (1989)], включений тут для відомої.

Одержання аналогів: продукція змінених ДНК і пептидних послідовностей

Аналоги APRIL-R можуть відрізнятися від того, що є в природних умовах APRIL-R за амінокислотною послідовністю або іншим властивостям, не пов'язаним з послідовністю, або за обома. Не пов'язані з послідовністю модифікації включають хімічну дериватизацію APRIL-R in vivo або in vitro. Не пов'язані з послідовністю модифікації включають, але не обмежуються змінами внаслідок аце-

тилювання, метилювання, фосфорилування, карбоксилювання або глікозилювання.

Переважні аналоги включають біологічно активні фрагменти APRIL-R, чиї послідовності відрізняються від послідовності, представленої в SEQ ID NO:8, однією або більше консервативною заміною амінокислот або однією або більше неконсервативною заміною амінокислот, делеціями або вставками, які не приводять до втрати активності APRIL-ліганду. Консервативні заміни звичайно включають заміну однієї амінокислоти на іншу з однаковими властивостями, наприклад, гліцин; гліцин, аланін; валін, ізолейцин, лейцин; аспарагінова кислота, глутамінова кислота; аспарагін, глутамін; серин, треонін; лізин, аргінін; і фенілаланін, тирозин.

Застосування

Повну довжину гена APRIL-R (SEQ ID NO:8) або його ділянки можна використати як зонди гібридизації для бібліотеки кДНК для виділення, наприклад, ще інших генів, які володіють бажаною ідентичністю послідовності по відношенню до послідовності APRIL-R, розкритої в SEQ ID NO:6. Нуклеотидні послідовності, що кодують APRIL-R, також можна використати для конструювання зондів гібридизації з метою картування гена, який кодує APRIL-R, і для генетичного аналізу індивідумів з генетичними порушеннями. Скринінг може бути побудований таким чином, щоб знайти основні сполуки, які наслідують біологічну активність APRIL-R. Подібний скринінг буде включати тести, призначені для скринінгу з високою пропускну здатністю хімічних бібліотек, роблячи їх особливо придатними для ідентифікації невеликих молекул, кандидатів для лікарських препаратів. Передбачувані невеликі молекули включають синтетичні органічні або неорганічні сполуки. Нуклеїнові кислоти, які кодують APRIL-R або його модифіковані форми, можна також використати для одержання або трансгенних тварин, або «сконструйованих» тварин, які, в свою чергу, придатні при розробці і скринінгу терапевтичних корисних реагентів, включаючи, наприклад, реагенти проти ракового захворювання.

APRIL-R і гомологи, одержані від хазяїв, трансформованих послідовностями за винаходом, а також нативний APRIL-R, очищений способами,

відомими в даній області, або одержаний за відомими амінокислотними послідовностями, є придатними в різних способах протиракових застосувань.

У одному втіленні винаходу забезпечується спосіб лікування ссавця від стану, пов'язаного з небажаною проліферацією клітин, призначенням ссавцеві терапевтично ефективної кількості композиції, що включає антагоніст APRIL-R, де антагоніст APRIL-R містить поліпептид, який протидіє взаємодії між APRIL-R і його спорідненим рецептором або рецепторами, з фармакологічно прийнятним наповнювачем.

У переважному втіленні спорідненим рецептором APRIL на поверхні клітини є BCMA.

Спосіб можна використати з будь-яким антагоністом APRIL-R, який має поліпептид, який протидіє взаємодії між APRIL і його спорідненим рецептором або рецепторами. Приклади антагоністів APRIL-R включають, але не обмежуються розчинним поліпептидом APRIL-R, включаючи але не обмежуючись розчинним BCMA; розчинними химерними молекулами APRIL-R, включаючи, але не обмежуючись BCMA-IgG-Fc, і гомологами aHTH-APRIL-R-airarmia, включаючи, але не обмежуючись анти-BCMA моноклональним антитілом.

Спосіб за винаходом можна використати при будь-якому стані, пов'язаному з небажаною проліферацією клітин. Зокрема, способи за даним винаходом можна використати для обробки пухлинних клітин, яких експресують APRIL і/або APRIL-R (тобто BCMA).

Приклади ракових захворювань, де проліферація клітин модулюється під дією APRIL, можна тестувати при визначенні в умовах *in vitro* рівня мРНК, APRIL і/або APRIL-R (тобто BCMA), експресованої в бібліотеках пухлинних тканин. Бібліотеки пухлинних тканин, в яких є висока експресія мРНК APRIL і/або APRIL-R (тобто BCMA) будуть кандидатами. Альтернативно, можна провести скринінг кандидатів при пошуку в загальнодоступних або приватних базах даних (тобто база даних Incyte) за допомогою, наприклад, повної довжини послідовності кДНК APRIL. З використанням цих методів було встановлено, наприклад, що експресія мРНК APRIL виявлена у великому ряді типів пухлин, включаючи, але не обмежуючись такими, знайденими в таблиці 1 нижче:

Таблиця 1

Опис бібліотеки

Лінія пухлини простати LNCaP, CA, 50M, нелікована, TIGR
Т-лімфоцитарна пухлина, лімфома, TIGR
Пухлина яєчника, папілярна серозна цистаденоCA
Легеня, mw/аденоCA, COPD, 47M
Пухлина молочної залози, аденоCA, 46F, SUB, m/BRSTNOT33
Ганглії, дорсальний корінь, цервікальний, aw/ лімфома, 32M, NORM
Пухлина мозку, лобна, нейронна неоплазма, 32M
Пухлина простати, аденоCA, 59M, SUB, m/PROSNOST19
Пухлина ободової кишки, печінковий вигин, аденоCA, 55M, SUB, m/COLATMTOI
Пухлина підшлункової залози, TIGR
Пухлина параганглію, парагангліома, aw/нирковоклітинна CA, 46M
Молочна залоза, mw/ проточна CA, 43F, m/BRSTTUT16

Пухлина нирки, нирковоклітинна CA, 51F
Сечовий міхур, mW/TCCA, CA in situ, 60M, m/BLADTUT04
Пухлина матки, ендометріальна, F, TIGR
Простата, ДГП, mW/аденоCA, PIN, 59M
Легеня, mW/аденоCA, 53M, m/LUNGTUT17
Кісткова пухлина /лінія, MG-63, ocTeoSAR/гігантоклітинна, M/F, пул, RP
Мозок, лобна кора, am/ легенева CA, 77M
Пухлина ободової кишки, аденоCA, NORM, SUB, CGAP
Пухлина легень, плоскоклітинна CA, 57M
Легеня, mW/аденоCA, 63M
Простата, АН, mW/аденоCA, 50M, m/PROSTUTOI
Периферична кров, В-лімфоцити, CLL, пул, NORM, 3'CGAP
Пухлина ободової кишки, аденоCA, пул, NORM, 3' /5' CG AP
Нирка, mW/нірковоклітинна CA, 8,53 F, пул, NORM
Яєчник, дермоїдна кіста, 22F
Пухлина ободової кишки, аденоCA, NORM, 3'CGAP
Пухлина ободової кишки, аденоCA, 3'CGAP
Простата, ДГП, mW/аденоCA, 70M, SUB
Пухлина яєчника, метастази аденоCA ободової кишки, 58F
Матка, міометрій, mW/лейоміома, 43F
Тонкий кишечник, клубова кишка, mW/CUC, 25F
Лімфатичний вузол, періпанкреатичний, aw/ підшлункової залози аденоCA, 65M
Яєчник, aw/лейоміома, 36F, NORM
Легеня, mW/веретенноклітинна карцинома, 62F
Пухлина легені, шюскоклітинна CA, 50M
Пухлина мозку, менінгіома, 36M
Пухлина, аденоCA, 65F, m/ PANCNOT 0 8
Пухлина, mW/ендобронхіальна карциноїдна пухлина, 33M
Надниркова, mW/феохромцитоміа, 43F, m/ADRETUT07
Пухлина мозку, лобна, менінгіома, 5 OM
Пухлина нирки, ракове захворювання з чітким типом клітин, пул, NORM, 3'CGAP
Молочна залоза, mW/часточкова CA, 67 F
Легеня, mW/метастаз ocTeoSAR, aw/плевральні метастази, 58M, NORM
Пухлина простати, аденоCA, 59M, SUB, m/PROSNOTI9
Пухлина тонкого кишечника, клубова кишка, метастази ендометріальної аденоCA, 64 F
Пухлина яєчника, аденоCA, 58F
Молочна залоза, захворювання молочної залози NF, 46F
Пухлина мозку, лобна, метастази гіпернефрими, 58M
Пухлина нирки, Wilms, пул, WM/WN
Легеня, mW/метастаз CA щитовидної залози, 79M, m/LUNGTUTQ2
Пухлина легені, метастази CA щитовидної залози, 79M, m/LUNGNOT03
Пухлина паращитовидної залози, аденома, M/F, NORM, WM
Пухлина підшлункової залози, анапластична CA, 45F
Яєчник, mW/муцинозна цистаденоCA, 43F, m/OVARTUTOI
Пухлина легені, плоскоклітинна CA, пул, NORM, CGAP
Пухлина молочної залози, аденоCA, 46F, m/BRSTNOT17
Матка, mW/лейоміома, aw/аденоCA ободової кишки, 45F
Легеня, mW/аденоCA, aw/вузловий, діафрагмальні метастази, 63F
Пухлина молочної залози, аденоCA, 46F, m/BRSTNOT33
Пухлина простати, аденоCA, 66M, m/PROSNOT15, PROSDIN01
Пухлина молочної залози, аденоCA, 54F, m/BRSTNOT03
Ембріональна пухлина, пул, SUB, 3'CGAP
Кістковий мозок, велика гомілкорова кістка, aw/метастаз альвеолярної рабдоміо SAR, 16M
Простата, АН, mW/аденоCA, 57M, m/PROSTUT04
Молочна залоза, PF зміни, mW/аденоCA, 55F, m/BRSTTUTOI
Пухлина матки, серозна папілярна CA, F, пул, 3'CGAP
Пухлина яєчника, муцинозна цистаденоCA, 43F, m/OVARNOT03
Молочна залоза, PF зміни, mW/аденоCA, внутрішньопроточна CA, 43F
Молочна залоза, mW/проточний CA, CA in situ, aw/метастаз лімфатичних вузлів, 62F
Пухлина нейроангіома, гангліоневрома, 9M
Пухлина підшлункової залози, аденоCA, 3'CGAP

Пухлина матки, ендометріальна аденоCA, F, пул, 3'CGAP

Пухлина легені, нейроендокринна карциноїдна пухлина, пул, NORM, 3'CGAP
--

CA - карцинома; SAR - саркома

Антагоністи APRIL-R, як об'єкт винаходу, використовуються при лікуванні станів, пов'язаних з небажаною проліферацією клітин, зокрема, при лікуванні пухлин, переважно інгібують зростання пухлинних клітин більш, ніж на 10%, 20%, 30% або 40% і найбільш переважно більш, ніж на 50%. Антагоністи APRIL-R одержують в результаті скринінгу (дивись, наприклад, обговорення в прикладі 6). Наприклад, антагоністи APRIL-R можна відібрати на основі активності інгібувати зростання (тобто більш, ніж на 10%, 20%, 30%, 40% або 50%) карциноми ободової кишки HT29 людини або карциноми легень A549 людини (дивись, наприклад, обговорення на Фігурі 15), які походять відповідно з пухлини ободової кишки і легені.

