



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1622995 B

(45) 授权公告日 2013. 09. 04

(21) 申请号 01819084. 7

(22) 申请日 2001. 09. 06

(30) 优先权数据

60/233, 152 2000. 09. 18 US

60/234, 140 2000. 09. 21 US

60/268, 499 2001. 02. 13 US

60/312, 185 2001. 08. 14 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2003. 05. 19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2001/028006 2001. 09. 06

(87) PCT申请的公布数据

W02002/024909 EN 2002. 03. 28

(73) 专利权人 比奥根艾迪克 MA 公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 克里斯廷·M·安布罗斯

杰弗里·S·汤普森

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 巫肖南 封新琴

(51) Int. Cl.

C12N 15/12(2006. 01)

C12N 15/62(2006. 01)

C12N 15/10(2006. 01)

C07K 14/715(2006. 01)

C07K 16/28(2006. 01)

C07H 21/04(2006. 01)

C12Q 1/68(2006. 01)

A61K 38/17(2006. 01)

A61K 48/00(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

审查员 王启扬

权利要求书1页 说明书57页

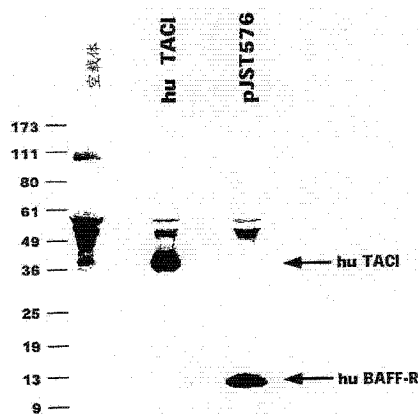
序列表27页 附图27页

(54) 发明名称

新的受体核酸及多肽

(57) 摘要

本发明公开了编码 BAFF-R 多肽的核酸,还公开了抗 BAFF-R 多肽的抗体,以及含这些物质的药物组合物。另外,本发明还提供了用本发明所述核酸、多肽、抗体以及药物组合物治疗致瘤性疾病及自身免疫疾病的方法。



1. 分离的多肽,其由氨基酸序列 SEQ ID NO :12 组成。
2. 分离的核酸分子,编码权利要求 1 的多肽。
3. 抗体或包含抗体的抗原结合部分的多肽,其中抗体或多肽的抗原结合部分特异性地与 SEQ ID NO :13 结合。
4. 权利要求 3 的抗体或多肽,其中抗体或多肽的抗原结合部分是下列中的一种或多种:
 - (a) 单克隆的;
 - (b) 多克隆的;
 - (c) 嵌合的;
 - (d) 人源化的;
 - (e) 单链抗体;
 - (f) Fab 片段;和
 - (g) F(ab)' 2 片段。
5. 权利要求 3 的抗体或多肽,其中抗体或多肽的抗原结合部分阻断 BAFF 与 BAFF-R 的结合。
6. 权利要求 5 的抗体或多肽,其中所述抗体或所述多肽的抗原结合部分是人源化的。
7. 药物组合物,包含权利要求 1 的多肽。
8. 药物组合物,包含权利要求 3 的抗体。
9. 权利要求 1 的多肽在制备用于抑制 B 细胞生长的药物中的用途。
10. 权利要求 3 的抗体或包含抗体的抗原结合部分的多肽在制备用于抑制 B 细胞生长的药物中的用途。

新的受体核酸及多肽

技术领域

[0001] 本发明提供了一种新的受体蛋白。本发明广义上涉及一种核酸及多肽。本发明更具体地涉及编码与 BAFF 受体相关的多肽的核酸,该受体是一种 B 细胞活化因子,属于肿瘤坏死因子 (TNF) 家族,与 B 细胞及免疫球蛋白的表达相关。该受体可用于治疗癌症、淋巴瘤、自身免疫疾病或 B 细胞有关的遗传性疾病。

背景技术

[0002] 本发明涉及一种属于 TNF 家族的新的受体。该新的受体被称作 BAFF 受体 ("BAFF-R")。

[0003] TNF 家族由多对的配体及它们的特异性受体组成,分别称为 TNF 家族配体和 TNF 家族受体 (Bazzoni and Beutler (1996) N. Engl. J. Med. 334 (26) :1717-1725)。该家族参与免疫系统可能还有其他非免疫系统的调控。所述调控通常处于“控制开关”水平,以致于 TNF 家族信号能够引发大量以 TNF 为特征的继发反应。TNF 能启动有机体针对外来入侵者的一般的保护性炎症反应,这种反应包括:改变参与细胞运输的粘附分子的表达,产生趋化因子以驱动特异性细胞到特定腔室以及活化各种效应细胞。因此,调控这些途经具有临床应用前景。

[0004] 所述 TNF 家族细胞因子介导的各种细胞应答的诱导被认为是通过它们与特异性细胞受体的结合来启动的。目前已经鉴定出了至少两种不同的 TNF 受体,分子量约 55kDa (TNFR1) 和 75kDa (TNFR2) (Hohman et al. (1989) J. Biol. Chem. 264 :14927-14934 ;和 Brockhaus et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 :3127-3131)。广泛的多态性与这两种 TNF 受体基因有关。这两种 TNFR 都具有细胞表面受体的典型结构,包括胞外区、跨膜区及胞内区。1 型和 2 型 TNFR 的胞外部分都包含 4 个富半胱氨酸结构域 (CDR) 的重复氨基酸序列模式。类似的 CDR 重复模式也存在于其他数种细胞表面蛋白中,包括 p75 神经生长因子受体、B 细胞抗原 CD40 等。

[0005] 这些受体是阐释生物途经的有力工具,因为它们易于转化为免疫球蛋白融合蛋白。这些二聚的可溶性受体形式是那些分泌型或表面结合型配体介导的事件的良好抑制剂。通过与这些配体结合,它们便可阻止这些配体与细胞相连受体间的相互作用,而这种相互作用能够释放信号。

[0006] 这些受体-Fc 融合蛋白不仅具有试验价值,而且就 TNF-R-Fc 而言,它们还可以在临床上与 OKT3 联合给药用于治疗炎症肠道疾病 (inflammatory bowel disease)、类风湿性关节炎以及急性临床综合征 (Eason et al. (1996) Transplantation 61 (2) :224-228 ; Feldmann et al. (1996) Int. Arch. Allergy Immunol. 111 (4) :362-365 ; 和 van Dulleman et al. (1995) Gastroenterol. 109 (1) :129-135)。可以设想,对所述 TNF 家族受体发送信号而介导的多种事件进行操纵可以广泛地用于治疗以免疫为基础的疾病,另外还可用于治疗多种因免疫系统参与而具有病理性后遗症的人类疾病。一种近来发现的可溶型受体, osteoprotegerin,它能够阻止骨质的流失,因此 TNF 家族受体信号调控的事件不一定仅限

于对免疫系统的调控 (Simonet et al. (1997) Cell 89(2) :309-319)。所述受体的抗体能阻断配体的结合,因而也具有临床用途。这些抗体通常寿命很长,与那些血液半衰期较短的可溶性受体-Fc 融合蛋白相比具有优势。

[0007] 尽管对所述受体介导途径的抑制具有最广阔的治疗应用开发前景,但是最初显示出临床作用的却是 TNF 受体的活化 (Aggarwal 和 Natarajan(1996) Eur Cytokine Netw. 7(2) :93-124)。由于 TNF 受体的活化能够引发靶细胞的细胞死亡,因而将其用于治疗肿瘤无论是过去还是现在都是引人注目的 (Eggermont et al. (1996) Ann. Surg. 224(6) :756-765)。受体的活化可以通过给药配体即天然途径或者给药抗体来实现,这些抗体能够与受体交联因而也是有效的激动剂。由于这些抗体与那些血液半衰期一般比较短的配体相比,它们在血液中长期存在,因而在肿瘤学方面有优势。由于这些受体中许多受体在肿瘤中的表达是受到较严格挑选的,或者它们只发出肿瘤的细胞死亡或分化信号,因此,激动剂抗体可能成为治疗癌症的有力武器。类似地,多数有利的免疫反应都是通过 TNF 家族的介导的,例如宿主炎症反应、抗体的生成等,因此激动抗体在其他非肿瘤领域也有有益效果。

[0008] 看似矛盾的是,对一途径的抑制在肿瘤治疗上也有有益的临床效果。例如,Fas 配体表达于一些肿瘤,而且这种表达能导致 Fas 阳性淋巴细胞的死亡,因此使得该肿瘤能够逃避免疫系统。这种情况下,抑制 Fas 系统就能使得免疫系统通过其他途径与肿瘤反应,因为此时免疫系统能够接触到肿瘤 (Green 和 Ware(1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94(12) :5986-90)。

[0009] TNF 家族配体 BAFF,也称为 TALL-1, THANK, BLyS 和 zTNF4 (Schneider et al. (1999) J. Exp. Med. 189(11) :1747-1756; Shu et al. (1999) J. Leukoc. Biol. 65(5) :680-683; Mukhopadhyay et al. (1999) J. Biol. Chem. 274(23) :15978-15981; Moore et al. (1999) Science 285(5425) :260-263; Gross et al. (2000) Nature 404(6781) :995-999),有助于 B 细胞体外存活 (Batten et al. (2000) J. Exp. Med. 192(10) :1453-1466),已作为体内外周 B 细胞群的关键调控剂。过表达 BAFF 的小鼠表现出成熟 B 细胞增生以及系统性红斑狼疮 (SLE) 的症状 (Mackay et al. (1999) J. Exp. Med. 190(11) :1697-1710)。另外,一些 SLE 患者血清中 BAFF 水平显著增高 (Zhang et al. (2001) J. Immunol. 166(1) :6-10)。因此可以认为,该配体水平的异常升高通过提高自身反应性 B 细胞的存活率引发自身免疫疾病 (Batten et al. (2000) J. Exp. Med. 192(10) :1453-1466)。

[0010] BAFF 是一种 II 型膜蛋白,由骨髓来源的细胞产生 (Schneider et al. (1999) J. Exp. Med. 189(11) :1747-1756; Moore et al. (1999) Science 285(5425) :260-263),表达于细胞表面或以可溶形式表达 (Schneider et al. (1999) J. Exp. Med. 189(11) :1747-1756)。此前证明, TNF 受体家族的两成员 BCMA 和 TACI 与 BAFF 相互作用 (Gross et al. (2000) Nature 404 :995-999; Thompson et al. (2000) J. Exp. Med. 192(1) :129-135; Xia et al. (2000) J. Exp. Med. 192 :137-143; Masters et al. (2000) Curr. Biol. 10(13) :785-788; Shu et al. (2000) J. Leukoc. Biol. 65(5) :680-683; Wu et al. (2000) J. Biol. Chem. 275 :35478-35485)。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明部分基于 BAFF 受体蛋白“BAFF-R”、多核苷酸序列以及这些核酸序列编码的 BAFF-R 多肽的发现。

[0013] 一方面,本发明提供了分离的核酸,该核酸编码 BAFF-R 多肽或者其片段或衍生物。该核酸可以包括,例如,编码与包含图 2D(SEQ ID NO:5)所示氨基酸序列的多肽之间具有至少 50%或至少 90%相同的多肽的核酸序列。

[0014] 本发明还提供了基本上纯的核酸分子,其中含有能在严谨条件下与杂交探针杂交的序列,所述杂交探针的核酸序列由图 2A 所示编码序列(SEQ ID NO:3)、图 2C 所示编码序列(SEQ ID NO:4)或者所述编码序列的互补序列组成。

[0015] 一些实施方案中,所述核酸序列编码具有图 2D 所示序列(SEQ ID NO:5)并有至少一处保守氨基酸取代的多肽。

[0016] 一些实施方案中,所述核酸序列编码能结合 BAFF 的多肽。

[0017] 所述核酸可包括,例如,包含图 1A(SEQ ID NO:1)、图 1B(SEQ ID NO:2)、图 2A(SEQ ID NO:3)、图 2C(SEQ ID NO:4)及图 3(SEQ ID NO:6)所示核苷酸序列的核酸。

[0018] 所述核酸可以是,例如一基因组 DNA 片段,或者也可以是一 cDNA 分子。

[0019] 本发明还包括其中含有一个或多个本发明所述核酸的载体,以及含有本发明所述载体或核酸的细胞。

[0020] 另一方面,本发明提供了基本纯的核酸分子,该核酸分子编码融合蛋白,所述融合蛋白含有至少两个区段,其中一个区段含有本发明上述实施方案列出的氨基酸序列中所述的多肽或其片段。本发明还提供了融合蛋白,该融合蛋白包含至少两个或三个区段,其中第一区段包含异源信号肽,第二区段包含本发明上述实施方案列出的 BAFF-R 氨基酸序列中所述的多肽或其片段,第三区段包含免疫球蛋白多肽。替代地,所述第一区段包含含有信号序列的免疫球蛋白多肽片段,第二区段包含 BAFF-R 多肽片段。