Інше втілення винаходу забезпечує способи інгібування зростання В-клітин і клітин, що не відносяться до В-клітин, індукованого дендритними клітинами зростання В-клітин і дозрівання або продукції імуноглобулінів у тварини з використанням поліпептиду APRIL-R.

В іншому втіленні винахід забезпечує способи застосування APRIL-R при лікуванні аутоімунних захворювань, гіпертензії, серцево-судинних порушень, ниркоподібних порушень, В-клітинних лімфо-проліферативних порушень, імуносупресорних захворювань, при трансплантації органів, запалення і захворювання, пов'язаного з вірусом імунодефіциту людини. Також включені способи застосування агентів для лікування, придушення або зміни імунної відповіді, що включає шляхи передачі сигналів між APRIL-R і його лігандом.

Даний винахід також забезпечує фармацевтичні композиції, що включають поліпептид APRIL-R і фармацевтично прийнятний наповнювач. Відповідні носії для поліпептиду APRIL-R, наприклад, і їх композиції, описані в [Remington' Pharmaceutical Sciences, 16th ed., 1980, Mack Publishing Co., edited by Oslo et al.] Як правило, в композиції використовується відповідна кількість фармацевтичної прийнятної солі для того, щоб зробити композицію ізотонічною. Приклади носія включають буфери такі, як фізіологічний розчин, розчин Рінгера і розчин декстрози. Значення рН розчину переважно дорівнює від приблизно 5 до приблизно 8, і більш переважно від приблизно 7,4 до приблизно 7,8. Додаткові носії включають препарати для безперервного вивільнення такі, як напівпроникні матриці з твердих гідрофобних полімерів, коли матриці знаходяться у вигляді частинок, що мають певну форму, наприклад, ліпосом, плівок або мікрочастинок. Фахівцям в даній області, очевидно, буде зрозуміло, що деякі носії будуть більш переважними в залежності, наприклад, від шляху введення і концентрації поліпептиду APRIL-R, який вводиться.

Введення можна здійснювати ін'єкцією (наприклад, внутрішньовенною, внутрішньоочеревинною, підшкірною, внутрішньоом'язовою) або іншими способами такими, як інфузія, для забезпечення доставки в кров'яне русло в ефективній формі.

У практиці даного винаходу будуть використуватися, якщо не указано інакше, звичайні методи клітинної біології, культивування клітин, молекулярної біології, мікробіології, рекомбінантної ДНК, хімії білків і імунології, які відомі фахівцям в даній області. Ці методи описані в літературі. Дивись, наприклад, [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition. (Sambrook, Fritsch and Maniatis, eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; DNA Cloning: Volumes I and II (D.N. Glover, ed.), 1985; Oligonucleotide Synthesis (M.J.Gait, ed.), 1984; патент США №4683195 (Mullis et al.); Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames and S.J. Higgins, eds.), 1984; Transcription and Translation (B.D. Hames and S.J. Higgins, eds.), 1984; Culture of Animal Cells (R.I. Freshney, ed.). Alan R. Liss, Inc., 1987; Immobilized Cells and Enzymes, IRL Press, 1986; A Practical Guide to Molecular Cloning (B. Perbal), 1984; Methods in Enzymology, Volumes 154 and 155 (Wu et al., eds.), Academic Press, New York: Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.H. Miller and M.P. Calos, eds.), 1987; Cold Spring Harbor Laboratory: Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Mayer and Walker, eds.), Academic Press, London, 1987; Handbook of Experiment Immunology, Volumes I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.), 1986; Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986].

Наступні приклади надані для ілюстрації даного винаходу, і їх не треба розглядати, як такі, що обмежують його.

Приклади

У прикладах, розкритих нижче, використали наступні методи.

Методи

Клонування і експресія мус-міченого мишачого APRIL (CCM776) в *Pichia pastoris*

Експресуючий вектор pCCM213.10 конструювали, взявши PDR004 (H98 muAPRIL з включаючим вищий FAS-ліганд «стовбуром», сполученим з N-кінцем разом з FLAG-епітоп-міткою) і вирізавши кодуючу послідовність mu APRIL з Sac I в NotI. Синтетичні олігонуклеотиди LTB-559 і 560 утворюють лінкер Xho-1-SacI, який включає лідерну послідовність з альфа-чинником схрещування, мус-епітоп-мітку, а також мотив KEL з FAS-ліганду. Фрагмент muAPRIL і лінкер лігували в сайтах Xho-1-NotI в pccm211, що експресує плазмиди *Pichia pastoris*.

PCCM213.10 лінеаризували *Stul*, піддавали електропорації в штам GS115 (his4-) і висівали в мінімальному середовищі, що містить декстрозу. HIS4-трансформанти аналізували на експресію білка посівом одиничної представницької колонії в збагачене середовище (BMGY: забуферене, складне середовище, що містить гліцерин) і давали можливість рости до щільності протягом 48 год. при 30°C. Культури центрифугували і клітинні осадки ресуспендували (1:5) в збагаченому індукційному середовищі, що містить 1,5% метанолу

(BMMY: забуферене, складне середовище, що містить метанол). Через двох днів індукції при 30°C, супернатанти піддавали SDS-PAGE і оцінювали на присутність муAPRIL. Фарбування Кумасі і вестерн-блотінг (з анти-мус-мAb9E10) показували, що один штаб, CCM776, продукував адекватні кількості глікозильованої форми білка мус-міченого H98 муAPRIL.

Очищення мус-мAPRIL

Мус-мAPRIL, білок з 149 амінокислот, експресували в річці. Даний білок має ізоелектричну точку 7,45. 175мл супернатанту річці діалізували проти 10мМ Тріс буфера, pH 6,8 протягом ночі і потім пропускали через колонку SP місткістю 20мл. Колонку ретельно промивали 10мМ Тріс-HCl буфером, pH 6,8 і елюювали 250мМ NaCl в PBS. Другу стадію очищення проводили з використанням колонкової гель-фільтрації (S300).

Фракції, що містять мус-APRIL, з колонки SP місткістю 20мл концентрували центрифугуванням до об'єму 7мл. Після гель-фільтрації заявники одержували 8мг мус-APRIL, який детектували за оптичною щільністю і забарвленням Кумасі гелем. Заявники також провели вестерн-блотінг з використанням мишачих моноклональних антитіл 9E10 (анти-мус), в якому було показано, що мус-мітка була інтактною після стадій очищення. N-кінцева послідовність підтверджувала, що очищений білок відповідає мус-мAPRIL.

Очищення FLAG-людського APRIL

Плазмиду рз429(в подальшому названу р1448) використали для тимчасової трансфекції клітин 293Т з використанням ліпоектаміну (Gibco-BRL) і середовища, що не містить сироватку. Плазмиду, яку конструювали в експресуючому векторі ссавців PCR3 (Invitrogen), кодує домен зв'язування рецептора людського APRIL, з N-кінцевим білком в клітинному культуральному середовищі. Білок FLAG-APRIL виділяли з середовища, що не містить сироватку, з використанням колонки з анти-FLAG-мAb M2 і надлишку пептиду FLAG, слідуючи рекомендаціям виробника (Kodak).

Очищення hBCMA-Fc

hBCMA-Fc тимчасово трансфікували в клітини 293. Кондиціоноване середовище від клітин 293 з гіперекспресією hBCM-Fc наносили на колонку з білком А. Білок елюювали з використанням 25мМ фосфатного 100мМ NaCl, pH 2,8 з подальшою нейтралізацією 1/20 об'єму 0,5м NaPCu, pH 8,6. Відібрані за оптичною щільністю при 280нм фракції піддавали SDS-PAGE у відновлюючих і невідновлюючих умовах і вестерн-блотінгу для ідентифікації очищеного білка. З 500мл кондиціонованого середовища було одержано 3мг білка.

Мус-мAPRIL зв'язується з різними клітинними лініями в аналізі FACS

450нг/мл очищеного мус-мAPRIL зв'язували з клітинними лініями в 100мкл PBS/2%FBS+Fc-блокувати реагенти (FcBlock @ 20мкг/мл (Pharmingen) і очищеного людського IgG @ 10мкг/мл (Sandoz) на льоду протягом 1год. Позитивне зв'язування виявляли з використанням специфічної кролячої антимишачої до APRIL антисироватки (1:500) і ослиного антикролячого IgG-FITC (Jackson). Клітинні лінії A20, Raji, NIH3T3 і HT29

підтримували в середовищі, як запропоновано постачальником (ATCC Bethesda, MD). Клітини BJAB культивували в HEPES-забуференому середовищі RPMI з додаванням 10% FBS і L-глутаміну. У конкурентних тестах додавали 450нг/мл мус-мишачого APRIL з 1мкг/мл конкурентного білка.

Приклад 1: Детектування зв'язування APRIL з APRIL-R з використанням тесту чашок

У даному прикладі аналізували зв'язок BCMA з APRIL.

Для того, щоб тестувати, наскільки BCMA зв'язується з APRIL, заявники провели дослід на коїмунопреципітацію. У даному прикладі використали розчинні білки hBCMA-Fc і мус-мAPRIL.

hBCMA-Fc і LTbR-Fc додавали з різними TNF-лігандами: мус-inAPRIL; мус-CD40L і мус-RANKL в середовище, що містить 10% FBS, на 1/2год. при кімнатній температурі. Fc-білки зв'язували з гранулами, навантаженими білком А, протягом 1-2год., промивали три рази 1мл PBS, аналізували імуноблотінгом з мишачими моноклональними 9E10 (анти-мус) антитілами і виявляли з використанням посиленої хемілюмінесценції.

Заявники виявляли мус-APRIL в імунопреципітатах hBCMA-Fc, що вказує на те, що BCMA взаємодіє з APRIL специфічним чином, оскільки інші TNF-ліганди, мус-CD40L і мус-RANKL не володіли здатністю зв'язуватися з BCMA. Мус-APRIL не зв'язується з LTbR-Fc.

Ту ж мембрану очищали і повторно ставили блотінг з анти-hIgG-HRP для того, щоб показати, що ту ж кількість LTbR-Fc з BCMA-Fc використали в імунопреципітатах.

Приклад 2:

У даному прикладі описується, що hBCMA-Fc взаємодіє з FLAG-hAPRIL.