[0021] 其他方面,本发明提供了基本纯的结合试剂,该试剂能特异性地结合本发明上述实施方案所述的多肽。

[0022] 本发明还涉及用重组表达载体转化后的宿主细胞,该载体包含任何上述核酸分子。

[0023] 另一方面,本发明包括药用组合物,该组合物包括 BAFF-R 多肽和药学上可接受的载体或稀释剂。

[0024] 另一方面,本发明包括基本纯化的 BAFF-R 多肽,例如,任何由 BAFF-R 核酸编码的多肽。

[0025] 本发明还包括药用组合物,该组合物包括 BAFF-R 多肽和药学上可接受的载体或稀释剂。

[0026] 另一方面,本发明提供了能够特异性结合 BAFF-R 多肽的抗体。所述抗体可以是,例如单克隆或多克隆抗体。本发明还包括药用组合物,该组合物包括 BAFF-R 抗体和药学上可接受的载体或稀释剂。本发明还涉及分离的抗体,所述抗体能够与任一本发明所述核酸分子编码的多肽上的表位结合。

[0027] 本发明进一步还涉及试剂盒,该试剂盒包括能够与任一上述核酸分子编码的多肽结合的抗体和阴性对照抗体。

[0028] 本发明提供了用于制备 BAFF-R 多肽的方法。该方法包括提供包含 BAFF-R 核酸,例如含 BAFF-R 核酸的载体的细胞,以及在足以使所述核酸编码的 BAFF-R 多肽能够表达的条件下培养该细胞。然后从该细胞中回收表达的 BAFF-R 多肽。优选地,该细胞产生微量或

不产生内源 BAFF-R 多肽。该细胞可以是,例如原核细胞或真核细胞。

[0029] 本发明提供了一种方法,该方法通过向哺乳动物给药足以诱导免疫应答的量的由上述任一核酸分子编码的多肽,从而在该哺乳动物体内诱导出抗所述多肽的免疫应答。

[0030] 本发明还涉及鉴定能够结合 BAFF-R 多肽的化合物的方法,该方法是使 BAFF-R 多肽与化合物接触,然后测定该化合物是否与 BAFF-R 多肽结合。

[0031] 本发明还涉及鉴定能够与编码 BAFF-R 多肽的核酸结合的化合物的方法,该方法是使 BAFF-R 核酸与化合物接触,然后测定该化合物是否与所述核酸分子结合。

[0032] 本发明进一步还提供了鉴定能够调控 BAFF-R 多肽活性的化合物的方法,该方法是使 BAFF-R 多肽与化合物接触,然后测定 BAFF-R 多肽的活性是否被改变。

[0033] 本发明还涉及能够调控 BAFF-R 多肽活性的化合物,该化合物通过下述方法鉴定:使 BAFF-R 多肽与该化合物接触,然后测定该化合物是否调控了 BAFF-R 多肽的活性,是否与 BAFF-R 多肽结合,或者是否与编码 BAFF-R 多肽的核酸分子结合。

[0034] 另一方面,本发明提供了诊断受试者 B- 细胞介导的疾病的方法,例如自身免疫紊乱或癌症。该方法包括提供来自受试者的蛋白样品并测量样品中 BAFF-R 多肽的量。然后将受试者样品中 BAFF-R 的量与对照蛋白样品中 BAFF-R 多肽的量进行比较。受试者蛋白样品中 BAFF-R 多肽量相对于对照蛋白样品中 BAFF-R 多肽的量发生变化,表明该受试者患有 B- 细胞介导的疾病。优选地,对照样品取自匹配的个体,即年龄、性别或其他一般状况类似但是能排除其患有该疾病的个体。替代地,所述对照样品可在该受试者未被怀疑患该疾病的时候获取。一些实施方案中,使用 BAFF- 抗体检测所述 BAFF-R 多肽。

[0035] 另一方面,本发明包括诊断受试者 B- 细胞介导的疾病的方法,例如,自身免疫紊乱。该方法包括:提供来自受试者的核酸样品,例如 RNA 或 DNA,或者二者兼有,测量受试者核酸样品中 BAFF-R 核酸的量。然后将受试者核酸样品中 BAFF-R 核酸的量与对照样品中 BAFF-R 核酸的量进行对比。样品中 BAFF-R 核酸的量相对于对照样品中 BAFF-R 核酸的量发生变化,表明受试者患有自身免疫疾病。

[0036] 另一方面,本发明包括诊断受试者是否患有肿瘤发生 (famorigenic) 疾病或自身免疫疾病的方法。该方法包括:提供来自受试者的核酸样品,并对受试者核酸样品中 BAFF-R 核酸的核苷酸序列中至少一部分进行鉴定。然后将受试者样品的 BAFF-R 核苷酸序列与对照样品的 BAFF-R 核苷酸序列进行比较。样品中 BAFF-R 核苷酸序列相对于对照样品 BAFF-R 核苷酸序列发生变化,就表明受试者患有这样的疾病。

[0037] 另一方面,本发明提供了治疗或预防或延缓 B- 细胞介导的疾病的方法。该方法包括向期望该种治疗或防止或延缓的受试者给药足以治疗或防止或延缓受试者致瘤性疾病或自身免疫疾病的量的 BAFF-R 核酸、BAFF-R 多肽、或抗 -BAFF-R 抗体。

[0038] 可用上述 BAFF-R 核酸分子、多肽或抗体诊断、治疗、预防或延缓的疾病可以是癌症或免疫调节性疾病。这些疾病包括本质上是自身免疫的疾病,例如系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、重症肌无力,自身免疫性溶血性贫血、自发性血小板减少性紫癜、抗 - 磷脂综合征、恰加斯氏病 (Chagas' disease)、格雷夫斯氏病 (Grave' s disease)、韦格内氏肉芽肿病 (Wegener' s granulomatosis)、结节性多动脉炎 (poly-arteritis nodosa) 以及急性肾小球肾炎。所述治疗剂还可用于浆细胞疾病,例如多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症 (Waldenstrom' s macroglobulinemia)、重链疾病 (heavy-chain disease)、原发

性或免疫细胞相关性淀粉样变以及不明意义的单克隆球蛋白病 (monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS))。肿瘤学治疗目标包括 B 细胞癌、白血病及淋巴瘤。

[0039] 使用本发明所述核酸、多肽和抗体的组合物及治疗方法可用于任一与不希望的细胞增生有关的疾病。具体而言,本发明可以用于治疗表达有 BAFF 和 / 或 BAFF-R 的肿瘤细胞。

[0040] 本发明含有 BAFF-R 激动剂 (如能结合 BAFF-R 的抗体及模拟的 BAFF) 的组合物还可用于治疗以 B 细胞减少为特征的免疫缺陷病。所述疾病例如由辐射和 / 或化疗引起。

[0041] 本发明另一方面,提供了一种用于减少重组表达蛋白聚集的方法。该方法包括对蛋白或其融合蛋白的多个同系物进行比较,从而测定出保守结构域及保守区域中不相同的氨基酸。通常,至少有 1 个非-极性氨基酸变化为不带电荷的极性氨基酸或脯氨酸、丙氨酸或丝氨酸。

[0042] 除另有说明,本发明使用的所有科技术语都与本发明所属领域普通技术人员通常理解的含义相同。尽管与本发明所述方法及材料类似或等同的方法和材料都可以用于实施或测试本发明,但是下文描述了适合的方法和材料。本发明提到的所有出版物、专利申请、专利以及本文所涉及的其他文献在此完整引入作为参考。当出现冲突时,以本说明书为准,包括定义。此外,所述材料、方法及实施例都只是旨在说明而并非用来限制本发明。

[0043] 本发明其他特征及优点显而易见于下列发明详述及权利要求书。

附图说明

[0044] 图 1A 给出克隆于 pJST576 的 BJAB cDNA 的 DNA 序列 (SEQ ID NO :1)。

[0045] 图 1B 显示 IMAGE 克隆 2000271 (EST AI250289) 的 cDNA 的完整 DNA 序列 (SEQ ID NO :2)。

[0046] 图 2A 给出除去用 GENESCAN 程序推测的内含子后的 JST576 核苷酸序列 (SEQ ID NO :3)。

[0047] 图 2B 给出 PCR 产物的 1% 琼脂糖凝胶电泳结果,该 PCR 产物是用从 BJAB 或 IM-9 RNA 制备到的第一链 cDNA 或者用 JST576 cDNA 扩增 BAFF-R 得到的 PCR 产物。泳道 1. λ DNA HindIII 消化产物。泳道 2. BJAB 寡聚 dT BAF-225/BAF-191 引物。泳道 3. BJAB 寡聚 dT BAF-226/BAF-191 引物。泳道 4. BJAB 随机 BAF-225/BAF-191 引物。泳道 5. BJAB 随机 BAF-226/BAF-191 引物。泳道 6. IM-9 寡聚 dT BAF225/BAF-191 引物。泳道 7. IM-9 寡聚 dT BAF-226/BAF-191 引物。泳道 8. IM-9 随机 BAF-225/BAF-191 引物。泳道 9. IM-9 随机 BAF-226/BAF-191 引物。泳道 10. JST576cDNA BAF-225/BAF-191。泳道 11. JST576cDNABAF-226/BAF-191。泳道 12. 无模板 BAF-225/BAF-191。泳道 13. 无模板 BAF-226/BAF-191。

[0048] 图 2C 给出通过对扩增自 BJAB 第一链 cDNA 中推测内含子侧翼的主要 (bulk) PCR 产物进行测序得到的成熟的 JST576 (BAFF-R) 序列 (SEQ ID NO :4) (GenBank 登记号 AF373846)。

[0049] 图 2D 给出 BAFF-R (JST576) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO :5)。粗体字表示的 A (Ala) 残基表示使用替代剪接受体位点得到的序列。方框框起来的部分为推定的跨膜结构域,下

划线的部分为推定的终止转移信号。

[0050] 图 3 给出 JST576 的剪接型 (SEQ ID NO :6), 其中包含从人脾第一链 cDNA 通过 RT-PCR 扩增到的 5' UTR 序列, 以及推导出的氨基酸序列 (SEQ ID NO :7)。该序列包含框内上游终止密码子, 所述阅读框带有 ATG。

[0051] 图 4A 给出小鼠 BAFF-R cDNA 序列 (SEQ ID NO :8) (另外 GenBank 登记号为 AF373847)。

[0052] 图 4B 给出小鼠 BAFF-R 的氨基酸序列 (SEQ ID NO :9)。Cys 残基用粗体表示并加有下划线, 方框框起来的部分为推定的跨膜区。

[0053] 图 4C 显示了人 (SEQ ID NO :10) 与小鼠 (SEQ ID NO :9) BAFF-R 蛋白序列之间的同源性。

[0054] 图 5 给出人 BAFF 与 JST576 转染细胞之间的结合情况。293EBNA 细胞是用 pJST576 或 CA336 (huTACI) 与 GFP 受体构建体一起共转染的。用 1 μ g/ml 生物素标记的 myc-huBAFF, 之后用 SAV-PE 来分析细胞结合 BAFF 的情况。

[0055] 图 6 显示了人和小鼠 BAFF 与 JST576 转染细胞间的结合情况。293EBNA 细胞是用 pJST576 与 GFP 受体构建体一起共转染的。与 BAFF 结合后 24 小时, 用 5 μ g/ml 标签 -huBAFF 或标签 -muBAFF 以及接着再用抗 - 标签单克隆抗体 M2 和驴抗 - 小鼠 IgG-PE 来分析细胞结合 BAFF 的情况。

[0056] 图 7 显示 APRIL 不结合经 JST576 转染后的细胞。293EBNA 细胞是用 pJST576 或 CA336 (huTACI) 与 GFP 受体构建体一起共转染的。用 1 μ g/ml myc-muAPRIL, 之后用抗 -muAPRIL 大鼠 IgG2b、生物素标记的抗 - 大鼠 FcG2b, 以及 SAV-PE 来分析细胞结合 APRIL 的情况。

[0057] 图 8 显示 BAFF 可沉淀来自 JST576 转染细胞的蛋白质。293EBNA 细胞是用 BAFF-R (pJST576)、空载体 (CH269) 或 huTACI (CA336) 共转染的, 之后用 35 S 半胱氨酸和蛋氨酸脉冲标记。提取物用标签 -huBAFF 免疫沉淀, 然后在还原性 SDS-PAGE 凝胶上电泳。左侧显示分子量标准参照物。

[0058] 图 9 给出编码人 BAFF-R:Fc 的基因的核酸序列 (SEQ ID NO :11) 及从其推导出的氨基酸序列 (SEQ ID NO :12): 其中核酸残基 1-63 编码小鼠 IgG- κ 信号序列; 核酸残基 64-66 用来导入限制酶位点; 核酸残基 67-276 编码部分 BAFF-R 胞外结构域; 核酸残基 277-279 用于导入限制酶位点; 以及核酸残基 280-960 编码人 IgG1 的 Fc 区。