Аналіз ELISA: покриті рецепторними злитими Fc-білками планшети (hBCMA-Fc-739 або hTNFR2-Fc-492) з концентрацією 1мкг/мл в карбонатному буфері, pH 9,6 протягом ночі, при 4°C. Блокували протягом 2год. при кімнатній температурі з використанням PBS/5% знежиреного сухого молока/0,5% Твіна-20. Готували двократне послідовне розведення лігандів в 100мкл блокуючого буфера (TNFa-197 з 1000нг/мл, муBAFF-657 з 1000нг/мл, hAPRIL-507 з 2000нг/мл (неактивний), hAPRIL-429 з п'ятикратно концентрованого середовища). Після інкубування з лігандами планшет промивали PBS/5% Твін-20 і зондували 0,5мкг/мл анти-FLAG-мAb M2 в буфері для розведення. Антитіла детектували з використанням анти-мишачих-PO 1/2000 з ензиматичним виявленням (OPD).

Досліди на імунопреципітацію: клітини 293Т трансфікували вказаною експресуючою плазмідом (Rec-Fc або FLAG-ліганд) в чашці діаметром 9см. Трансфіковані клітини залишали на 5 днів в 8мл середовища Optimem (Gibco-BRL). Імунопреципітацію проводили при змішуванні 200мкл кондиціонованого середовища, що містить кожний рецептор, з 200мкл кондиціонованого середовища, що містить кожний ліганд, + 400мкл PBS + 10мкл ProtG-сефарози. Все це обертало протягом 1год. на роторі, 4 рази промивали 1мл PBS, потім кип'ятили в 50мкл буфера для зразка (+DTT). 20мкл з кожної реакції імунопреципітації наносили доріжку. Оцінку результатів блотінгу проводили за допомо-

гою 1мкг/мл анти-FLAG-mAb M2 (Sigma, St Louis MO) і антимишачими-PO (1/2000). Також блотінг перевіряли з антилюдськими-PO: 100мкл кондиціонованого середовища осаджували сумішшю MeOH/CHCl₃/лізоцим. Цю суміш кип'ятили в 50мкл буфера для зразка (+DTT) і 20мкл навантажували. Оцінку блотінгу проводили з анти-FLAG-mAb M2 (1мкг/мл) і анти-мишачими-PO (1/2000).

Приклад 3:

У даному прикладі описується зв'язування мус-mAPRIL; hKayL-440 (hBAFF) і FLAG-mBAFF з hBCMA-Ig, hLT-R-Ig або hr80 TNFR-Ig. Всі досліді проводили при 25°C зі швидкістю потоку 10мкл/хв.

Кожний дослід проводили з використанням HBS буфера (10мМ HEPES, 150мМ NaCl, 0,005% поверхнево-активних речовини P20 при pH 7,4). Цей же розчин використали як елююючий буфер і як розріджувач для проб.

Спочатку поверхню чипів CM5 активували N-гідрокси-сукцинімід/N-етил-N'-(3-діетиламінопропіл)-карбодіімідом гідрохлоридом (BIAcore). 20мкл hBCMA-Ig, 15мкл hLT-R05-Ig і 10мкл hr80-TNFR, розбавлені до 30мкг/мл 10мМ оцтовою кислотою, потім блокували один раз 30мкл і повторно 15мкл етанол-аміну-HCl (pH 8,5). Це призводило до поверхневої щільності 1600-3700 резонансних одиниць (RU). Чипи регенерували 20мкл 1мМ мурашиної кислоти. Ці видалення повторювали п'ять разів для встановлення і стабільного фону, що відтворюється.

Для дослідів 100мкл мус-mAPRIL, hKayL-400 і FLAG-mBAFF, кожного, розбавляли до 30мкл/мл буфером для розбавлення і наносили по поверхні чипів. Відразу ж після кожного нанесення чипи промивали 500мкл буфера для розбавлення. Поверхню регенерували між дослідом нанесенням 20мкл 1мМ мурашиної кислоти, потім ще нанесенням 15мкл мурашиної кислоти. Після регенерації чипи врівноважували буфером для розведення.

Приклад 4: одержання розчинних форм рецептора

Для приготування інгібітору рецептора для застосування у людей необхідна послідовність кДНК позаклітинного домену людського рецептора. Якщо мишача форма відома, бібліотеки людської кДНК можна легко піддати скринінгу з використанням послідовності мишачої кДНК і подібні маніпуляції звичайно проводять в даній області. З послідовністю людської кДНК можна приготувати олігонуклеотидні праймери для ампліфікації в ПЛР позаклітинного домену рецептора при відсутності трансмембранного і внутрішньоклітинного доменів. Як правило, він включає велику частину амінокислот між останнім пов'язаним дисульфідним зв'язком «TNF-домену» і трансмембранним доменом. Можна змінювати кількість включеної «стовбурової» області для оптимізації активності одержаного розчинного рецептора. Дану ампліфіковану ділянку потрібно перебудувати для включення відповідних сайтів рестрикції для надання можливості клонування в різні С-кінцеві Ig-злиті химерні вектори. Альтернативно можна вставити стоп-сигнал в 3'-кінці і приготувати розчинну форму рецептора без повторного сортиру для використання Ig-зливої химери. Одержані вектори можна експресувати в більшості систем, що

використовуються в біотехнології, включаючи дріжджі, клітини комах, клітини бактерій і ссавців, і існують приклади для всіх типів експресії. Можна приєднати різні людські Fc-домени для оптимізації або елімінації FcR і комплементарних взаємодій за бажанням. Альтернативно можна використати форми даних Fc-доменів, які мутували, для виборчого видалення FcR або комплементарних взаємодій або приєднання N-пов'язаних цукрів до Fc-домену, який має деякі переваги.

Приклад 5: одержання агоністичних або антагоністичних антитіл

Вищеописані розчинні форми рецепторів можна використати для імунізації мишей і приготування моноклональних антитіл звичайними методами. Одержані mAbs, які ідентифікуються ELISA, можна потім піддати скринінгу на агоністичну активність або у вигляді розчинних антитіл, або імобілізованих на пластмасі в різних клітинних тестах in vitro. Часто загибель клітинної лінії HT29 представляє відповідну систему, яка чутлива до передачі сигналів через багато які TNF-рецептори. Якщо дана лінія не має рецептор, що цікавить, повну довжину даного рецептора можна стабільно трансфікувати в лінію HT29 для того, щоб надати можливість протікати тесту на цитотоксичність. Альтернативно, ці клітини можна використати в апараті Cytosensor для оцінки того, наскільки активація рецептора може спричинити зміну pH, що свідчить про передачу сигналу. Сімейство TNF-рецепторів передає сигнали в такому форматі, і для даного методу не потрібно знати, які дійсні біологічні події «запускаються» рецептором. Агоністичні mAbs слідує «гуманізувати» перед використанням в клініці. Цей метод можна також використати для визначення антагоністичних mAbs. Подібні mAbs будуть визначатися за відсутністю атомістичної активності і здатності інгібувати взаємодії рецептор-ліганд, що простежується ELISA, класичними методами зв'язування або BIAcore. Нарешті, індукція секреції хемокинів різними клітинами у відповідь на атомістичне антитіло може бути тестом для скринінгу.

Приклад 6: скринінг інгібіторів взаємодії рецептор-ліганд.

Використовуючи рецепторний-Ig-злитий білок, можна тестувати комбінаторні бібліотеки на молекули, які можуть безпосередньо зв'язуватися з рецептором. Потім дані молекули можна тестувати в ELISA з використанням рецепторного-Ig-злитого білка і розчинної форми ліганду на здатність інгібувати взаємодію рецептор-ліганд. ELISA можна безпосередньо використати для скринінгу бібліотек різних природних продуктів і т.д. на інгібуючі сполуки. Рецептор можна трансфікувати в клітинну лінію таку, як лінія HT29, для постановки біологічного тесту (в цьому випадку за цитотоксичністю), який потім може дати тест для скринінгу.

Приклад 7: інгібування зростання пухлин in vivo

Ефективність BCMA-Ig як антагоніста зростання пухлин тестували з використанням ряду різних ліній пухлинних клітин в умовах in vivo. Для цих досліджень використали безтімусних мишей (Nu/Nu) з імунодефіцитом і пухлинні клітини імплантували підшкірно. Для пухлинної лінії SW480,

яка володіє агресивним зростанням, заявники імплантували 8×10^5 клітин в 100мкл не утримуючого пірогенів, стерильного PBS. Одну контрольну групу залишили необробленою (n=5), в той час як іншим групам ввели 100мкг контрольного-Ig (n=6) і 100мкг ВСМА-Ig (n=6). Введення почали безпосередньо перед імплантацією з подальшим введенням кожні 7 діб. Діаметр пухлин визначали мікрометром, і обчислювали об'єм з використанням формули об'єм = $4/3\pi r^3$.

Карцинома ободової кишки SW480 росте дуже швидко на моделі мишей Nu/Nu, і пальповані пухлини виявляли через 10 діб. Через 24 діб середній об'єм пухлин в контролі становив $0,3\text{см}^3$, в той час середній об'єм пухлин у мишей, оброблених ВСМА-Ig, дорівнював $0,19\text{см}^3$, зниження пухлинного навантаження на 46%. Карцинома ободової кишки HT29 також росте агресивно на моделі мишей Nu/Nu. Для цих дослідів 1×10^6 клітин в 100мкл

не утримуючого пірогенів, стерильного PBS імплантували підшкірно і схема введення була аналогічною описаній для SW480. Пальповані пухлини виявляли через 7 діб, і в контрольних групах велика частина пухлин росла дуже швидко. Через 42 діб середній об'єм пухлин в контрольних групах (необроблені і оброблені контрольним-Ig, n=12) дорівнював $0,485\text{см}^3$, в той час, як середній розмір пухлин в обробленій ВСМА-Ig групі (n=5) становив $0,095\text{см}^3$, зниження пухлинного навантаження на 80%. Через 50 діб 30% мишей в контрольній групі були оцінені, як такі, що знаходяться на термінальній стадії за рахунок розміру пухлин більше $1,5\text{см}^3$, і дослід був зупинений. У протилежність контрольній групі 0% мишей в групі, обробленій ВСМА-Ig, було оцінено, як такі, що знаходяться на термінальній стадії. Ці результати представлені в таблиці 2.

Таблиця 2

Об'єми пухлин і летальність на моделі HT29 через 50 діб лікування

Контрольні тварини (необроблені і оброблені контрольним Ig)		Оброблені ВСМА-Ig	
Об'єм пухлин	Термінальна стадія	Об'єм пухлин	Термінальна стадія
0,22	-	0,11	-
0,22	-	0,32	-
0,35	-	0,13	-
0,61	-	0,56	-
0,73	-	0,33	-
1,74	+		
2,53	+		
1,51	+		
0,90	-		
0,44	-		
0,32	-		
1,92	+	-	-
У середньому: 0,96	%:30	У середньому: 0,29	%:0

Вона показує 70% зниження об'єму пухлини і достовірний вплив на смертність на моделі зростання пухлини HT29 з використанням обробки ВСМА-Ig.