[0059] 图 10 给出用 JST576 的 EcoNI 片段作探针进行 Northern 印迹分析的结果。所有曝光时间均为 4 天。10A: Clontech 人免疫 II 印迹; 10B: Clontech 人 12 泳道多 - 组织印迹; 10C: Clontech 人多 - 组织 II 印迹。

[0060] 图 11 显示对 20 μ g 分离自各种细胞系的总 RNA 进行 Northern 印迹分析的结果。用 JST576 的 EcoNI 限制性片段作探针检测印迹, 曝光 4 天。经 FACS 测定的细胞系与 BAFF 结合的能力标示于泳道下方。

[0061] 图 12 显示使用 BAFF-R:Fc 免疫沉淀的结果。人 BAFF 被 BAFF-R:Fc 或 BCMA:Fc 免疫沉淀, 但是未被 Fn14-Fc 免疫沉淀。对照用 BAFF 蛋白显示于泳道 1。

[0062] 图 13 显示了人 BAFF-R:Fc 能够阻断人 BAFF 与 BJAB 细胞间的结合。FACS 分析结果见图 13A。曲线 E 代表在无 BAFF-R:Fc 存在时生物素标记的 BAFF 与 BJAB 细胞的结合情

况。曲线 B-D 分别代表在有 $5\mu\text{g/ml}$ 、 $1\mu\text{g/ml}$ 或 $0.2\mu\text{g/ml}$ BAFF-R:Fc 存在时,BAFF 结合 BJAB 细胞的能力。曲线 A 是仅作第二步得到的曲线。图 13B 显示,与 TACI:Fc(三角形)或非特异性融合蛋白 LTR:Fc(圆形)相比,各种浓度的 BAFF-R:Fc(方形)阻断 BAFF 与表达受体的 BJAB 细胞的结合的能力。

[0063] 图 14 显示 BAFF-R:Fc 阻断 BAFF- 诱导的对脾 B 细胞的共刺激的能力。该图显示 [^3H] 胸苷掺入量 (cpm) 随 hBAFF 量 (ng/ml) 而变化的曲线图。

[0064] 图 15 显示 BAFF-R:Fc1 处理导致正常小鼠外周 B 细胞损失。

[0065] 图 16 显示用人和小鼠 BAFF-R:Fc 处理导致脾 B220+B 细胞数目减少。

[0066] 图 17 显示向小鼠给药 BAFF-R:Fc 导致淋巴结中 B220+B 细胞的百分比下降。

[0067] 图 18 显示向小鼠给药 BAFF-R:Fc 导致外周血 B220+B 细胞减少。

[0068] 图 19A 显示,从 4 个能产生可结合 BAFF-R 的抗体的克隆取上清液进行 FACS 分析的数据。另外还给出了不含可结合 BAFF-R 抗体的对照上清液的 FACS 分析数据。

[0069] 图 19B 给出的柱形图表明 2 个克隆能阻断 BAFF 与 BAFF-R 间的结合。(a) 显示无 BAFF 的对照;(b) 显示了来自克隆 2 的抗体的阻断能力;(c) 显示了来自克隆 9 的抗体的阻断能力;以及 (d) 为不能结合 BAFF-R 的对照抗体的曲线。

[0070] 图 20 给出了人 BAFF-R:Fc(hBAFF-R) 和小鼠 BAFF-R:Fc(mBAFF-R) 胞外结构域氨基酸序列的比对结果,以及表达含有指示序列的 Fc 融合蛋白时所观察到的凝集百分比。编号的 JST 克隆代表的是在亲本序列中出现突变(下划线标出)的氨基酸序列,以及导致的表达蛋白的凝集。另外还给出了人 (SEQ ID NO:10 的氨基酸 2-71;SEQ ID NO:13) 和小鼠 (SEQ ID NO:9 的氨基酸 2-66;SEQ ID NO:14)BAFF-R 的部分序列;以及下列克隆相对应的部分:JST659(SEQ ID NO:15),JST660(SEQ ID NO:16),JST661(SEQ ID NO:17),JST662(SEQ ID NO:18),JST663(SEQ ID NO:19),JST673(SEQ ID NO:20),JST 674(SEQ ID NO:21),JST675(SEQ ID NO:22),JST672(SEQ ID NO:23),JST676(SEQ ID NO:24),JST671(SEQ ID NO:25),JST677(SEQ ID NO:26),JST678(SEQ ID NO:27),JST664(SEQ ID NO:28),JST668(SEQ ID NO:29),JST665(SEQ ID NO:30),JST666(SEQ ID NO:31),和 JST667(SEQ ID NO:32)。

[0071] 图 21 显示用制备自 BAFF-R-i. c. d. (BAFF-R 胞内结构域)(泳道 1) 或对照载体(泳道 2) 转染的细胞的裂解物免疫沉淀的蛋白质的放射自显影图。用编码 BAFFR-i. c. d 的构建体或模拟质粒转染约 6×10^6 个 293E 细胞。48 小时后,用 ^{35}S 代谢法标记细胞 24 小时,用裂解缓冲液裂解细胞,预先澄清裂解物,然后用抗 myc 的 mAb,9E10 免疫沉淀。在还原条件下通过 10-20% SDSPAGE 电泳分离免疫沉淀物。

[0072] 发明详述

[0073] 本发明中提到的参考著作、专利、专利申请及科学文献,包括 GenBank 数据库序列的登记号,构成本领域技术人员已有知识,作为整体在此引入作为参考,与这些文献专门单个引入作为参考时的范围相同。本申请所引文献与本发明说明书特定含义之间如有任何抵触都应该以后者为准。另外,本领域对词汇和短语定义的已有理解与本发明说明书中对该词汇或短语专门解释而下的定义之间如有任何抵触都以后者为准。

[0074] 本领域技术人员已知的有关重组 DNA 技术普通原理的标准参考著作包括: Ausubel et al. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New

York(1998); Sambrook et al. MOLECULAR CLONING :A LABORATORY MANUAL, 2D ED., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York(1989); Kaufman et al., Eds., HANDBOOK OF MOLECULAR AND CELLULAR METHODS IN BIOLOGY AND MEDICINE, CRC Press, Boca Raton(1995); McPherson, Ed., DIRECTED MUTAGENESIS :A PRACTICAL APPROACH, IRL Press, Oxford(1991)。

[0075] 本发明公开了 BAFF-R 核酸、编码 BAFF-R 多肽的分离的核酸或其部分、BAFF-R 多肽、含所述核酸的载体、BAFF-R 核酸转化的宿主细胞、抗-BAFF-R 抗体、以及药用组合物。另外本发明还公开了制备 BAFF-R 多肽的方法,以及用上述化合物筛查、诊断、治疗疾病的方法,以及筛选能调节 BAFF-R 多肽活性的化合物的方法。

[0076] 本发明所述的 BAFF-R 核酸和多肽、BAFF-R 抗体以及药用组合物尤其可用于治疗癌症和/或免疫调节疾病。这些疾病包括,例如,本质上是自身免疫的 B 细胞-介导疾病,如系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、重症肌无力,自身免疫溶血性贫血、自发性血小板减少性紫癜、抗-磷脂综合征、恰加斯氏病、格雷夫斯氏病、韦格内氏肉芽肿病、结节性多动脉炎以及急进性肾小球肾炎。所述治疗剂还可用于浆细胞疾病,例如多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、重链疾病、原发性或免疫细胞相关性淀粉样变以及不明意义的单克隆球蛋白病。肿瘤学治疗目标包括 B 细胞癌、白血病及淋巴瘤。

[0077] BAFF-R 核酸

[0078] 本发明一方面提供的是编码 BAFF-R 蛋白或其生物活性部分的分离的核酸分子。另外还包括那些足可用作探针鉴定 BAFF-R 编码核酸(例如,BAFF-R mRNA)的核酸片段,以及可用作聚合酶链反应(PCR)的引物的片段以扩增或突变 BAFF-R 核酸分子。本发明使用的术语“核酸分子”包括 DNA 分子(例如,cDNA 或基因组 DNA),RNA 分子(例如,mRNA),用核苷酸类似物制备而成的 DNA 或 RNA 的类似物,及其衍生物、片段和同系物。所述核酸分子可以是单链或双链的,但优选是双链 DNA。

[0079] “探针”是指用于不同用途的不同长度的核酸序列,优选,其长度至少约 10 个核苷酸(nt),或者多至约,例如 6,000nt。探针可用于检测相同的、类似的或互补的核酸序列。较长的探针通常从天然或重组来源获得,与寡聚物相比具有高特异性和杂交较慢的特点。探针可以是单链或双链的,被设计为在 PCR、膜基础上的杂交技术或 ELISA 类技术中呈现特异性。

[0080] “分离的”核酸分子是指该分子从在天然状态下与其共存的其他核酸分子中分离了出来。分离的核酸分子的实例包括,但不限于,包含在载体中的重组 DNA 分子、存留于异源宿主细胞中的重组 DNA 分子、部分或基本上纯化的核酸分子以及合成的 DNA 或 RNA 分子。优选地,“分离的”核酸是指它从其来源生物体基因组中天然状态下位于该核酸侧翼的序列(即位于该核酸 5' 和 3' 末端的序列)中脱离了。例如,在不同的实施方案中,所述的分离的 BAFF-R 核酸分子可包含小于约 50kb、25kb、5kb、4kb、3kb、2kb、1kb、0.5kb 或 0.1kb 的核苷酸序列,天然状态下这一核苷酸序列在所述核酸来源细胞的基因组 DNA 中位于所述核酸的侧翼。而且,“分离的”核酸分子,例如 cDNA 分子,在用重组技术制备时能够基本上与其他细胞物质或培养基分离开来,或者当化学合成时能够与化学前体或其他化合物分离开来。

[0081] 本发明的核酸分子,例如具有图 1A(SEQ ID NO:1)、图 1B(SEQ ID NO:2)、图 2A(SEQ

ID NO:3)、图 2C(SEQ ID NO:4) 和图 3(SEQ ID NO:6) 所示核苷酸序列或这些核苷酸序列任一互补序列的核酸分子,能够通过常规分子生物学技术和本发明提供的序列信息分离出来。使用图 1A、B、2A、C 和 3 所示核酸序列的全长或部分作为杂交探针,用常规的杂交和克隆技术(例如,描述见 Sambrook et al.,Eds.,MOLECULAR CLONING:ALABORATORY MANUAL 2ND ED., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY,1989; 和 Ausubel, et al.,Eds., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, NY,1993) 能够分离出 BAFF-R 核酸序列。

[0082] 使用 cDNA, mRNA 或替代地使用基因组 DNA 作为模板以及合适的寡核苷酸引物,按照常规 PCR 扩增技术就能扩增出本发明的核酸。可以将这样扩增到的核酸克隆入合适的载体并通过 DNA 序列分析来鉴定。另外,对应于 BAFF-R 核苷酸序列的寡核苷酸可以用常规的合成技术来制备,例如使用自动 DNA 合成仪。

[0083] 本发明中使用的“寡核苷酸”一词是指一连串连接在一起的核苷酸残基,该寡核苷酸应具有足够数目的核苷酸碱基以用于 PCR 反应。一短的寡核苷酸序列可以以基因组或 cDNA 序列为基础或者从中设计出来,用于扩增、确定特定细胞或组织中相同的、类似的或互补 DNA 或 RNA 或检测它们是否存在。

[0084] 寡核苷酸包含核酸序列的一部分,具有至少约 10nt,多至 50nt,优选约 15nt-30nt。他们可以化学合成并且可以用作探针。

[0085] 另一个实施方案中,本发明所述的分离的核酸分子包含一互补于图 1A(SEQ ID NO:1)、图 1B(SEQ ID NO:2)、图 2A(SEQ ID NO:3),图 2C(SEQ ID NO:4) 和图 3(SEQ ID NO:6) 所示核苷酸序列的核酸分子。互补于图 1A(SEQ ID NO:1)、图 1B(SEQ ID NO:2)、图 2A(SEQ ID NO:3)、图 2C(SEQ ID NO:4) 和图 3(SEQ ID NO:6) 所示核苷酸序列的核酸分子是指该分子与图 1A(SEQ ID NO:1)、图 1B(SEQ ID NO:2)、图 2A(SEQ ID NO:3)、图 2C(SEQ ID NO:4) 和图 3(SEQ ID NO:6) 所示核苷酸序列之间是充分互补的,以至其与图 1A(SEQ ID NO:1)、图 1B(SEQ ID NO:2)、图 2A(SEQ ID NO:3)、图 2C(SEQ ID NO:4) 和图 3(SEQ ID NO:6) 所示核苷酸序列之间极少或没有错配的氢键生成从而生成一稳定的二聚体。

[0086] 本发明中“互补”一词是指在核酸分子的核苷酸单位之间形成 Watson-Crick 或 Hoogsteen 碱基配对,“结合”一词是指两个多肽或化合物或者相关多肽或化合物或其结合之间的物理或化学作用。结合包括离子、非离子、范德华力和疏水相互作用等。物理相互作用可以是直接的或间接的。间接相互作用可以通过或借助于另外一多肽或化合物来实现。直接结合是指那种不需通过或借助另外一种多肽或化合物的作用就可发生的相互作用,或者没有其他实质性的化学中间物。