Лінія карциноми легені A549 росте повільніше, ніж лінії карциноми ободової кишки, описані вище. Для цієї клітинної лінії заявники імплантували 1×10^6 клітин в 100мкл не утримуючого пірогенів, стерильного PBS і обробляли з використанням схеми, описаної вище. Пальповані пухлини виявляли приблизно через 20 діб після імплантації. Через 50 діб після імплантації пухлин середній об'єм пухлин в контрольних групах (необроблені і оброблені контрольним Ig; n=16) становив $0,2\text{см}^3$, в той час, як середній об'єм в групі, обробленій ВСМА-Ig (n=7) дорівнював $0,1\text{см}^3$, зниження об'єму пухлин на 50%. У групі, обробленій ВСМА-Ig, у 57% мишей об'єм пухлин був менше $0,1\text{см}^3$ через 50 діб, в той час, як тільки 6% контрольних оброблених мишей зберігали таке невелике пухлинне навантаження. Через 60 діб після імплантації пухлин середній об'єм пухлин в контрольній групі збільшувався до $0,3\text{см}^3$. У протилежність середній об'єм пухлин в групі, обробленій ВСМА-Ig, складав як і раніше менше $0,2\text{см}^3$ (0,188).

Для мишачої лінії NIN3T3, яка також росте повільніше, ніж лінії карциноми ободової кишки, заявники імплантували 5×10^6 клітин в 100мкл не утримуючого пірогенів, стерильного PBS і обробляли, як описано вище. Клітини NIN3T3 утворювали фібросаркому при підшкірній імплантації у мишей Nu/Nu. Через 4 тижні виявляли пальповані пухлини, і в контрольних групах (n=11) ці пухлини зростали протягом подальших 10 діб до об'єму, що досягає середнього значення $0,136\text{см}^3$. У протилежність об'єм пухлин в групі, обробленій ВСМА-Ig (n=5), досягав значення тільки $0,03\text{см}^3$, 78% зниження пухлинного навантаження. На 48 добу після імплантації середній об'єм пухлин в контрольних групах досягав $1,6\text{см}^3$, в той час, як середній об'єм пухлин в групі, обробленій ВСМА-Ig, дорівнював тільки $0,8\text{см}^3$, 50% зниження об'єму пухлин. До 52 доби 82% (9/11) тварин в контрольних групах було оцінено, як такі, що знаходяться на термінальній стадії, засновуючись на об'ємі пухлин, який складав більше $1,5\text{см}^3$, тільки 18% тварин залишалося живими. У протилежність 40% (2/5) тварин в групі, обробленій ВСМА-Ig, мало пухлини такого об'єму, що їх необхідно було вбити, живими залишалося ще 60% тварин. Ці ре-

зультати представлені в таблиці 3.

Таблиця 3

Дані щодо виживаності на моделі NIN3T3

	Дні після імплантації			
Вживаність, %	38	42	48	52
Контроль	100	90	64	18
BCMA-Ig	100	100	80	60

Дані, що показують зростання пухлин NIN3T3 протягом часу, представлені на Фігурі 13. Дані, що показують зростання пухлин SW480 протягом часу, представлені на Фігурі 14. Дані, що показують зростання пухлин HT29 протягом часу, і діаграма розсіювання, що показує окремих тварин на 42 добу після імплантації пухлини, представлена на Фігурі 15A. Дані, що показують зростання пухлин A549 у окремих тварин на 50 і 60 добу після імплантації, представлені на Фігурі 15B.

Дані з інгібування зростання пухлин для лінії пухлинних клітин NIN3T3 представлені на Фігурі 13. Дані з інгібування зростання пухлин для лінії пухлинних клітин SW480 представлені на Фігурі 14. Дані з інгібування зростання пухлин для лінії пухлинних клітин HT29 і A549 представлені на Фігурі 15.

Приклад 8: BCMA-Ig спричиняє зниження кількості В-клітин у нормальних мишей

Мишей BALB/с самиць у віці восьми тижнів одержували з Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME).

Миші (3 групи) одержували внутрішньоочеревинно або PBS, з 400мкг людського злитого білка BCMA-hulG (hBCMA-Ig) (від Teresa Cachero, Biogen) або 400мкг очищеного людського IgG (HulG) (Sandoz, Basel, Швейцарія) на дні -8, -5, -1 і +2. Миші одержували 100мкл 10% суспензії овечих еритроцитів (SRBC) (Colorado Serum Company, Denver, CO) на 0 день.

При розкритті при пункції серця збирали кров в пробірки, що містять EDTA, і еритроцити лізували в гіпотонічному буфері. Кров також збирали без EDTA для приготування сироватки. Готували окремі клітинні суспензії з селезінки і брижових лімфатичних вузлів (MLN) і еритроцити лізували в гіпотонічному буфері. Проводили проточну цитометрію з використанням PE-кон'югованих анти-

CD45R/B220, анти-синдекан/CD138 і анти-B7.2 і ФІТЦ-кон'югованого анти-IgM і анти-CD45R/B220-антитіло. Все mAbs одержували від Pharmingen (San Diego, CA). Стисло, Fc-рецептори блокували 10мкг/мл Fc-блоку (Pharmingen) протягом 15хв. на льоду з подальшим додаванням PE- і ФІТЦ-кон'югованих mAbs, і інкубували на льоду протягом 20-30хв. Клітини промивали 1 раз і суспендували в 0,5% параформальдегіді. Дані з флуоресценції клітин одержували на проточному цитометрі FACSCalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA) і аналізували з використанням програмного забезпечення CELLQuest™ (Becton Dickinson).

Після обробки hBCMA-Ig було відмічено приблизно 50% зниження кількості В-клітин в периферичній крові і в досліджених периферичних лімфатичних органах. B220^{високи} і IgM^{низькі} В-клітини складали відповідно 23,4% і 21,5% клітин у мишей, оброблених PBS і HulG, в той час, як дана популяція становила тільки 9,9% клітин у мишей, оброблених hBCMA-Ig. Виявилось, що число плазматичних клітин (синдекан/CD138+) було декілька знижено при відповідно 5,7% і 4,8% в крові мишей, оброблених PBS і HulG, у порівнянні з 3,9% у мишей, оброблених hBCMA-Ig. Молекула B7.2 позитивно регулювалася відповідно при 3,1% і 4,5% B220+ клітин у мишей, оброблених PBS і HulG, у порівнянні з 1,9% у мишей, що одержали обробку hBCMA-Ig.

У селезінці кількість B220^{високих}-В-клітин була помітно нижче у мишей, оброблених hBCMA-Ig, і дорівнювало 18,8% у порівнянні з відповідно 36,7% і 40% у мишей, оброблених PBS і HulG. Дане зниження спостерігали в обох IgM^{високих} і IgM^{низьких} субпопуляціях (дивись таблицю 1). Не було змін в кількості щойно утворених В-клітин в селезінці, B220^{високих} IgM^{низьких} (Дані не представлені). Виявилось, що кількість плазматичних клітин (синдекан/CD138+) була декілька знижена при відповідно 3,3% і 3,4% в селезінці мишей, оброблених PBS і HulG, у порівнянні з 2,4% у мишей, що одержали hBCMA-Ig.

У MLN було встановлене зниження B220+ В-клітин при 14,1% у мишей, оброблених hBCMA-Ig, у порівнянні з відповідно 26,7% і 35,8% у мишей з обробкою PBS і HulG. Дані представлені в таблиці 4.

Таблиця 4

Популяції В-клітин у мишей, оброблених hBCMA-Ig, PBS і HulG

Кров	B220 ^{високи} , IgM ^{низькі}	Синдекан	B7.2/B220 ^{низькі}
Забуферений фосфатом фізіологічний розчин (PBS)	23,4±5,7	5,711,5	3,110,5
HulG	21,514,5	4,8±0,9	4,511,0
hBCMA-Ig	9,9±1,8	3,910,6	1,910,5
Селезінки	B220 ^{високи} , IgM ^{низькі}	B220 ^{високи} , IgM ⁺	Синдекан
Забуферений фосфатом фізіологічний розчин (PBS)	27,811,6	11,911,6	3,3±0,8
HulG	30,5±2	11,811,0	3,4±0,7
hBCMA-Ig	10,610,2	8,4±0,2	2,4±0,2
Брижові лімфатичні вузли	B220 ⁺		
Забуферений фосфатом фізіологічний розчин (PBS)	26,7		
HulG	35,8±3,3		
hBCMA-Ig	14,115,9		

літична анемія, ідіопатична тромбоцитопенічна пурпура, антифосфоліпідний синдром, хвороба Чагаса, хвороба Грейвса, грануломатоз Вегенера, поліартеріт нодозний і швидко прогресуючий гломерулонефрит. Терапевтичний агент буде також мати застосування при порушеннях, пов'язаних з плазматичними клітинами, таких, як множинна мієлома, макроглобулінемія Вальденстрема, захворювання, пов'язане з важким ланцюгом імуноглобулінів, первинний або пов'язане з імуноцитами амілоїдоз, моноклональна гамопатія незвичайного значення (MGUS). Онкологічні мішені будуть включати В-клітинну карциному, лейкемію і лімфому.

Фахівцям в даній області, очевидно, буде зрозуміло, що можна зробити різні модифікації і варіації в поліпептидах, композиціях і способах за винаходом, не змінюючи суті або об'єму винаходу. Таким чином, мається на увазі, що даний винахід включає модифікації і варіації даного винаходу за умови, що вони співпадають з об'ємом прикладеної формули винаходу і її еквівалентами.