[0087] 另外,本发明所述核酸分子可以仅包括图 1A(SEQ ID NO:1)、图 1B(SEQ ID NO:2)、图 2A(SEQ ID NO:3)、图 2C(SEQ ID NO:4) 和图 3(SEQ ID NO:6) 所示核酸序列的一部分,例如,可用作探针或引物的片段或编码 BAFF-R 生物活性部分的片段。

[0088] 本发明提供的片段是指至少 6 个(连续的)核苷酸或至少 4 个(连续的)氨基酸的序列,对于核酸来说这个长度足以允许特异性杂交的发生或对氨基酸来说这个长度足以完成表位的特异性识别,而所述的片段至多是一小于全长序列的部分。这些片段可以来自所选核酸或氨基酸序列的任一连续部分。

[0089] 衍生物是指从原初的化合物直接或通过修饰或部分取代而形成的核酸序列或氨

氨基酸序列。类似物是指除在某些组分或侧链上不同于原初的化合物外,与原初化合物结构类似但不相同的核酸序列或氨基酸序列。类似物可以是合成的或者出自不同的进化来源,并且与野生型相比具有类似或相反的代谢活性。

[0090] 如果衍生物或类似物含有修饰的核酸或氨基酸,如下所述,那么该衍生物和类似物可以是全长的,也可以是非全长的。本发明所述核酸或蛋白的衍生物或类似物可包括,但不限于,含有与本发明所述核酸或蛋白质基本同源的区域分子,在不同实施方案中,所述基本同源是指该区域与同样大小的核酸或氨基酸序列相比或者与经过本领域已知的电脑同源性程序比对后的所比对序列相比同一性至少约 45%、50%、70%、80%、95%、98% 或甚至 99% (优选同一性为 80-99%),或者其编码核酸能够与编码上述蛋白质的序列的互补序列在严谨、中等严谨或者低严谨条件下杂交。参见例如, Ausubel, et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, NY, 1993, 以及下列文献。一代表性的程序是使用设定缺省值的 Gap 程序 (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 用于 UNIX, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison, WI), 其中使用 Smith 和 Waterman 算法 (1981) Adv. Appl. Math. 2 :482-489, 在此引入作为参考)。

[0091] “同源核酸序列”或“同源氨基酸序列”,或者其变体,是指在核苷酸水平或氨基酸水平上达到上述同源性程度的序列。同源核苷酸序列是编码 BAFF-R 多肽同种型的序列。由于例如 RNA 的不同剪接,同种型可以表达在同一生物体的不同组织中。替代地,同种型可以由不同的基因编码。在本发明中,同源核苷酸序列包括编码除人之外物种 BAFF-R 多肽的核苷酸序列,所述物种包括,但不限于,哺乳动物,因而可以包括,例如小鼠、大鼠、兔、狗、猫、牛、马及其他生物体。同源核苷酸序列可以包括,但 不限于,天然生成的等位变体以及本发明列出的核苷酸序列变体。但是,同源核苷酸序列不包括编码人 BAFF-R 蛋白的核苷酸序列。同源核酸序列包括那些编码图 2D (SEQ ID NO :5) 中的保守性氨基酸取代 (参见下文) 的核酸序列,以及编码具有 BAFF-R 活性的多肽的核酸序列。同源氨基酸序列不是指人 BAFF-R 多肽的氨基酸序列。

[0092] 从人 BAFF-R 基因克隆中测定的核苷酸序列可以用来制备探针和引物,设计这些探针和引物用于鉴定和 / 或克隆例如来自其他组织的其他细胞类型中的 BAFF-R 同系物,以及来自其他哺乳动物的 BAFF-R 同系物。通常,所述探针 / 引物包括一基本上纯化的寡核苷酸。所述寡核苷酸一般包括这样的一段核苷酸序列,该核苷酸序列能够在严谨条件下与下述序列杂交:图 1A (SEQ ID NO :1)、图 1B (SEQ ID NO :2)、图 2A (SEQ ID NO :3)、图 2C (SEQ ID NO :4) 以及图 3 (SEQ ID NO :6) 任一所示序列中至少约 12, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 或 400 个连续正义链核苷酸的序列,或者图 1A (SEQ ID NO :1)、图 1B (SEQ ID NO :2)、图 2A (SEQ ID NO :3)、图 2C (SEQ ID NO :4) 以及图 3 (SEQ ID NO :6) 任一所示序列的反义链核苷酸序列,或者图 1A (SEQ ID NO :1)、图 1B (SEQ ID NO :2)、图 2A (SEQ ID NO :3)、图 2C (SEQ ID NO :4) 以及图 3 (SEQ ID NO :6) 任一所示序列的天然突变体。

[0093] 基于人 BAFF-R 核苷酸序列的探针可以用于检测编码相同或者同源蛋白的转录本或基因组序列。在不同的实施方案中,所述探针还包括一连接于其上的标记基团,例如所述标记基团可以是同位素、荧光化合物、酶或酶的辅因子。这类探针可以作为诊断试剂盒的一部分用于检测错误表达了 BAFF-R 蛋白的细胞或组织,这可以通过例如如下方法来实现:检

测取自受试者的样本细胞中编码 BAFF-R 的核酸的水平,例如检测 BAFF-R mRNA 水平或者测定基因组 BAFF-R 基因是否已发生突变或缺失。

[0094] “具有 BAFF-R 生物活性部分的多肽”是指表现出与本发明所述多肽类似但不必相同活性的多肽,包括成熟形式,所述活性是在一具体的生物学试验中检测到的,具有或不具有剂量依赖性。编码“BAFF-R 生物活性部分”的核酸片段可以用下述方法来制备:从图 1A(SEQ ID NO:1)、图 1B(SEQ ID NO:2)、图 2A(SEQ ID NO:3)、图 2C(SEQ ID NO:4)和图 3(SEQ ID NO:6)所示的任一序列中分离出编码具有 BAFF-R 生物活性(BAFF-R 蛋白的生物活性见下文描述)的多肽的序列部分,然后表达 BAFF-R 蛋白的编码部分(例如,通过体外重组表达),之后再评定 BAFF-R 的编码部分的活性。例如,编码 BAFF-R 生物活性部分的核酸片段可以任选包括 BAFF 结合结构域。在另一实施方案中,编码 BAFF-R 生物活性部分的核酸片段包括 1 个或多个区域。

[0095] BAFF-R 变体

[0096] 本发明进一步还包括因遗传密码的简并性而不同于图 1A(SEQ ID NO:1)、图 1B(SEQ ID NO:2)、图 2A(SEQ ID NO:3)、图 2C(SEQ ID NO:4)、和 3(SEQ ID NO:6)所示的核苷酸序列的核酸分子。这些核酸与 1A(SEQ ID NO:1)、图 1B(SEQ ID NO:2)、图 2A(SEQ ID NO:3)、图 2C(SEQ ID NO:4)、和 3(SEQ ID NO:6)所示的核苷酸序列编码同样的 BAFF-R 蛋白。另一实施方案中,本发明的分离的核酸分子具有这样的核苷酸序列,该核苷酸序列编码的蛋白具有图 2D(SEQ ID NO:5)所示的氨基酸序列。

[0097] 除图 1A(SEQ ID NO:1),图 1B(SEQ ID NO:2),图 2A(SEQ ID NO:3),图 2C(SEQ ID NO:4)和图 3(SEQ ID NO:6)中任一所示的 BAFF-R 核苷酸序列外,本领域技术人员能够理解 DNA 序列多态性可存在于群体(例如,人群)中,这种多态性可导致 BAFF-R 氨基酸序列的变化。所述的 BAFF-R 基因的基因多态性由于天然的等位基因变化存在于群体内个体之间。本发明中使用的“基因”和“重组基因”是指包含编码 BAFF-R 蛋白的开放阅读框架的核酸分子,所述 BAFF-R 蛋白优选哺乳动物 BAFF-R 蛋白。这类天然等位基因变异一般导致 BAFF-R 基因的核苷酸序列 1-5%的变化。任一及所有这类核苷酸变化和由此产生的 BAFF-R 的氨基酸多态性都是天然等位基因变异的结果,因而不改变 BAFF-R 的功能活性,所有这些都属于本发明的范围。

[0098] 此外,编码来自其他物种的 BAFF-R 蛋白的核酸分子,其核苷酸序列也会因此不同于图 1A(SEQ ID NO:1),图 1B(SEQ ID NO:2),图 2A(SEQ ID NO:3),图 2C(SEQ ID NO:4)和图 3(SEQ ID NO:6)所示的人源序列,这也在本发明的范围之内。对应于天然等位基因变体的核酸分子以及本发明所述 BAFF-R cDNA 的同系物,根据它们与本发明公开的人 BAFF-R 核酸之间的同源性,用人 cDNA 或其部分作为杂交探针按照常规杂交技术在严谨条件下能够得到分离。例如,可溶性人 BAFF-R cDNA 可以根据其与人源膜-结合型 BAFF-R 之间的同源性得以分离。类似地,也可以根据其与人源 BAFF-R 之间的同源性,分离获得膜结合型人源 BAFF-R cDNA。

[0099] 因此,在另一实施方案中,本发明所述的分离的核酸分子为至少 6 个核苷酸的长度,并且能够在严谨的条件下与下述的核酸分子杂交:即包含图 1A(SEQ ID NO:1)、图 1B(SEQ ID NO:2)、图 2A(SEQ ID NO:3)、图 2C(SEQ ID NO:4)和图 3(SEQ ID NO:6)任一所示核苷酸序列的核酸分子。另一实施方案中,所述核酸的长度为至少 10, 25, 50, 100, 250

或 500 个核苷酸。另一实施方案中,本发明所述的分离的核酸分子与编码区域杂交。本发明中使用的“在严谨条件下杂交”是用来描述符合这样标准的杂交和洗涤条件,在此条件下彼此之间至少 60% 同源的核苷酸序列通常才能相互间保持杂交。

[0100] 同系物(即,编码来自除人之外物种的 BAFF-R 蛋白的核酸)或其它相关序列(例如,平行进化同源物(paralogs))可以通过低度、中度、高度严谨条件下与作为探针的全长或部分特定人源序列杂交来获得,所用方法是本领域所熟知的核酸杂交及克隆方法。

[0101] 本发明使用的“严谨杂交条件”是指这样的条件,在该条件下探针、引物或寡核苷酸与其目标序列杂交而不与其他序列杂交。严谨条件是序列依赖性的并且随环境不同而不同。较长序列的特异性杂交温度高于较短的序列。通常,严谨条件选择比特异性序列在特定离子强度及 pH 下的解链温度(T_m) 低约 5°C。 T_m 是(特定离子强度、pH 及核酸浓度下)互补于目标序列的探针约 50% 与该目标序列杂交达到平衡时的温度。通常由于所述目标序列过量存在,在 T_m 时,50% 的探针被占据达到平衡。通常,严谨条件是指盐浓度低于约 1.0M 钠离子,通常为 pH 7.0 ~ 8.3 时约 0.01 ~ 1.0M 钠离子(或其他盐类),对于短的探针、引物或寡核苷酸(例如,10nt ~ 50nt) 温度为至少约 30°C,而对于较长的探针、引物及寡核苷酸温度为至少约 60°C。严谨条件还可以通过添加去稳定剂来实现,例如甲酰胺。

[0102] 严谨条件为本领域技术人员已知并可以参见于 CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6. 3. 1-6. 3. 6。

[0103] 优选地,所述严谨条件是指在这样的条件下,彼此间的同源性至少约 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 98%, 或 99% 的序列通常才能相互杂交。

[0104] 严谨杂交条件的一个非限制性实例是 65°C 时在含有下列成分的高盐缓冲液中进行杂交: 6X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1mM EDTA, 0.02% PVP, 0.02% Ficoll, 0.02% BSA 和 500mg/ml 的变性的鲑精 DNA。杂交后用 0.2X SSC, 0.01% BSA 在 50°C 洗涤 1 次或多次。本发明所述的可在严谨条件下与 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 杂交的分离的核酸分子对应于天然生成的核酸分子。本发明中的“天然生成的”核酸分子是指核苷酸序列天然生成的 RNA 或 DNA 分子(例如,编码天然蛋白质)。

[0105] 第二个实施方案中,提供了可与含有图 1A (SEQ ID NO:1), 图 1B (SEQ ID NO:2), 图 2A (SEQ ID NO:3), 图 2C (SEQ ID NO:4) 和图 3 (SEQ ID NO:6) 中任一所示核苷酸序列的核酸分子或其片段、类似物或衍生物在中度严谨条件下杂交的核酸序列。中度严谨杂交条件的一个非限制性实例是在 6XSSC, 5X Denhardt's 溶液, 0.5% SDS 和 100mg/ml 变性的鲑精 DNA, 在 55°C 杂交, 然后用 1XSSC, 0.1% SDS, 在 37°C 洗涤 1 次或多次。其他可以使用的中度严谨条件也已为本领域技术人员所熟知。参见, 例如 Ausubel et al., Eds., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NY, 1993; 和 Kriegler, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY, 1990。