Список последовательностей

<120> April Receptor (BCMA) and Uses Thereof

```
<140> not assigned yet
<141> 2000-10-05
```

<150> 60/215688
<151> 2000-06-30

<150> 60/181807
<151> 2000-02-11

<150> 60/257933
<151> 2999-10-06

<160> 12

<170> FastSEO for Windows Version 4.0

$\langle 210 \rangle$ 1
 $\langle 211 \rangle$ 736
 $\langle 212 \rangle$ ДНК
 $\langle 213 \rangle$ Мишача

<400> 1					
cgaacacgatg	agatttcctt	caatttttac	tgcagtttta	ttcgcagcat	ctccgcatt
acgtctcca	ctcaacacta	caacagaaga	tgaacggca	caaatctcgg	ctgaagctgt
catcggttac	tcagatttag	aaggggattt	cgattctgct	gttttgccat	ttccaacaga
cacaaatgac	tgcttatgtt	tataaataat	tactgtctgc	agcattctgt	ctaaagaaga
aggggtatct	ctcgaagaaa	gagaaacaaa	actcaattac	gaggaagatc	tgaataaaga
ctctccatct	gcctctgcat	tgtgtccagt	taccattacc	tccaaggact	ctgacgtgat
agagggtgatg	tggcaaccag	tacttaggcg	tgggagaggg	ctggaggccc	aggagagacat
tctacagctg	tgggaacagt	gaattttatc	ctctctagat	caggctctgt	ttctcagattg
gactttccaca	atgggtcactg	tgtgtattcg	ggaaggacaa	ggggaagaag	aaactctatt
ccgatgtatc	agaaagatgc	cttcctgatc	tgcacgtgcc	tacaatagct	gctcagatgc
aggggtcttt	catttaccatc	aaggggatat	tatcaattgc	anaatccac	ggcgaaacgc
aaaaacttagc	cttttccgcg	atggaacatt	ctctggggtt	gtgaactat	gagcggccgc
ctcttaattc	ccttca				

$\langle 210 \rangle$ 2
 $\langle 211 \rangle$ 736
 $\langle 212 \rangle$ ДНК
 $\langle 213 \rangle$ Мишача

<400> 2
ggtttgctac tctaaaggaa gttaaaaatg acgtcaaaat aagcgtcgta ggaggcgtaa 60
tcgacgaggt cagttgtgat gttgtcttct actttgccgt gtttaagccc gacttcgaca 120

```

gtagccaatg agtctaaatc tccccctaaa gctacaacga caaaacggta aaaggttggtc 180
gtgtttattg cccaataaca aatatttarg atgataacgg tctgaacgac gatttcttct 240
tccccataga gagctctttt ctcttgtttt tgagtaaaga ctctctctag acttatttct 300
cgagggtgag caggacgtag aacaaggcca attgtaattg aggttccctga gactgcaactg 360
tctccactac accgttgggtc atgaatccgc accctctccg gacctccggg tccctctgta 420
acatgctcag accctgtgac cttaaataga cagatatatc gtccaggaca aagtactaca 480
ctgaagaagt taccagttcc accatagagc ccttctctgt cctctctctc tttagataaa 540
ggctacatag tcttcatacg gaagactagg actggcacgg atgttatcga cgtatgcacg 600
tccacagaaa gtaaatgtag tccccctata atagtgcacg ttttaagggt cccgtttgctg 660
ttttgaatcg gaaagaggcg taccctgtaa ggaccccaaa cactttgata ctgcggcgcg 720
cttaattaag cggaaat

```

<210> 3

<211> 234

<212> PRT

<213> Людська

<400> 3

```

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

```

<210> 4

<211> 542

<212> ДНК

<213> Людська

<400> 4

```

ttaatcaaaa catggctatc atctacctca tctctctgtt caccgctgtg cggggcgatt 60
acaagacga tgacgataaa ggacccggac aggtgcagct gcagaaacag aagaagcagc 120
actctgtctt gcacctgggt cccattaacg ccacctccaa ggaatgactcc gatgtgacag 180
agggtgatgt gcaaccagct cttaggcggt ggagaggctt acaggcccaa ggaatagggt 240
tccgaatcca ggaatcggtg gtttatctgc tctatagcca ggtcctgttt caagacgtga 300
ctttcaccat ggttcagggt gtgtctctgag aaggccaagg aaggcaggag actccattcc 360
gatgtataag aagtatgccc tccccccggg accggggccta caacagctgc tatagccgag 420
cgctcttcca ttacacccaa ggggatattc tgagtgtcat aattccccgg gcaaggcgca 480
aacttaacct ctctccaca: ggaaccttcc tgggggttgt gaaactgtga tctagagggc 540
cc

```

<210> 5

<211> 542

<212> ДНК

<213> Людська

<400> 5

```

aattagtttt gtaccgatac tagatggagt aggagggaca gtggcgacac gccccgctaa 60
tgcttctgct actgctatct cctgggcccgt tccacctcga cgtctctgct ttttctgctg 120
tgagacagga cgtggaccaa gggtaattgc ggtggagggt cctactgagg ctacactgct 180
cccactacac cgttggctga gaactcgcac cctctccgga tctccgggtt cctataccaa 240
aggcttaggt cctacgacct caaatagacg acatacgg: ccaggacaaa gttctgcaat 300
gaaagtggta cccagttccac cacagagctt tccgggttcc tctctctctc tgagataaagg 360
ctacatatct ttcatagcgg aggggtgggccc tggcccggtg gttgtcgacg atatcgctgc 420
cacagaaggt aaatgvggtt cccctataag acccacagta ttaaggggct cgttcccgct 480
ttgaaatgga gagagggttc ccttggaggg accccaaaca ccttgacact acatctcccg 540
gg

```

<210> 6

<211> 172

<212> PRT

<213> Людська

<400> 6

```

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

```


<210> 7
 <211> 555
 <212> ДНК
 <213> Людська

<400> 7
 atgttgaga tggctgggca gtgttcccaa aatgaatatt ttgacagttt gttgcatgct 60
 tgcatacctt gtcaacttcg atgtttctct aatactcctc ctctaacatg tcagcggtat 120
 tgtaatgcaa gtgtgaccaa ttcaagtcaa ggaacgaatg cgattctctg gacctgtctg 180
 ggactgagct taataatttc ttgtggcagtt ttctgtctaa tgtttttgct aagggaagata 240
 agctctgaac cattaaagga cgagtttaaa aacacaggat caggtctcct gggcatggct 300
 aacattgacc tggaaaagag caggactggt gatgaatta ttcttcagag aggcctcgag 360
 tacacgggtg aagaatgcac ctgrgaagac tgcataaga gcaaacgaa ggtcgactct 420
 gaccattgct ttccactccc agctatggag gaaggcgcaa ccattcttgt caccacgaaa 480
 acgaatgact attgcaagag cctgccagct gctttgagtg ctacggagat agagaaacca 540
 attttctgta ggtaa 555

<210> 8
 <211> 184
 <212> PRT
 <213> Людська

<400> 8
 Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser
 1 5 10 15
 Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Asn Thr
 20 25 30
 Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser
 35 40 45
 Val Lys Gly Thr Asn Ala Ile Leu Trp Thr Cys Leu Gly Leu Ser Leu
 50 55 60
 Ile Ile Ser Leu Ala Val Phe Val Leu Met Phe Leu Leu Arg Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Ser Glu Pro Leu Lys Asp Glu Phe Lys Asn Thr Gly Ser Gly Leu
 85 90 95
 Leu Gly Met Ala Asn Ile Asp Leu Glu Lys Ser Arg Thr Gly Asp Glu
 100 105 110
 Ile Ile Leu Pro Arg Gly Leu Glu Tyr Thr Val Glu Glu Cys Thr Cys
 115 120 125
 Glu Asp Cys Ile Lys Ser Lys Pro Lys Val Asp Ser Asp His Cys Phe
 130 135 140
 Pro Leu Pro Ala Met Glu Glu Gly Ala Thr Ile Leu Val Thr Thr Lys
 145 150 155 160
 Thr Asn Asp Tyr Cys Lys Ser Leu Pro Ala Ala Leu Ser Ala Thr Glu
 165 170 175
 Ile Glu Lys Ser Ile Ser Ala Arg
 180

<210> 9
 <211> 483
 <212> ДНК
 <213> Людська

<400> 9
 gtggaagcta caagaagatt atgaggagga gattgtacag tcgcaataac attacgttca 60
 cactgggttaa gtcaacttcc ttgtctacgc taagagagctt ggacaaaccc tgactcgaa 120
 tattaaagaa accgtcaaaa ccaagattac aaaaacgatt ccttctatcc gagacttggt 180
 aatttctctg tcaaatTTTT ttgtctctagt ccaagaggacc cgtaccgatt gtaactggac 240
 attttctctg cctgaccact actttaataa gaaggctctc cggagctcat ggtccacact 300
 cttacgttga cacttctgac gtatgtctctg ttgtgtctcc agctgagact ggttaacgaa 360
 ggtgagggtc gatacctctc tctcggttgg taagaacagt ggtgcttttg cttactgata 420
 acgttctctg acgtgtgacg aaactcacga tgcctctatc ccttttagta aagacgatcc 480
 att 483

<210> 10
 <211> 483
 <212> ДНК
 <213> Людська

<400> 10
 caactctgat gttctcttaa tactctctct ctaacatgic agcgttatg taatgcaagt 60
 gtgaccaatt cagtgaagg aacgaatgcg attctcttga cctgtttggg actgagctta 120
 abatttctt tggcagtttt cgtgctaagt ttcttcttaa ggaagataag ctctgaacca 180
 ttaaggagcg agtttaaaaa cacaggatca ggtctcttgg gcatgctaa catcgacctg 240
 gaaagagaca ggcctgttga tgaattatt ctctcgagag gccctgagta caggttggaa 300
 gaatgcactt gtgaagactg catcaagagc aaactggaag tgcactctga ccattgcttt 360
 ccactccag ctatggagga aggcgcaacc attcttctca ccacgaaac gaatgactac 420
 tgcgaagacc tgcagctgc ttgtgtgct acggagatag agaaatcaat tcttctaggg 480
 taa 483

<210> 11
 <211> 906
 <212> ДНК
 <213> Людська

<400> 11
 atggagacag acacactcct gttatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
 gacgtcacga tgttgcagat ggctgggagc tgtctccaaa atgaataatt tgacagtttg 120
 ttgcatgctt gcatcacttg tcaacttctg tgttctctta atactctcc cttaacatgt 180
 cagcgttatt gtaatgcaag tctgaccaat tcagtgaag gagtgcacaa aactcacaca 240
 tgccaccctg gccacgacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttctt ctcccccca 300
 aaacccaagg acacccctcat gatctcccg accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac 360
 gtgagccacg aagaccctga ggtcaagtcc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 420
 aatgccaaag caaagcccg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgctc 480
 ctacccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcga ggtctccaac 540
 aaagccctcc cagcccccat cgagaaaaac atctccaaag ccaagggca gccccgagaa 600
 ccacagggtg acacccctgccc ccatcccggt gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg 660
 acctgcctgy tcaaggctct ctatccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 720
 cagccggaga acaactacaa gaccacgctt cccgtgttgg actccgacgg ctccctcttc 780
 ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctctatgc 840
 tccgtgatgc atgaggtctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgctctcc 900
 gggaaa 906

<210> 12
 <211> 302
 <212> PRT
 <213> Людська

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

Карта мус-мишачої APRIL-конструкції pCCM213.10 для експресії в *Pichia pastoris*

CCAAACG ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCA GTT TTA TTC GCA GCA TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA
 GGTTCG TAC TCT AAA GGA AGT TAA AAA TGA CGT CAA AAT AAG CGT CGT AGG AGG CGT AAT CGA CGA GGT CAG TTG TGA TGT
 H R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T

ACA GAA GAT GAA ACG GCA CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC TAC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC GAT GTT GCT GTT
 TGT CTT CTA CTT TGC CGT GTT TAA GGC CGA CTT CGA CAG TAG CCA ATG AGT CTA AAT CTT CCC CTA CAG CAA CGA CAA
 T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D V A V

TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG
 AAC GGT AAA AGG TTG TCG TGT TTA TTG CCC AAT AAC AAA TAT TTA TGA TGA TAA CGG TCG TAA CGA CGA TTT CTT CTT CCC
 L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A A K E E G

GTA TCT CTC GAG AAA AGA GAA CAA AAA CTC ATT TCT GAG GAA GAT CTG AAT AAA GAG CTC CAC TCA GTC CTG CAT CTT GTT
 CAT AGA GAG CTC TTT TCT CTT GTT TTT GAG TAA AGA CTC CTT CTA GAC TTA TTT CTC GAG GTG AGT CAG GAC GTA GAA CAA

V S L E K R E Q K L I S E E D L N K E L H S V L H L V

CCA GTT AAC ATT ACC TCC AAG GAC TCT GAC GTG ACA GAG GTG ATG TGG CAA CCA GTA CTT AGG CGT GGG AGA GGC CTG GAG
 GGT CAA TTG TAA TGG AGG TTC CTG AGA CTG CAC TGT CTC CAC TAC ACC GTT GGT CAT GAA TCC GCA CCC TCT CCG GAC CTC
 P V N I T S K D S G D V T E V H W Q F V L R R G R G L E

GCC CAG GGA GAC ATT GTA CGA GTC TGG GAC ACT GGA ATT TAT CTG CTC TAT AGT AGT CAT GTC CTC TTT CAT GAT GTG ACT TTC
 CGG GTC CCT CTG TAA CAT GCT CAG ACC CTG TGA CCT TAA ATA GAC GAG ATA TCA GTC CAG GAC AAA GTA CTA CAC TGA AAG
 A Q G D I V R V W D T G I Y L L Y S Q V L F H D V T F

ACA ATG GGT CAG GTG GTA TCT CGG GAA GGA CAA GGG AGA AGA GAA ACT CTA TTC CGA TGT ATC AGA AGT ATG CCT TCT GAT
 TGT TAC CCA GTC CAC CAT AGA GCC CTT CCT GTT CCC TCT TCT TGA GAT AAG GCT ACA TAG TCT TCA TAC GGA AGA CTA
 T M G Q V V S R E G Q G R R E T L F R C I R S N P S D

CCT GAC CGT GCC TAC AAT AGC TGC TAC AGT GCA GGT GTC TTT CAT TTA CAT CAA GGG GAT ATT ATC ACT GTC AAA ATT CCA
 GGA CTG GCA CGG ATG TTA TCG ACG ATG TCA CGT CCA CAG AAA GTA AAT GTA GTT CCC CTA TAA TAG TGA CAG TTT TAA GGT
 P D R A Y N S C Y S A G V F H L H Q G D I I T V K I P

CGG GCA AAC GCA AAA CTT AGC CTT TCT CCG CAT GGA ACA TTC CTG GGG TTT GTG AAA CTA TGA GCGGCCGCAATTAATTCGCCCTTA
 GCC CGT TTG CGT TTT GAA TCG GAA AGA GGC GTA CCT TGT AAG GAC CCC AAA CAC TTT L ATC ACT CGCGGCCGCTTAATTAAGCGGAAT
 R A N A K L S L S P H G T F L G F V K L

Фиг. 3B-1

Фиг. 3B-2

Фиг. 3B-3

```

1 ATGGAGACAG ACACACTCCT GTTATGGGTG CTGCTGCTCT GGGTCCAGG TTCCACTGGT
>1 M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G

61 GACGTCACGA TGTTCAGAT GGCTGGGCAG TGCTCCCAA ATGAATATTT TGACAGTTTG
>21 D V T M L Q M A G Q C S Q N E Y F D S L

121 TTGCATGCTT GCATACCTTG TCAACTTCGA TGTCTTCTA ATACTCCTCC TCTAACATGT
>41 L H A C I P C Q L R C S S N T P P L T C

181 CAGCGTTATT GTAATGCAAG TGTGACCAAT TCAGTGAAAG GAGTCGACAA AACTCACACA
>61 Q R Y C N A S V T N S V K G V D K T H T

241 TGCCCCACCGT GCCCAGCACC TGAACCTCTG GGGGGACCGT CAGTCTTCCT CTCCCCCCA
>81 C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P

```

Фиг. 3B

Фиг. 3B-1

```

301 AAACCCAAGG ACACCTCAT GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACATGCGT GGTGGTGGAC
101 K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D

361 GTGAGCCACG AAGACCCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG TGGACGGCGT GGAGGTGCAT
121 V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H

421 AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG TACAACAGCA CGTACCGTGT GGTGAGCGTC
141 N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V

481 CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAT GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC
161 L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N

541 AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA
181 K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E

601 CCACAGGTGT ACACCTGCC CCCATCCCGG GATGAGCTGA CCAAGAACCA GGTGAGCCTG
201 P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L

661 ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG
221 T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G

```

Фиг. 3B-2

```

721 CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT CCCGTGTTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC
>241 Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F

781 CTCTACAGCA AGCTCACCGT GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTCTCATGC
>261 L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C

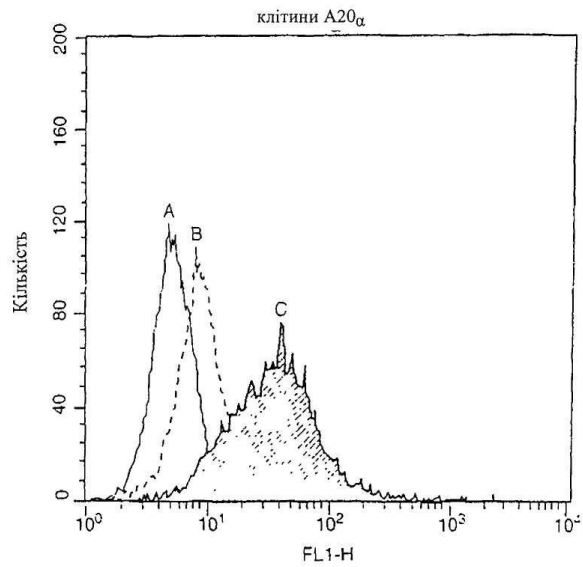
841 TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCC
>281 S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P

901 GGGAAA
>301 G K

```

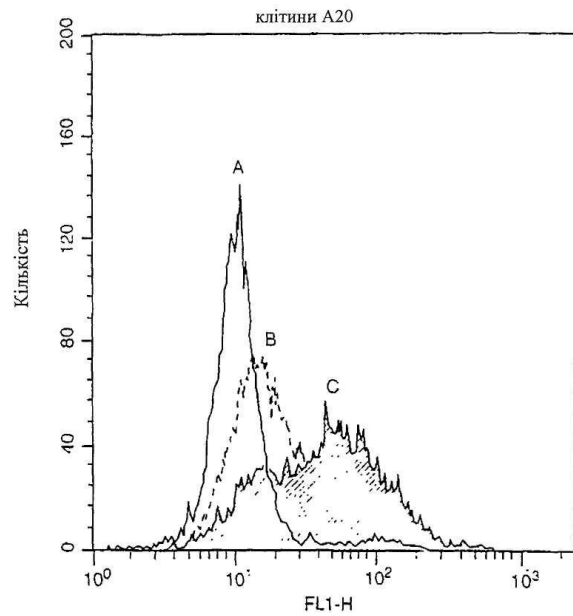
Фигура 3B: приклад гена, що кодує злитий білок huBCMA-hulG1. Походження нуклеотидної і амінокислотної послідовності злитого білка huBCMA-hulG1 з експресуючого вектора pJST538 є наступним: сигнальний пептид, одержаний з кДНК мишачого Ig карра кодується нуклеотидами 1-66 (амінокислоти 1-22); багатий цистеїном домен людського BCMA відділений і кодований нуклеотидами 70-222 (амінокислоти 24-74); hulG1 кодується нуклеотидами 226-909 (амінокислоти 76-302); неключові залишки вводили в області зчленування при клонуванні (амінокислоти (23 і 75). Стрілка-показник показує передбачуваний сайт відщеплення сигнальної послідовності.

Фиг. 3B-3



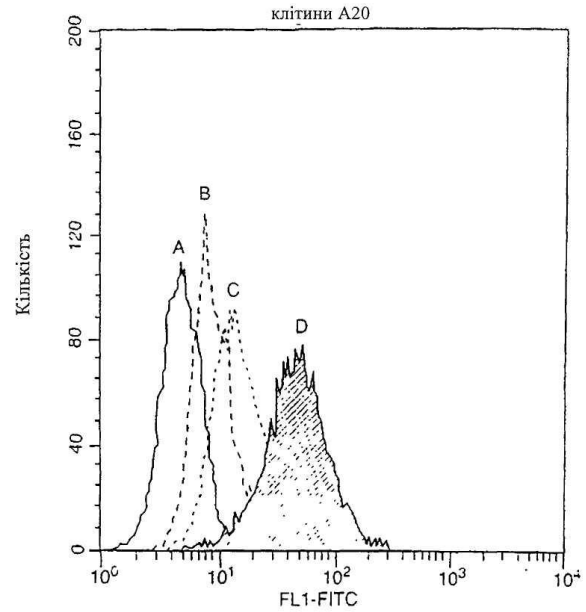
A: незабарвлені клітини
 B: контрольна кроляча сироватка 1532
 C: 450 нг APRIL + R1532

Фіг. 4А



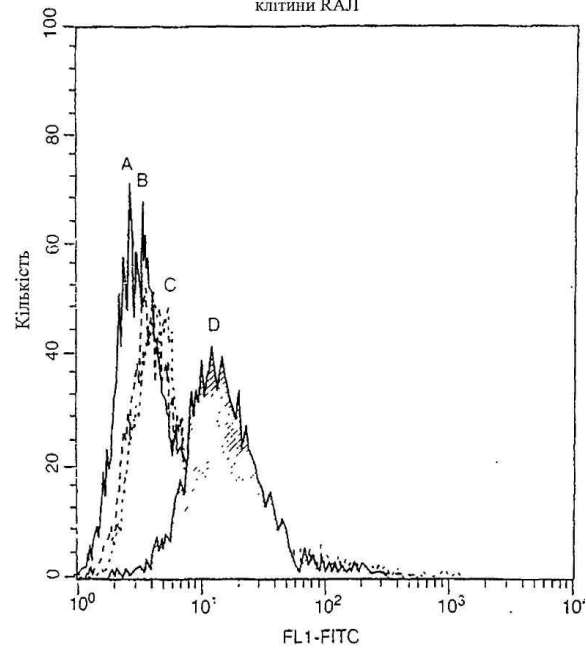
A: 450 нг APRIL + невідповідна кроляча сироватка
 B: контрольна кроляча сироватка 1532
 C: 450 нг APRIL + R1532