[0106] 第三个实施方案中,提供了可与含有图 1A (SEQ ID NO:1), 图 1B (SEQ ID NO:2), 图 2A (SEQ ID NO:3), 图 2C (SEQ ID NO:4) 和图 3 (SEQ ID NO:6) 中任一所示核苷酸序列的核酸分子或其片段、类似物或衍生物在低度严谨条件下杂交的核酸序列。低度严谨杂交条件的一个非限制性实例是在 35% 甲酰胺, 5X SSC, 50mM Tris-HCl (pH 7.5), 5mM EDTA, 0.02% PVP, 0.02% Ficoll, 0.2% BSA, 100mg/ml 变性的鲑精 DNA, 10% (wt/vol) 硫酸葡聚糖中, 在 40°C 杂交, 然后用 2X SSC, 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5mM EDTA, 和 0.1% SDS, 在 50°C 洗

涤 1 次或多次。其他可以使用的低度严谨条件也已为本领域技术人员所熟知。参见,例如 Ausubel et al., Eds., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NY, 1993 ;和 Kriegler, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY, 1990 ;Shilo and Weinberg(1981)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 :6789-6792。

[0107] 保守性突变

[0108] 除存在于群体中的天然生成的 BAFF-R 序列等位变体外,本领域技术人员还能理解的是可以通过突变将变化引入图 2A(SEQ ID NO :3)、图 2C(SEQ ID NO :4),图 3(SEQ ID NO :6) 所示的核苷酸序列中,从而使得所编码的 BAFF-R 蛋白的氨基酸序列发生变化,同时并不改变 BAFF-R 蛋白的功能。例如,可以在图 2A(SEQ ID NO :3)、图 2C(SEQ ID NO :4) 和图 3(SEQ ID NO :6) 任一所示序列中引入能导致“非-必需”氨基酸残基处出现氨基酸取代的核苷酸取代。“非-必需”氨基酸残基是指这样的残基,即当野生型 BAFF-R 中这样残基发生变化时,其生物活性并不改变,而“必需”氨基酸残基对于生物活性来说必需的。例如,本发明所述 BAFF-R 蛋白中的保守氨基酸残基被认为是特别不能被改变的。

[0109] 此外,在本发明所述 BAFF-R 蛋白家族成员中保守的氨基酸残基也被认为是尤其不能改变的。例如,本发明所述的 BAFF-R 蛋白可以包括至少 1 个通常为 TNF 家族成员的保守区域的结构域。因此,这些保守结构域是不可能用来突变的。但是,其他氨基酸残基(例如 BAFF-R 蛋白成员中的非保守或仅为半保守的残基)对于活性而言并非必需,因而可以被改变。

[0110] 本发明另一方面提供了编码 BAFF-R 蛋白的核酸分子,该蛋白中的非活性必需氨基酸残基发生了变化。这些蛋白虽然在氨基酸序列上不同于图 2D(SEQ ID NO :5),但是仍保留了生物活性。一个实施方案中,分离的核酸分子包含了编码蛋白的核苷酸序列,其中所述的蛋白包括与图 2D(SEQ ID NO :5) 所示氨基酸序列至少约 45% 同源的氨基酸序列。优选地,所述核酸分子编码的所述蛋白与图 2D(SEQ ID NO :5) 至少约 60% 同源,更优选至少约 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 最优选至少约 99% 同源。

[0111] 编码与图 2D 所示蛋白同源的 BAFF-R 蛋白的分离的核酸分子可以通过下述方法来制备:向图 2A(SEQ ID NO :3),图 2C(SEQ ID NO :4),和图 3(SEQ ID NO :6) 所示核苷酸序列中引入 1 处或多处核苷酸取代、添加或缺失,从而在所编码的蛋白中导入 1 处或多处氨基酸取代、添加或缺失。

[0112] 向图 2A(SEQ ID NO :3)、图 2C(SEQ ID NO :4) 或图 3(SEQ ID NO :6) 中导入突变也可以通过,例如常规技术来实现,如定点诱变和 PCR- 介导的突变。优选地,在 1 个或多个被推测为非必需氨基酸残基上进行保守氨基酸取代。“保守性氨基酸取代”是指用一具有类似侧链的氨基酸残基来代替原来的氨基酸残基。具有类似侧链的氨基酸残基的家族已在本领域得到定义。这些家族包括带有碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸,精氨酸,组氨酸),带有酸性侧链的氨基酸(例如,天冬氨酸,谷氨酸),不带电的极性侧链的氨基酸(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸),非极性侧链氨基酸(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸), β - 分枝侧链的氨基酸(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)以及带有芳香侧链的氨基酸(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,用来自同一侧链家族的另一种氨基酸残基取代 BAFF-R 中被推测为非必需的氨基酸残基。替代地,另一技术方案中,通过例如饱和诱变沿 BAFF-R 编码序列的

全长或一部分随机引入突变,对所产生的突变体进行 BAFF-R 生物活性筛选以鉴定出保留活性的突变体。图 2A(SEQ ID NO:3)、图 2C(SEQ ID NO:4) 和图 3(SEQ ID NO:6) 任一所示序列突变后,可用任一本领域已知的重组技术表达所编码的蛋白,然后检测该蛋白的活性。

[0113] 一个实施方案中,对突变的 BAFF-R 蛋白进行了下列测试:(1) 与其他 BAFF-R 蛋白、其他细胞-表面蛋白或其生物活性部分形成蛋白:蛋白相互作用的能力;(2) 突变的 BAFF-R 蛋白与 BAFF-R 配体复合物的形成;(3) 突变的 BAFF-R 蛋白结合胞内目标蛋白或其生物活性部分的能力;(例如,抗生物素蛋白);(4) 结合 BAFF 的能力;或(5) 特异性结合 BAFF-R 蛋白抗体的能力。

[0114] 本发明提供了编码 BAFF-R:Fc 多肽的特异性突变体,设计该多肽以减弱表达的蛋白的凝聚而同时又保持 BAFF 的结合活性。这类突变体,包括,例如,编码 JST661(SEQ ID NO:17),JST662(SEQ ID NO:18),JST663(SEQ ID NO:19),JST673(SEQ ID NO:20),JST674(SEQ ID NO:21),JST675(SEQ ID NO:22),JST672(SEQ ID NO:23),JST676(SEQ ID NO:24),JST671(SEQ ID NO:25),JST677(SEQ ID NO:26),和 JST678(SEQ ID NO:27) 的氨基酸序列的克隆。其他实施方案包括编码 BAFF-R 或 BAFF-R:Fc 多肽的突变体,该 BAFF-R 或 BAFF-R:Fc 多肽具有与天然人源 BAFF-R 或 BAFF-R:Fc 多肽类似的凝聚特性,但仍可结合 BAFF,包括,例如,包含 JST659(SEQ ID NO:15),JST660(SEQ ID NO:16),JST664(SEQ ID NO:28),JST668(SEQ ID NO:29),JST665(SEQ ID NO:30),JST666(SEQ ID NO:31),及 JST667(SEQ ID NO:32) 的氨基酸序列的序列。其他实施方案包括编码 BAFF-R 或 BAFF-R:Fc 多肽的突变体,其中人源和小鼠源 BAFF-R 间的保守氨基酸残基变化为其他保守氨基酸,其中 BAFF-R 或 BAFF-R:Fc 多肽结合 BAFF 的活性仍被保留。其他实施方案中,突变体编码 BAFF-R 或 BAFF-R:Fc 多肽,该 BAFF-R 或 BAFF-R:Fc 多肽具有在人源和小鼠源 BAFF-R 间非保守性的氨基酸,并且这些氨基酸已改变为其他氨基酸。优选地,至少 1 个非极性氨基酸变为脯氨酸残基或不带电的极性氨基酸。

[0115] 反义

[0116] 本发明另一方面提供了一种分离的反义核酸分子,该反义核酸分子能杂交或互补于包含图 2A,C,3 所示核苷酸序列或者其片段或类似物或衍生物的核酸分子。“反义”核酸包含一核苷酸序列,该核苷酸序列与编码蛋白的“正义”核酸互补,例如互补于双链 cDNA 分子的编码链,或互补于 mRNA 序列。在具体方面,提供的反义核酸分子包含的序列与 BAFF-R 编码链中至少约 10,25,50,100,250 或 500 个核苷酸或其全长互补,或仅互补于其一部分。此外还提供了编码图 2A(SEQ ID NO:3),图 2C(SEQ ID NO:4),图 3(SEQ ID NO:6) 任一所示的 BAFF-R 蛋白的片段、同系物、衍生物及类似物的核酸分子,或者与图 2A(SEQ ID NO:3),图 2C(SEQ ID NO:4),图 3(SEQ ID NO:6) 任一所示的 BAFF-R 核酸序列互补的反义核酸。

[0117] 一个实施方案中,反义核酸分子与编码 BAFF-R 的核苷酸序列的编码链中的“编码区”反义。“编码区”一词是指核苷酸序列中含有能被翻译为氨基酸残基的密码子的区域(例如,人源 BAFF-R 的蛋白编码区对应于图 2A(SEQ ID NO:3) 中的第 13~568 位核苷酸,或图 2C(SEQ ID NO:4) 中的第 13~565 位核苷酸,或图 3(SEQ ID NO:6) 中的第 298~849 位核苷酸)。另一实施方案中,所述的反义核酸分子与编码 BAFF-R 的核苷酸序列的编码链中的“非编码区”反义。“非编码区”一词是指位于编码区 5' 和 3' 两侧的序列,该序列不被翻译为氨基酸(即,也称为 5' 和 3' 非翻译区)。

[0118] 如果本发明公开了编码 BAFF-R 的编码链序列,那么就可以根据 Watson 和 Crick 或者 Hoogsteen 碱基配对规则设计出本发明所述的反义核酸分子。所述反义核酸分子可与 BAFF-R mRNA 的整个编码区互补,但是更优选为仅与 BAFF-R mRNA 编码区或非编码区的一部分反义的寡核苷酸。例如,反义寡核苷酸可以是与 BAFF-R mRNA 翻译起始位点周围区域互补的。反义寡核苷酸的长度可为,例如约 5,10,15,20,25,30,35,40,45 或 50 个核苷酸。本发明中的反义核酸可用本领域已知方法通过化学合成或酶连接 反应来构建。例如,反义核酸(例如,反义寡核苷酸)可用天然生成的核苷酸或设计用来增强分子的生物学稳定性的或者增加反义及正义核酸间形成的二聚体的物理稳定性的各种修饰核苷酸来化学合成,例如可以使用硫代磷酸衍生物及吡啶取代的核苷酸。

[0119] 可用于制备反义核酸的修饰核苷酸的实例包括:5- 氟尿嘧啶,5- 溴尿嘧啶,5- 氯尿嘧啶,5- 碘尿嘧啶,次黄嘌呤,黄嘌呤,4- 乙酰胞嘧啶(acetylcytosine),5-(羧羟甲基)尿嘧啶,5- 羧甲基氨甲基-2- 硫尿嘧啶,5- 羧甲基氨甲基尿嘧啶,二氢尿嘧啶, β -D- 半乳糖基 queosine,肌苷, N6- 异戊烯腺嘌呤,1- 甲基鸟嘌呤,1- 甲基肌苷,2,2-- 二甲基鸟嘌呤,2- 甲基腺嘌呤,2- 甲基鸟嘌呤,3- 甲基胞嘧啶,5- 甲基胞嘧啶, N6- 腺嘌呤,7- 甲基鸟嘌呤,5- 甲基氨甲基尿嘧啶,5- 甲氧氨甲基-2- 硫尿嘧啶, β -D- 甘露糖基 queosine,5'- 甲氧羧甲基尿嘧啶,5- 甲氧尿嘧啶,2- 甲硫-N6- 异戊烯腺嘌呤,尿嘧啶-5- 羟基乙酸(v), wybutoxosine,假尿嘧啶,queosine,2- 硫胞嘧啶,5- 甲基-2- 硫尿嘧啶,2- 硫尿嘧啶,4- 硫尿嘧啶,5- 甲基尿嘧啶,尿嘧啶-5- 羟基乙酸甲酯,尿嘧啶-5- 羟基乙酸(v),5- 甲基-2- 硫尿嘧啶,3-(3- 氨基-3-N-2- 羧丙基)尿嘧啶,(acp3)w,和 2,6- 二氨基嘌呤。替代地,可通过将核酸按反义方向亚克隆入表达载体的生物学方法来制备反义核酸(即,从所插入核酸转录出的 RNA 相对于感兴趣的目标核酸来说是反义方向的,下面部分做进一步的描述)。

[0120] 通常将反义核酸给药给受试者或在原位生成以便它们能与编码 BAFF-R 蛋白的细胞 mRNA 和 / 或基因组 DNA 杂交或结合从而抑制该蛋白的表达,例如,通过抑制转录和 / 或翻译来抑制该蛋白的表达。所述的杂交可以是常规的核苷酸互补形成稳定的双螺旋,或者,例如反义核酸分子通过与双螺旋大沟的特异性相互作用而结合 DNA 双螺旋。本发明反义核酸分子给药途径的实例包括在组织位点处直接注射。替代地,可修饰反义核酸分子以使其靶向选择的细胞,然后系统给药。例如,就系统给药而言,可对反义核酸分子修饰以便它们可与被选择细胞表面上的受体或抗原特异性结合,例如将反义核酸分子连接到可与细胞表面受体或抗原结合的肽或抗体上。也可用本发明所述的载体将反义核酸分子递送给细胞。为了使细胞内反义分子的浓度达到充足,优选这样的载体构建体,其中反义核酸分子置于 polIII 或 polIII 强启动子的控制之下。

[0121] 另一实施方案中,本发明的反义核酸分子是 α - 端基异构核酸分子。 α - 端基异构核酸分子与互补的 RNA 形成特异的双链杂合体,与通常的 β - 单元不同,在这样的杂合体中各链是相互之间是平行的(Gaultier et al. (1987)Nucl.Acids Res. 15:6625-6641)。反义核酸分子还可以包含 2'-O- 甲基核糖核苷酸(Inoue et al. (1987)Nucl.Acids Res. 15:6131-6148) 或嵌合 RNA-DNA 类似物(Inoue et al. (1987)FEBS Lett. 215:327-330)。

[0122] 核酶和 PNA 单元

[0123] 另一个实施方案中,本发明的反义核酸为核酶。核酶有催化活性的 RNA 分子,该分子具有核糖核酸酶活性,能切断具有与该分子互补区域的单链核酸,如 mRNA。因此,可用核

酶（例如，锤头状核酶（描述见 Haselhoff and Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591））催化切割 BAFF-R mRNA 转录本从而抑制 BAFF-R mRNA 的翻译。可以根据本发明公开的 BAFF-R DNA 的核苷酸序列（即，SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6），设计出对 BAFF-R 编码核酸具有特异性的核酶。例如，可以构建出这样的四膜虫 L-19 IVS RNA 的衍生物，其中活性位点的核苷酸序列与 BAFF-R 编码 mRNA 中的要切割的核苷酸序列互补。参见，例如，Cech et al. 美国专利号 4,987,071；和 Cech et al. 美国专利号 5,116,742。替代地，可以用 BAFF-R mRNA 从 RNA 分子库中筛选出具有特异性核糖核酸酶活性的催化性 RNA。参见，例如，Bartel et al., (1993) *Science* 261:1411-1418。

[0124] 替代地，可以通过将核苷酸序列靶向与其互补的 BAFF-R 的调控区（例如，BAFF-R 启动子和 / 或增强子）以形成三螺旋结构，阻止目标细胞中 BAFF-R 基因的转录，从而抑制 BAFF-R 基因的表达。参见，Helene (1991) *Anticancer Drug Des.* 6:569-84；Helene et al. (1992) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 660:27-36；和 Maher (1992) *Bioassays* 14:807-15。

[0125] 不同的实施方案中，可以在碱基、糖基、或磷酸骨架上修饰 BAFF-R 的核酸，以提高，例如，该分子的稳定、杂交或溶解性。例如，可修饰核酸的脱氧核糖磷酸骨架制备出肽核酸（参见 Hyrup et al. (1996) *Bioorg. Med. Chem.* 4:5-23）。本发明中的“肽核酸”或“PNA”是指核酸模拟物，例如 DNA 模拟物，其中的脱氧核糖磷酸骨架被假肽骨架取代，仅保留了四种天然的核碱基。现已证明 PNA 的中性骨架可以实现与 DNA 和 RNA 在低离子强度的条件下特异性杂交。PNA 寡聚体的合成可以采用标准的固相肽合成方法，参见 Hyrup et al. (1996) *Bioorg. Med. Chem.* 4:5-23；Perry-O' Keefe et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14670-675。

[0126] BAFF-R 的 PNA 可用于治疗和诊断的用途。例如，PNA 可作为反义或反基因 (antigene) 剂，通过例如诱导转录或翻译停滞或者抑制复制来对基因表达进行序列特异性的调控。BAFF-R 的 PNA 还可用于，例如，通过例如 PNA 指导的 PCR 夹 (clamping)，分析基因中的单碱基对突变；与其他酶，如 S1 核酸酶联用时，作为人工限制性酶 (Hyrup B. (1996) *Bioorg. Med. Chem.* 4:5-23)；或者作为探针或引物用于 DNA 测序及杂交 (Hyrup et al. (1996), *Bioorg Med. Chem.* 4:5-23；Perry-O' Keefe (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14670-675)。

[0127] 另一实施方案中，可以通过将亲脂性或其他辅助基团结合到 PNA 上，通过生成 PNA-DNA 嵌合体，或者通过使用本领域已知的脂质体或其他药物递送技术，对 BAFF-R 的 PNA 进行修饰，增强其稳定性或细胞摄入量。例如，可以制备 BAFF-R 的 PNA-DNA 嵌合体，该嵌合体结合了 PNA 和 DNA 的有益特性。所述嵌合体使得 DNA 识别酶，如 RNase H 和 DNA 聚合酶能与其中的 DNA 部分相互作用，而 PNA 部分则提供了高度的结合亲合力和特异性。可用长度合适的连接物来连接 PNA-DNA 嵌合体，长度的选择要依据碱基堆积、核碱基间形成键的数目以及方向而定 (Hyrup (1996) *Bioorg. Med. Chem.* 4:5-23)。PNA-DNA 嵌合体合成方法的描述见 Hyrup (1996) *Bioorg. Med. Chem.* 4:5-23；和 Finn et al. (1996) *Nucl. Acids Res.* 24:3357-63。例如，用标准的亚磷酰胺 (phosphoramidite) 偶联化学在固相支持物上合成 DNA 链，在 PNA 和 DNA 的 5' 末端间可以使用例如 5' - (4-甲氧三苯甲基) 氨基 -5' - 脱氧 - 胸苷亚磷酰胺 (Mag et al. (1989) *Nucl. Acids Res.* 17:5973-88) 等修饰的核苷酸类似物。然后逐步连接 PNA 单体生成带有 5' PNA 段和 3' DNA 段的嵌合分子 (Finn et al. (1996) 同

上)。替代地,可以用 5' DNA 段和 3' PNA 段合成嵌合分子。参见,Petersen et al. (1975) Bioorg. Med. Chem. Lett. 5 :1119-11124。

[0128] 其他实施方案中,所述的寡核苷酸可包括其他附加基团如肽(例如,用于体内靶向宿主细胞受体),或跨越细胞膜转运的促进剂(参见,例如,Letsinger et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 :6553-6556 ;Lemaitre et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 :648-652 ;PCT 公开号 WO 88/09810) 或跨越血脑屏障转运的促进剂(参见,例如,PCT 公开号 WO 89/10134)。此外,寡核苷酸的修饰还可使用杂交激发的切割剂(hybridization triggered cleavage agents)(参见,例如,Krol et al., (1988) BioTechniques 6 :958-976) 或嵌入剂(参见,例如,Zon, (1988) pharm. Res. 5 :539-549)。最后,可将寡核苷酸偶联于另一分子,例如,肽、杂交激发的交联剂、转运剂、杂交激发的切割剂等。

[0129] BAFF-R 多肽

[0130] 本发明的一个方面涉及分离的 BAFF-R 蛋白及其生物活性部分或者其衍生物、片段、类似物或同系物。另外还提供了用作免疫原制备抗 -BAFF-R 抗体的多肽片段。一个实施方案中,可用标准的蛋白纯化技术通过合适的纯化方法,从细胞或组织来源分离出天然 BAFF-R 蛋白。另一方案中,用 DNA 重组技术制备 BAFF-R 蛋白。替代重组表达,可用标准的肽合成技术来化学合成 BAFF-R 蛋白或多肽。

[0131] “分离的”或“纯化的”蛋白或其生物活性片段是指,当 BAFF-R 蛋白是源自细胞或组织时,其中基本上不含有来自该细胞或组织的细胞物质或其他污染蛋白,或者当化学合成时,其中基本上不含化学前体或其他化学制品。“基本上不含细胞物质”这句话包括,在 BAFF-R 蛋白制品中,BAFF-R 蛋白与分离或重组制备该蛋白时所使用细胞的细胞成分已经被分离开来。一个技术方案中,“基本上不含细胞物质”这句话包括,BAFF-R 蛋白制品中非 -BAFF-R 蛋白(本文中又称污染蛋白)的含量低于约 30% (干重),优选低于约 20% 非 -BAFF-R 蛋白,还优选低于约 10% 非 -BAFF-R 蛋白,以及最优选低于约 5% 非 -BAFF-R 蛋白。当 BAFF-R 蛋白或其生物活性部分是重组制备时,还优选基本上不含细胞培养基,即细胞培养基在蛋白制品中所占的体积小于约 20%,更优选小于约 10%,以及最优选小于约 5%。

[0132] “基本不含化学前体或其它化学制品”这句话包括,在 BAFF-R 蛋白制品中,BAFF-R 蛋白与蛋白合成过程使用的化学前体或其他化学制品已经被分离开来。一个技术方案中,“基本不含化学前体或其它化学制品”这句话包括,BAFF-R 蛋白制品中,化学前体或非 -BAFF-R 化学制品的含量低于约 30% (干重),优选低于约 20% 的化学前体或非 -BAFF-R 化学制品,还优选低于约 10% 的化学前体或非 -BAFF-R 化学制品,以及最优选低于约 5% 的化学前体或非 -BAFF-R 化学制品。

[0133] BAFF-R 蛋白的生物活性部分包括含有与 BAFF-R 蛋白氨基酸序列足够同源的氨基酸序列的肽,或者其氨基酸序列来源于 BAFF-R 蛋白氨基酸序列的肽,例如 SEQ ID NO :5 所示的氨基酸序列,该序列比全长 BAFF-R 蛋白少数个氨基酸,并且表现出至少一种 BAFF-R 蛋白的活性。通常,生物活性部分包含具有至少 1 种 BAFF-R 蛋白活性的结构域或基序。BAFF-R 蛋白的生物活性部分可以是一种长度为例如 10、25、50、100 或更多个氨基酸的多肽。

[0134] 本发明所述的 BAFF-R 蛋白的生物活性部分可包含至少 1 个上述鉴定出的 BAFF-R

蛋白间保守的结构域。另外,BAFF-R 蛋白的生物活性部分也可以包含至少 2 个上述鉴定出的结构域。另外,BAFF-R 蛋白的生物活性部分也可以包含至少 3 个上述鉴定出的结构域。再者,BAFF-R 的生物活性部分也可以含有至少 4 个上述鉴定出的结构域。

[0135] 更进一步地,可以用重组技术制备出所述蛋白的其他区域被从中缺失的其他生物活性部分,然后评估天然 BAFF-R 蛋白的一种或多种功能活性。

[0136] 一个实施方案中,所述 BAFF-R 蛋白具有图 2D 所示的氨基酸序列 (SEQ ID NO :5)。其他实施方案中,所述的 BAFF-R 蛋白基本同源于图 2D (SEQ ID NO :5),并且保留了图 2D (SEQ ID NO :5) 所示蛋白的功能活性,然而,由于天然的等位变异或突变而导致氨基酸序列有所不同,具体描述见下文。因此,在另一实施方案中,BAFF-R 蛋白是一种包含与图 2D 所示氨基酸序列 (SEQ ID NO :5) 至少约 45% 同源的氨基酸序列的蛋白质,并且保留了图 2D 所示 (SEQ ID NO :5) BAFF-R 蛋白的功能活性。

[0137] 一些实施方案中,本发明包括 BAFF-R:Fc 多肽的特异突变体,对其进行设计是为了减弱所表达蛋白的凝聚但同时保留结合 BAFF 的活性。所述突变体,包括,例如编码 JST661 (SEQ ID NO :17), JST662 (SEQ ID NO :18), JST663 (SEQ ID NO :19), JST673 (SEQ ID NO :20), JST674 (SEQ ID NO :21), JST675 (SEQ ID NO :22), JST672 (SEQ ID NO :23), JST676 (SEQ ID NO :24), JST671 (SEQ ID NO :25), JST677 (SEQ ID NO :26), 及 JST678 (SEQ ID NO :27) 所示氨基酸序列的克隆。其他实施方案包括编码 BAFF-R 或 BAFF-R:Fc 多肽的突变体,其中所述的 BAFF-R 或 BAFF-R:Fc 多肽具有与天然的人源 BAFF-R 或 BAFF-R:Fc 多肽类似的凝聚特性,但是仍可结合 BAFF,包括,例如,包含 JST659 (SEQ ID NO :15), JST660 (SEQ ID NO :16), JST664 (SEQ ID NO :28), JST668 (SEQ ID NO :29), JST665 (SEQ ID NO :30), JST666 (SEQ ID NO :31) 和 JST667 (SEQ ID NO :32) 所示氨基酸序列的序列。其他实施方案包括编码 BAFF-R 或 BAFF-R:Fc 多肽的突变体,其中那些在人源 BAFF-R 和小鼠源 BAFF-R 间保守的氨基酸已改变为其他保守的氨基酸,其中所述的 BAFF-R 或 BAFF-R:Fc 多肽保留了结合 BAFF 的活性。其他实施方案中,所述突变体编码的 BAFF-R 或 BAFF-R:Fc 多肽具有在人源和小鼠 BAFF-R 间是非保守的氨基酸,这些氨基酸已经改变为其他氨基酸。优选地,非极性氨基酸突变为脯氨酸或不带电荷的极性氨基酸。