Фіг. 4С



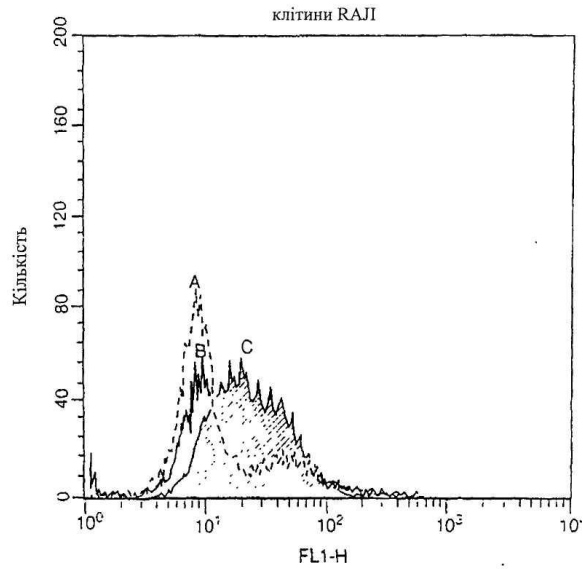
A: незабарвлені клітини
 B: контрольна кроляча сироватка 1532
 C: 1 мкг RANK-L + R1532
 D: 450 нг mAPRIL-R + R1532

Фіг. 4В

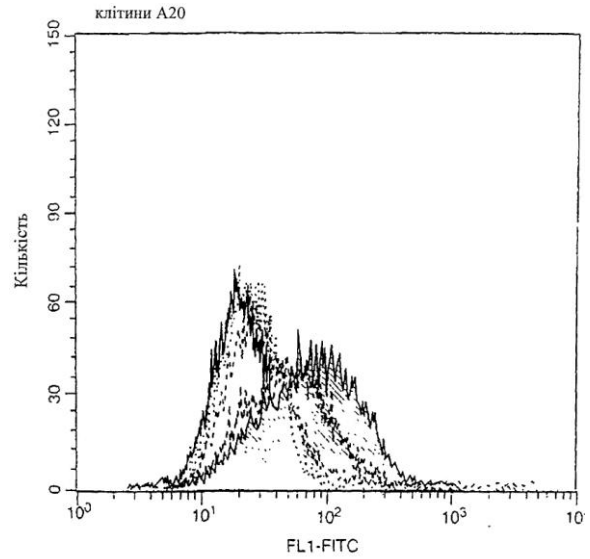


A: незабарвлені клітини
 B: контрольна кроляча сироватка 1532
 C: 1 мкг RANK-L + R1532
 D: 450 нг APRIL-R + R1532

Фіг. 5А



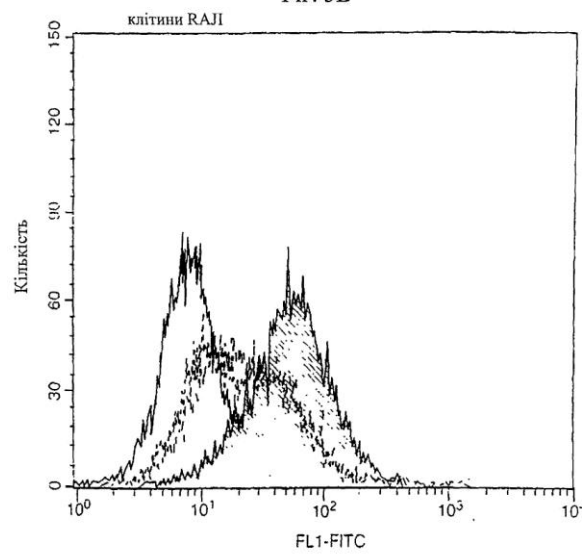
A: 450 нг APRIL + невідповідна кроляча сироватка
 B: контрольна кроляча сироватка 1532
 C: 450 нг APRIL + R1532



— : контроль R1532
 □ : зв'язування APRIL (450нг)
 --- : APRIL + людські BAFF (1 мкг)
 : APRIL + мишачі BAFF (1 мкг)

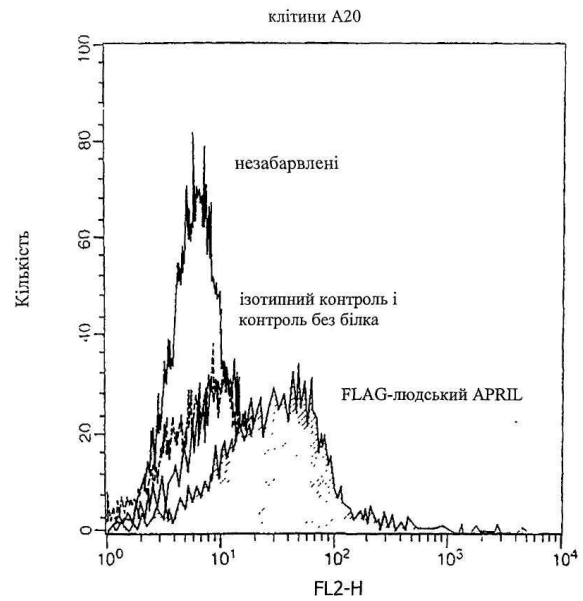
Фіг. 5B

Фіг. 6A

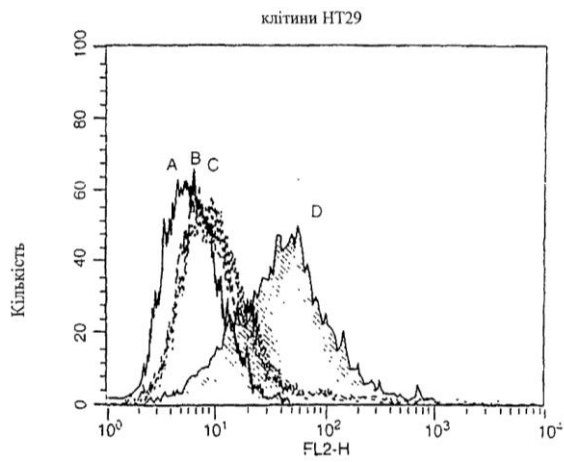


— : контроль R1532
 --- : зв'язування APRIL (450нг)
 : APRIL + людські BAFF (1 мкг)
 □ : APRIL + BCMA-Ig (1 мкг)

Фіг. 6B



Фіг. 7A

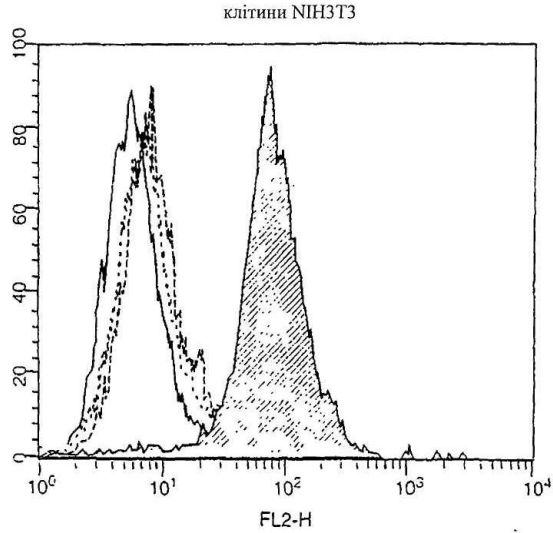


A: незабарвлені клітини

В: контроль без білка + біотинільовані анти-FLAG-mAb M2

C: 1 мкг/мл FLAG-APRIL + біотинільовані ізотипні контрольні mAb

D: 1 мкг/мл FLAG-APRIL + біотинільовані MW анти-FLAG-mAb

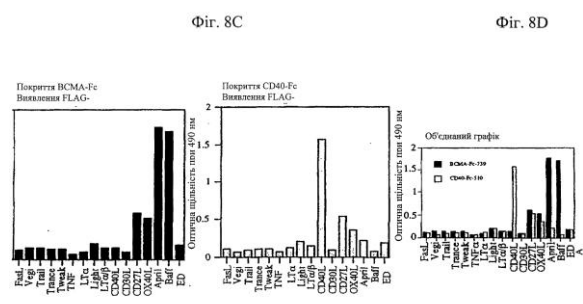
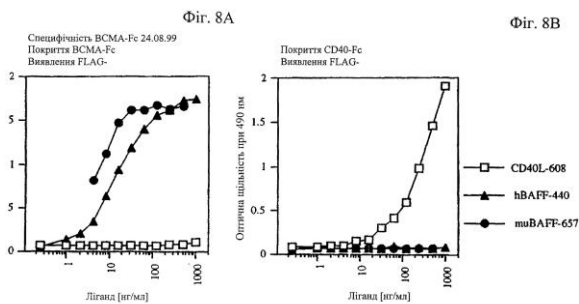
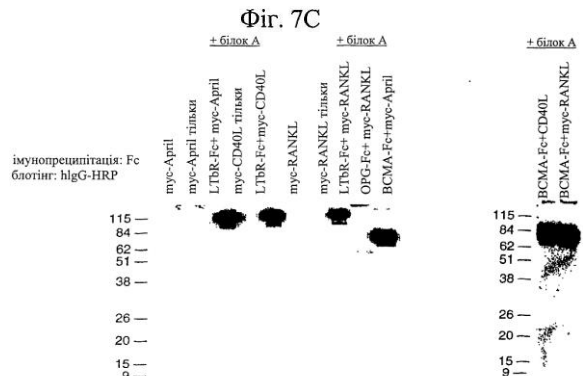
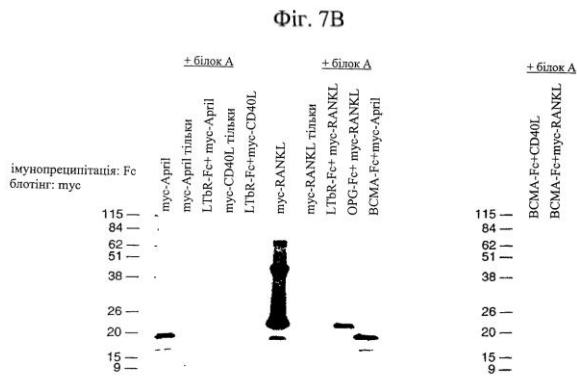


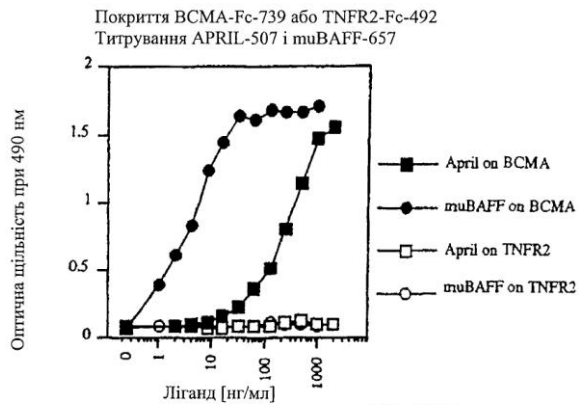
A: незабарвлені клітини

В: контроль без білка + біотинільовані анти-FLAG-mAb M2

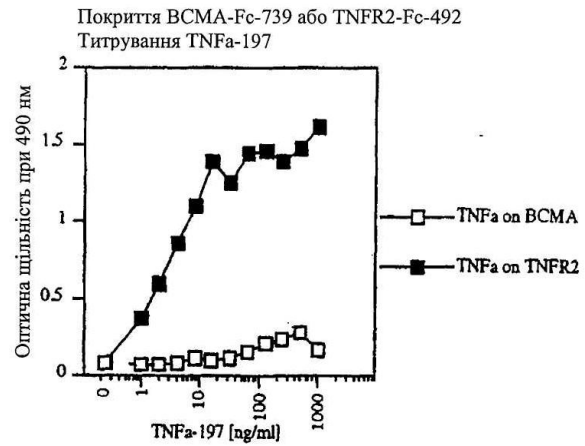
C: 1 мкг/мл FLAG-APRIL + біотинільовані ізотипні контрольні mAb

D: 1 мкг/мл FLAG-APRIL + біотинільзовані MW анти-FLAG-mAb

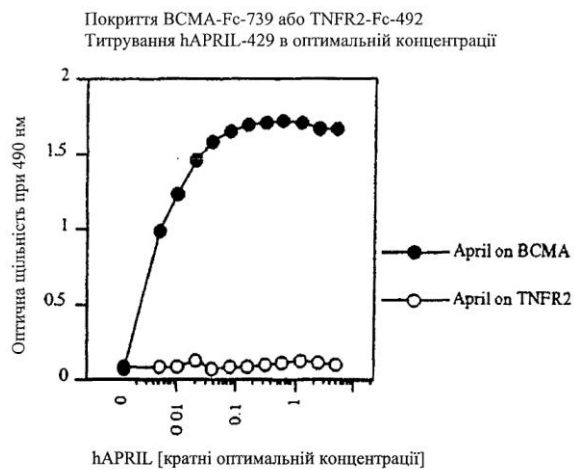




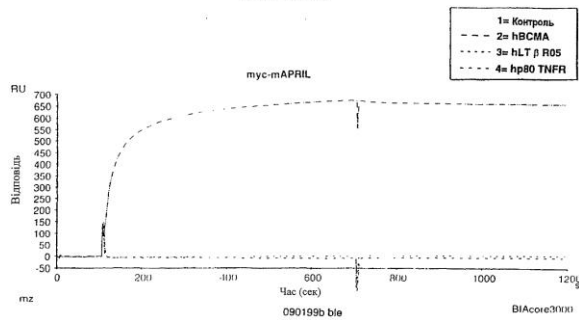
Фіг. 9B-1



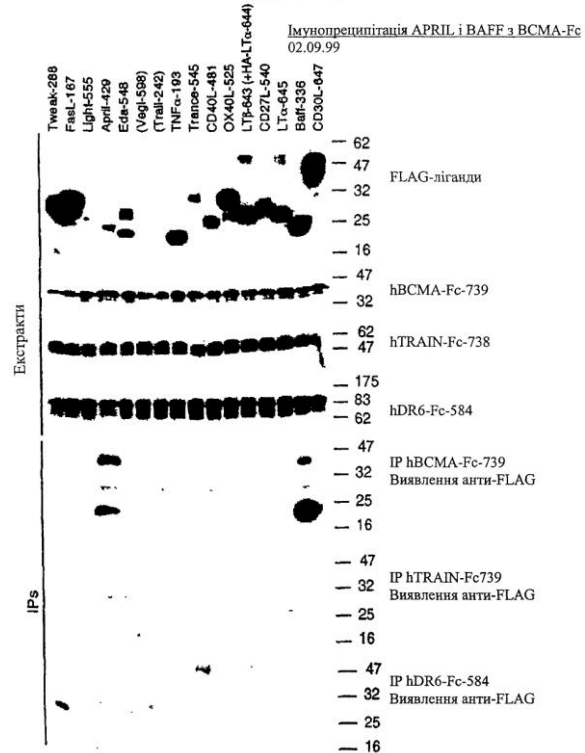
Фіг. 9B-2



Фіг. 9B-3

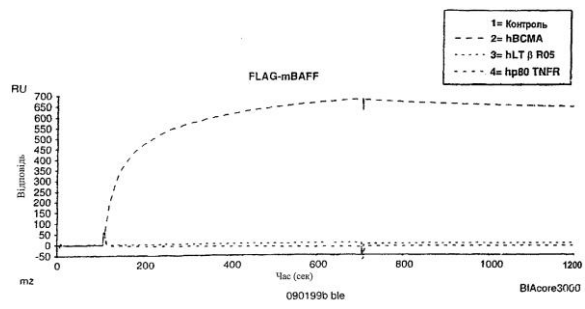


Фіг.11A

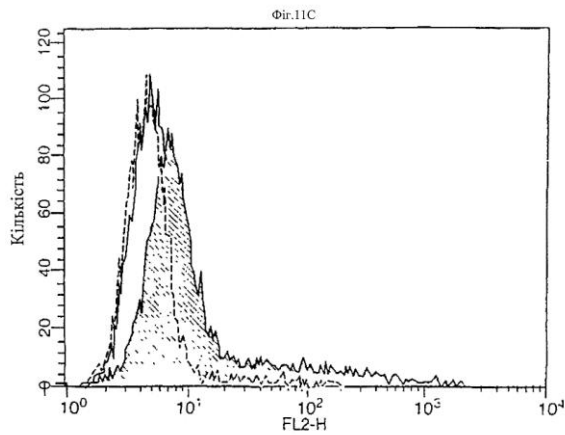
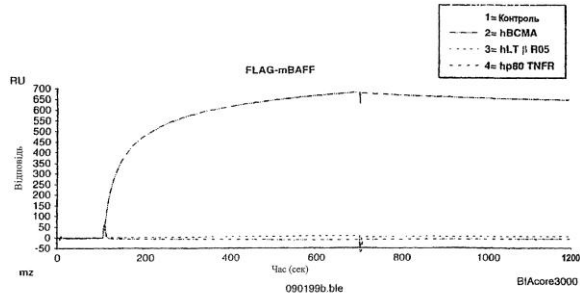


Трансфект 293Т з вказаною експресуючою плазмідною для експресії
(Res-Fc- або FLAG-ліганд) на чашці діаметром 9 см

Фіг. 10

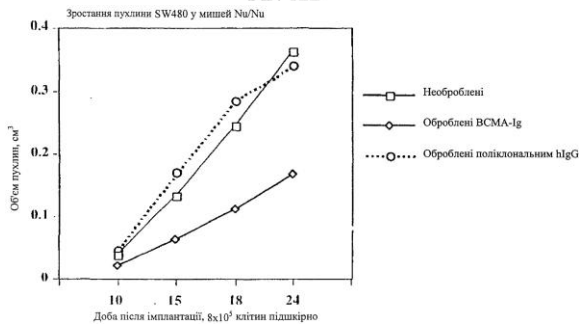


Фіг.11B

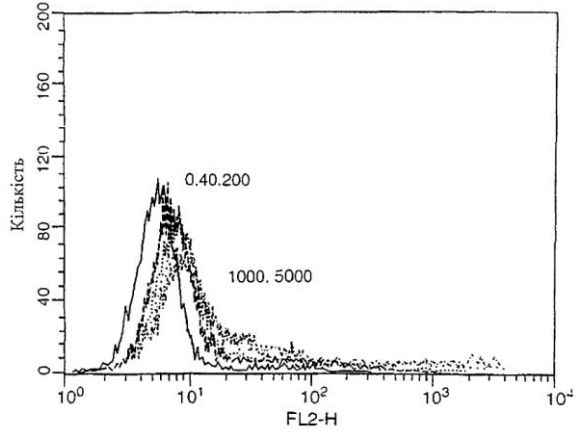


Клітини 293EB NA, трансфіковані повною довжиною hBCMA, були пофарбовані
 А: контрольна кроляча сироватка (R1532)
 В: 200 нг/мл тус-mAPRIL + 1 мкг/мл DCMA-Ig
 С: 200 нг/мл тус-mAPRIL

Фіг. 12B

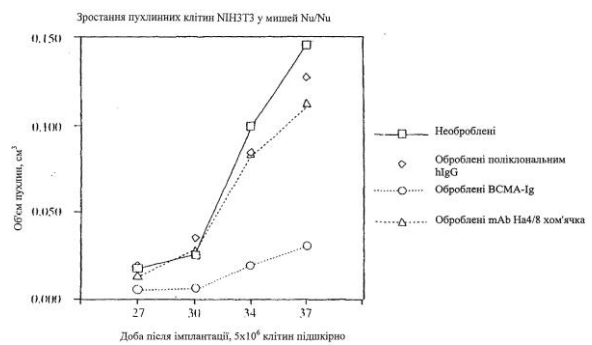


Фіг. 12C

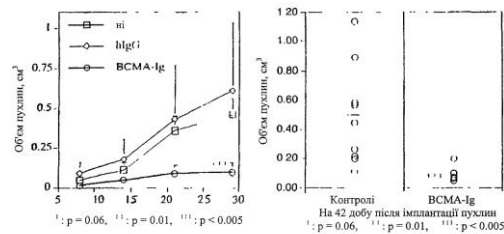


Клітини 293EB NA, трансфіковані повнорозмірним hBCMA, пофарбували 0, 40, 200, 1000 або 5000 мкг/м тус-APRIL. Кроляча анти-APRIL-антисироватка (R1532) і PE-мічений ослиний анти-кролячий-IgG

Фіг. 12A



Фіг. 13



Фіг. 14A

Фіг. 15A

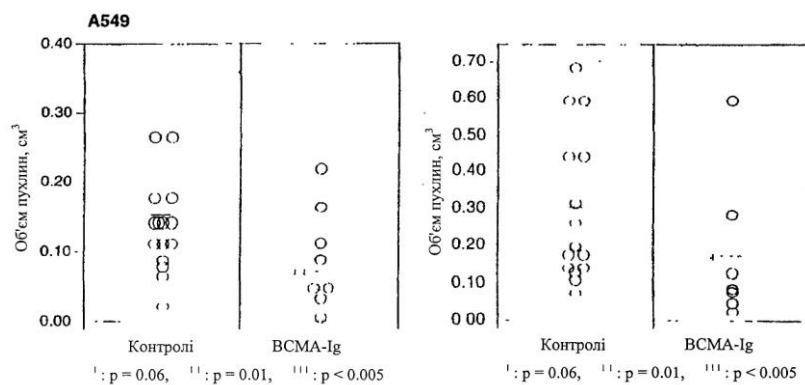
Фіг. 15B

Фіг. 15

51

74798

52



Фіг.15В