[0138] 确定两个或多个序列间的同源性

[0139] 为了确定两个氨基酸序列或两个核苷酸序列之间的同源百分比,将这些序列对齐以达到最佳比较目的 (例如,为了使第一氨基酸或核酸序列能与第二氨基酸或核酸序列最佳程度地对齐而向第一序列中导入空隙 (gap))。然后,在相应氨基酸或核苷酸位置上进行氨基酸残基或核苷酸的对比。当第一序列中某一位置被与第二序列相应位置处相同的氨基酸残基或核苷酸占据,那么这些分子在该位置上就是同源的 (即,本发明中出现的氨基酸或核酸的“同源性”等同于氨基酸或核酸的“同一性”)。

[0140] 核酸序列同源性可以确定为两序列间的同一性程度。可以使用本领域已知的电脑程序来测算同源性,如 GCG 程序软件包中提供的 GAP 软件。参见 Needleman 和 Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48 :443-453。使用 GCG GAP 软件,同时用如下的核酸序列比较的设定值:GAP 产生罚分 (GAP creation penalty) 为 5.0, GAP 延伸罚分 (GAP extension penalty) 为 0.3, 类似核酸序列的编码区是指上述与图 2A (SEQ ID NO :3)、图 2C (SEQ ID NO :4), 图 3 (SEQ ID NO :6) 所示 DNA 序列的 CDS (编码) 部分之间具有优选至少 70%、75%、80%、85%、90%、

95%、98%或99%同一性程度的序列。

[0141] “序列同一性”是指两个多核苷酸或多肽序列在所比较的具体区域逐个残基比较基础上得到的相同程度。“序列同一性百分比”通过下述方法计算而来：对在比较区域上最佳程度对齐的两个序列进行比较，测算在这两序列中都出现相同核酸碱基（例如，A，T，C，G，U，或I，就核酸而言）的位置的数目，从而得出匹配位置的数目，上述匹配位置的数目除以所比较区域中的位置总数（即，窗口大小），得到的结果乘以100即为序列同一性百分比。术语“基本同一”是指多核苷酸序列的一个特征，其中，所述多核苷酸包含的序列与参照序列之间在所比较区域上具有至少80%的序列同一性，优选至少85%的序列同一性，通常为90～95%的序列同一性，更经常为至少99%的序列同一性。

[0142] 嵌合蛋白及融合蛋白

[0143] 本发明还提供了BAFF-R嵌合或融合蛋白。在本发明中，BAFF-R“嵌合蛋白”或“融合蛋白”包含可操作地连接到非-BAFF-R多肽上的BAFF-R多肽。“BAFF-R多肽”是指具有对应于BAFF-R的氨基酸序列的多肽，而“非-BAFF-R多肽”是指具有对应于与BAFF-R基本上不同源的蛋白的氨基酸序列的多肽。例如，来自相同或不同生物体但不同于BAFF-R蛋白的蛋白。在BAFF-R融合蛋白中BAFF-R多肽可以为整个或部分的BAFF-R蛋白。一个技术方案中，BAFF-R融合蛋白包含至少1个BAFF-R蛋白的生物活性部分。另一实施方案中，BAFF-R融合蛋白包含至少2个BAFF-R蛋白的生物活性部分。另一实施方案中，BAFF-R融合蛋白包含至少3个BAFF-R蛋白的生物活性部分。在融合蛋白中，“可操作地连接”是指BAFF-R多肽和非-BAFF-R多肽彼此融合在同一个阅读框内。非-BAFF-R多肽可以融合到BAFF-R多肽的N-末端或C-末端。非-BAFF-R多肽可以是，例如，抗体的Fc部分。它可以可操作地连接到BAFF-R多肽的N-末端或C-末端。Fc-目标蛋白融合体的描述已公开于Lo et al. (1998) Protein Engineering 11:495-500，和美国专利5,541,087和5,726,044。这些文献公开的内容在此引入作为参考。

[0144] 例如，在一个实施方案中，BAFF-R融合蛋白包含可操作地连接于第二蛋白胞外结构域上的BAFF-R结构域。这类融合蛋白还可以用于筛选试验筛选能调节BAFF-R活性的化合物（这类实验的详述见下文）。

[0145] 另一实施方案中，所述融合蛋白为GST-BAFF-R融合蛋白，其中BAFF-R序列被融合到GST（即，谷胱甘肽S-转移酶）序列的C-末端。这类融合蛋白可有助于重组BAFF-R的纯化。

[0146] 另一实施方案中，所述融合蛋白为在其N-端含有异源信号序列的BAFF-R蛋白。例如，由于BAFF-R不含有它自己的信号序列，所以必须在BAFF-R编码序列的5'端融合一异源信号序列以使BAFF-R融合蛋白能有效地分泌。可以用不同的异源信号序列来增加BAFF-R的表达和/或分泌。

[0147] 另一实施方案中，所述融合蛋白为BAFF-R-免疫球蛋白融合蛋白，其中BAFF-R序列包含融合到来自免疫球蛋白家族成员的序列上的1个或多个结构域。本发明所述的BAFF-R-免疫球蛋白融合蛋白可纳入到药物组合 物中，给药给受试者以抑制BAFF-R配体和细胞表面BAFF-R蛋白间的相互作用，从而抑制体内BAFF-R介导的信号转导。所述BAFF-R-免疫球蛋白融合蛋白可用于影响BAFF-R相应配体的生物利用率。对BAFF-R配体/BAFF-R相互作用的抑制可用于治疗增殖和分化性疾病以及调控（例如，促进或抑制）细

胞存活。进一步地,本发明的 BAFF-R- 免疫球蛋白融合蛋白可用作免疫原在受试者体内制备抗 -BAFF-R 抗体,用来纯化 BAFF-R 配体,以及在筛选试验中用来鉴定能抑制 BAFF-R 与 BAFF-R 配体间相互作用的分子。

[0148] 本发明中的嵌合或融合蛋白可以用标准的重组 DNA 技术来制备。例如,用常规技术将编码不同多肽序列的 DNA 片段一起连接到阅读框内,例如通过使用平端或粘端连接,限制酶消化提供合适的末端,需要时粘性末端补平,碱性磷酸酶处理避免不需要的连接,以及酶连接。另一个技术方案中,可用常规技术合成融合基因,包括自动 DNA 合成仪。替代地,可用锚定引物进行基因片段的 PCR 扩增,这样就可以使两个连续的基因片段间伸出互补性的突出端,然后退火,再扩增生成嵌合基因序列(参见,例如, Ausubel et al. Eds. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992)。另外,可以购得多种编码融合元件(例如, GST 多肽)的表达载体。可将编码 BAFF-R 的核酸克隆入这类表达载体中,从而可使融合元件在阅读框内与 BAFF-R 蛋白连接。

[0149] 在一个优选的实施方案中,通过图 9 所示核酸序列 (SEQ ID NO :11) 及氨基酸序列 (SEQ ID NO :12) 提供了 BAFF-R 融合体。

[0150] BAFF-R 激动剂及拮抗剂

[0151] 本发明还提供了 BAFF-R 蛋白的变体,这些变体可作为 BAFF-R 激动剂(模拟物)或 BAFF-R 拮抗剂。可通过诱变制备 BAFF-R 蛋白的变体,例如,离散性点突变(discrete point mutation)或 BAFF-R 蛋白的截短。BAFF-R 蛋白的激动剂保留了与天然形式的 BAFF-R 蛋白基本相同的生物活性,或其中的一部分的生物活性。BAFF-R 蛋白的拮抗剂能抑制天然形式 BAFF-R 蛋白的一种或多种活性,例如,通过竞争性结合其中包括 BAFF-R 蛋白的细胞信号级联反应中的下游或上游成员。因此,可以通过用具有限制功能的变体的处理来引发特定的生物学效应。一个实施方案中,用具有天然形式蛋白的部分生物活性的变体处理受试者,与用天然形式的 BAFF-R 蛋白处理受试者相比,产生的副作用要小得多。

[0152] 可用作 BAFF-R 激动剂(模拟物)或 BAFF-R 拮抗剂的 BAFF-R 蛋白变体可以通过下述方法鉴定:根据 BAFF-R 的激动剂或拮抗剂活性,对 BAFF-R 蛋白变体如截短变体的组合文库进行筛选,选出具有激动或拮抗活性的 BAFF-R 蛋白。一个实施方案中,可通过核酸水平上的组合诱变制备出 BAFF-R 变体的花斑文库(variegated library),该文库由一花斑基因文库编码。BAFF-R 变体的花斑文库例如可用下述方法制备:将合成的寡核苷酸的混合物酶促连接入基因序列,因此,一组简并的潜在 BAFF-R 序列可被表达为多个单独的多肽,或表达为一组较大的融合蛋白(例如,用于噬菌体展示),该融合蛋白中含有该组 BAFF-R 序列。许多方法都能从简并的寡核苷酸序列制得潜在 BAFF-R 变体的文库。简并的基因序列的化学合成可以在自动 DNA 合成仪上进行,然后将合成的基因连接入适当的表达载体。使用一组简并基因可在一混合物中得到编码所期望的那组潜在 BAFF-R 序列的全部序列。合成简并寡核苷酸的方法已为本领域已知(参见,例如, Narang (1983) Tetrahedron 39 :3 ; Itakura et al. (1984) Ann. Rev. Biochem. 53 :323 ; Itakura et al. (1977) Science 198 : 1056-1063 ; Ike et al. (1983) Nucl. Acids Res. 11 :477-488。

[0153] 多肽文库

[0154] 此外,可以用 BAFF-R 蛋白编码序列的片段的文库来制备 BAFF-R 片段的花斑群(variegated population),用于 BAFF-R 蛋白变体的筛选及随后的选择。一个实施方案中,

编码序列片段的文库可通过下述方法来制备：在每个分子仅发生约 1 次切割的条件下用核酸酶处理 BAFF-R 编码序列的双链 PCR 片段，变性该双链 DNA，然后再复性该 DNA 形成其中含有来自不同切割产物的正义 / 反义对的双链 DNA，通过用 S1 核酸酶处理从重新形成的双螺旋中除去单链部分，将得到的片段文库连接入表达载体。用该方法可以得到编码 BAFF-R 蛋白不同大小的 N- 末端片段及中间片段的表达文库。

[0155] 几种本领域已知的技术可用于对通过点突变或截短方法制得的组合文库的基因产物进行筛选，以及用于从 cDNA 文库中筛选具有选择特性的基因产物。可使这项技术适应于对通过组合诱变 BAFF-R 蛋白制得的基因文库进行快速筛选。可对上述那些使用最广泛的技术进行修改以用于高通量 分析，筛选大基因文库，这样的技术通常包括：将基因文库克隆入可复制表达载体中，用得到的载体文库转化合适的细胞，然后在下述条件下表达上述组合基因，即在这样的条件下对目的活性的检测能使编码所检测产物基因的载体得到分离。Recursive ensemble mutagenesis (REM) 是一种新的技术，该项技术能够提高文库中功能突变体的出现的频率，该技术可与筛选试验联合使用鉴定 BAFF-R 变体 (Arkin and Yourvan (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 :7811-7815 ; Delgrave et al (1993) Protein Engineering 6 :327-331)。

[0156] 抗 -BAFF-R 抗体

[0157] 可用分离的 BAFF-R 蛋白或其部分或片段作为免疫原，按照标准的多克隆及单克隆制备技术，制备能结合 BAFF-R 的抗体。可以使用全长的 BAFF-R 蛋白，替代地，本发明提供了可用作免疫原的 BAFF-R 的抗原性肽片段。BAFF-R 抗原性肽片段包含图 2D 所示序列 (SEQ ID NO :5) 中的至少 8 个氨基酸残基，并且还包含 BAFF-R 的表位以使抗该肽的抗体能够与 BAFF-R 形成特异性的免疫复合物。优选地，抗原性肽包含至少 10 个氨基酸残基，更优选至少 15 个氨基酸残基，甚至更优选至少 20 个氨基酸残基，以及最优选至少 30 个氨基酸残基。优选的抗原性肽所包含的表位为位于 BAFF-R 蛋白表面的区域，例如亲水区域。

[0158] 如本发明所述，图 2D (SEQ ID NO :5) 所示的 BAFF-R 蛋白序列或者其衍生物、片段、类似物或同系物都可以用作免疫原制备能免疫特异性结合这些蛋白组分的抗体。本发明中的“抗体”是指免疫球蛋白分子以及免疫球蛋白分子的免疫学活性部分，所述分子即其中含有能特异性结合（发生免疫反应）抗原如 BAFF-R 的抗原结合位点的分子。所述抗体包括，但不限于，多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、单链抗体、Fab 和 F(ab')₂ 片段，以及 Fab 表达文库。在一个特定的实施方案中，公开了抗人 BAFF-R 蛋白的抗体。各种本领域已知的方法都可用于制备抗图 2D (SEQ ID NO :5) 所示 BAFF-R 蛋白序列或者其衍生物、片段、类似物或同系物的多克隆或单克隆抗体。下文对这些蛋白中的一些进行讨论。

[0159] 为了制备多克隆抗体，可通过用天然蛋白或其合成变体或它们的衍生物注射各种合适的宿主动物（例如，兔、山羊、小鼠或其他哺乳动物）来免疫。合适的免疫原制剂包括，例如，重组表达的 BAFF-R 蛋白或者化学合成的 BAFF-R 多肽。该制剂可进一步包括佐剂。各种用来增强免疫应答的佐剂包括，但不限于，弗氏（完全和不完全）佐剂、矿物凝胶（例如，氢氧化铝）、表面活性剂（例如，溶血卵磷脂，普卢兰尼克多元醇 (pluronic polyols)，聚阴离子，肽，油性乳剂，二硝基酚等），人用佐剂如卡介菌 (BCG) 和小棒状杆菌，或类似的免疫刺激剂。如果需要，可从哺乳动物（例如，从血液）分离抗 BAFF-R 抗体，并用熟知的技术进行纯化，如蛋白 A 层析获得 IgG 级分。

[0160] 本发明中的“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指其中仅含有一种能与 BAFF-R 特定表位免疫反应的抗原结合位点的抗体分子群。因此,单克隆抗体组合物通常表现针对与其免疫反应的特定 BAFF-R 蛋白的单一的结合亲和力。为了制备针对一特定 BAFF-R 蛋白或者其衍生物、片段、类似物或同系物的单克隆抗体,任一种通过连续细胞系培养制备抗体分子的方法都可使用。这类技术包括,但不限于,杂交瘤技术(参见 Kohler & Milstein, (1975) Nature 256:495-497); trioma 技术; 人 B- 细胞杂交瘤技术(参见 Kozbor et al. (1983) Immunol. Today 4:72) 以及制备人单克隆抗体的 EBV 杂交瘤技术(见, Cole, et al. MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., 1985, pp. 77-96)。人单克隆抗体可用于实施本发明,并可用人杂交瘤技术(见 Cote et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030) 或用 EB 病毒体外转化人 B- 细胞(参见 Cole et al. MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., 1985 pp. 77-96) 来制备。

[0161] 根据本发明,可调整上述技术以用于制备特异性针对 BAFF-R 蛋白的单链抗体(参见,例如,美国专利 4,946,778)。此外,上述方法可调整用于构建 Fab 表达文库(参见,例如, Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281) 使得可以快速有效地鉴定出期望的特异性针对 BAFF-R 蛋白或者其衍生物、片段、类似物或同系物的单克隆 Fab 片段。可用本领域众所周知的技术使非-人抗体“人源化”。参见,例如,美国专利 5,225,539。含有针对 BAFF-R 蛋白独特型的抗体片段可用本领域已知技术来制备,这些技术包括,但不限于:(i) 用胃蛋白酶消化抗体分子得到 $F(ab')_2$ 片段;(ii) 还原 $F(ab')_2$ 片段的二硫键得到 Fab 片段;(iii) 用木瓜蛋白酶和还原剂处理抗体分子得到 Fab 片段,以及 (iv) Fv 片段。

[0162] 此外,重组抗-BAFF-R 抗体,如嵌合及人源化单克隆抗体,其中包含人源和非人源部分,可以用常规的重组 DNA 技术来制备,它们也在本发明的范围之内。这些嵌合及人源化单克隆抗体可用本领域已知重组 DNA 技术来制备,例如用下列文献描述的方法:PCT 国际申请 PCT/US86/02269; 欧洲专利申请 184,187; 欧洲专利申请 171,496; 欧洲专利申请 173,494; PCT 国际公开号为 WO 86/01533 的专利; 美国专利 4,816,567; 欧洲专利申请 125,023; Better et al. (1988) Science 240:1041-1043; Liu et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu et al. (1987) J. Immunol. 139:3521-3526; Sun et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura et al. (1987) Cancer Res. 47:999-1005; Wood et al. (1985) Nature 314:446-449; Shaw et al. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison (1985) Science 229:1202-1207; Oi et al. (1986) BioTechniques 4:214; 美国专利 5,225,539; Jones et al. (1986) Nature 321:552-525; Verhoeyan et al. (1988) Science 239:1534; 和 Beidler et al. (1988) J. Immunol. 141:4053-4060。

[0163] 一个实施方案中,用于筛选具有目的特异性抗体的方法包括,但不限于,,酶联免疫吸附试验 (ELISA) 以及本领域已知的其他免疫学-介导的技术。在特定的实施方案中,特异于 BAFF-R 蛋白一具体结构域的抗体的选择通过制备能与具有所述结构域的 BAFF-R 蛋白的片段结合的杂交瘤来实现。本发明还提供了特异于 BAFF-R 蛋白内一个或多个结构域的抗体(例如跨越上述鉴定到的 BAFF-R 家族蛋白保守区域的结构域的抗体),或者其衍生物、片段、类似物或同系物。

[0164] 抗-BAFF-R 抗体可用于本领域已知的涉及 BAFF-R 蛋白定位和 / 或定量的方法中 (例如,用于检测合适的生理样品中 BAFF-R 蛋白的水平,用于诊断方法,用于蛋白成像,等)。在一个给定的实施方案中,抗 BAFF-R 蛋白的抗体或者其衍生物、片段、类似物或同系物 (含有源自所述抗体的结合结构域),可用作药理学上的活性化合物 (下文称为“治疗剂”)。

[0165] 抗-BAFF-R 抗体 (例如,单克隆抗体) 可用于常规技术分离 BAFF-R,所述技术例如亲和和层析或免疫沉淀。抗-BAFF-R 抗体可用于纯化细胞中的天然 BAFF-R 以及表达在宿主细胞中重组制备的 BAFF-R。另外,抗-BAFF-R 抗体可用来检测 BAFF-R 蛋白 (例如,细胞裂解物或细胞上清液中的 BAFF-R 蛋白) 以评定 BAFF-R 蛋白表达的丰度及模式。抗-BAFF-R 抗体可在诊断方面应用以监测组织中的蛋白水平,这已成为临床检测方法的一部分,例如,用于测定特定治疗方案的效力。检测可通过将抗体连接 (即,物理性连接) 到一可检测物质上来而变得更容易进行。可检测物质的实例包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料以及放射性物质。合适的酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基复合物的实例包括,链霉亲和素 / 生物素以及亲和素 / 生物素;合适的荧光材料的实例包括伞形酮,荧光素,异硫氰酸荧光素,若丹明,二氯三嗪基胺 (dichlorotriazinylamine),荧光素,丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料的实例包括鲁米诺 (luminol);生物发光材料的实例包括荧光素酶,荧光素及发光蛋白质 (aeguerin);以及合适的放射性物质的实例包括 ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S 或 ^3H 。

[0166] BAFF-R 重组表达载体及宿主细胞

[0167] 本发明的另一方面涉及载体,优选表达载体,其中含有编码 BAFF-R 蛋白或者其衍生物、片段、类似物或同系物的核酸。本发明中的“载体”是指能够运输已连接于其上的另一核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”,是一种环形双链 DNA 环,外加的 DNA 片段可以连接于其中。另一类型的载体为病毒载体,其中外加的 DNA 片段可连接于病毒基因组中。一些载体在它们被导入的宿主细胞中能够自行复制 (例如,具有细菌复制起始位点的细菌载体以及附加型哺乳动物载体)。其他载体 (例如,非-附加型哺乳动物载体) 当导入宿主细胞时,被整合入宿主细胞基因组中,因而随基因组一起复制。

[0168] 另外,某些载体能够指导被可操作地连接于其上的基因的表达。这类载体本发明称之为“表达载体”。通常,重组 DNA 技术中用到的表达载体往往是质粒的形式。由于质粒是最常用的载体形式,因而本说明书中,“质粒”和“载体”可交互使用。但是,本发明还包括所述其他形式的表达载体,如病毒载体 (例如,复制缺陷型反转录病毒,腺病毒以及腺相关病毒),它们发挥着同样的功能。

[0169] 本发明所述的重组表达载体包含本发明所述的核酸,该核酸以适于其在宿主细胞中表达的形式存在,这就意味着该重组表达载体包含一个或多个根据表达所用的宿主细胞而选择的调控序列,这些调控序列可操作地连接于要表达的核酸序列。在重组表达载体中,“可操作地连接”是指将目的核苷酸序列以能允许其表达的方式连接于调控序列 (例如,在体外转录 / 翻译系统中或者当该载体被导入宿主细胞时在宿主细胞内)。术语“调控序列”包括启动子、增强子及其他表达控制元件 (例如,聚腺苷酸化信号)。这类调控序列的描述见,例如,Goeddel "Gene Expression Technology" METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif., 1990。调控序列包括那些指导在多种类型宿主细胞中核苷酸序列组成型表达的序列以及那些指导核苷酸序列仅在一些宿主细胞中表达的序列

(例如,组织-特异性调控序列)。本领域技术人员可以理解的是,表达载体的设计要取决于被转化宿主细胞的选择、所期望的蛋白表达水平等因素。本发明中的表达载体被导入宿主细胞从而制备出由本发明所述核酸编码的蛋白质或肽,包括融合蛋白或肽(例如,BAFF-R蛋白,突变形式的BAFF-R,融合蛋白等)。

[0170] 本发明中的重组表达载体可被设计用于在原核或真核细胞中表达BAFF-R。例如,BAFF-R可表达于细菌细胞,如大肠杆菌、昆虫细胞(用杆状病毒表达载体)、酵母细胞或哺乳动物细胞。合适的宿主细胞的讨论另见于Goeddel,"Gene Expression Technology" METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif., 1990。替代地,重组表达载体可在体外转录及翻译,例如,用T7启动子调控序列及T7聚合酶。

[0171] 蛋白质的原核细胞表达最常在含载体的大肠杆菌中进行,所述载体包含指导融合或非融合蛋白质表达的组成型或可诱导型启动子。融合载体向所编码的蛋白添加许多个氨基酸,通常添加到重组蛋白的氨基末端。这类融合载体通常要达到三个目的:(1)增加重组蛋白的表达;(2)增加重组蛋白的溶解性;以及(3)通过作为亲和纯化中的配体帮助重组蛋白的纯化。通常,在融合表达载体中,在融合单元与重组蛋白的结合处引入蛋白水解酶的切割位点,这样确保在融合蛋白纯化后可将重组蛋白同融合单元分离开来。所述酶及它们的相应识别序列,包括因子Xa,凝血酶及肠激酶。常用的融合表达载体包括pGEX(Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson(1988)Gene 67:31-40), pMAL(New England Biolabs, Beverly, Mass.)和pRIT5(Pharmacia, Piscataway, N. J.), 这些载体分别将谷胱甘肽S-转移酶(GST)、麦芽糖E结合蛋白或蛋白A融合于目标重组蛋白。

[0172] 合适的可诱导的非融合大肠杆菌载体的实例包括pTrc(Amrann et al., (1988) Gene 69:301-315)和pET11d(Studier et al., "Gene Expression Technology" METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif., 1990, pp. 60-89)。

[0173] 使大肠杆菌中重组蛋白表达最大化的一个策略是在蛋白酶切割重组蛋白能力被减弱的宿主细菌中表达蛋白质。见,Gottesman,"Gene Expression Technology" METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif., 1990, pp. 119-128。另一个策略是改变要插入表达载体的核酸的核酸序列以使得每一氨基酸的单个密码子都是大肠杆菌优先使用的密码子(Wada et al., (1992) Nucleic Acids Res. 20:2111-2118)。本发明所述这种核酸序列变化可以用常规的DNA合成技术来实施。

[0174] 另一个实施方案中,BAFF-R表达载体是酵母表达载体。用于酵母(例如,酿酒酵母)中表达的载体的实例包括pYepSec1(Baldari, et al., (1987) EMBO J. 6:229-234)、pMFa(Kurjan and Herskowitz, (1982) Cell 30:933-943)、pJRY88(Schultz et al. (1987) Gene 54:113-123)、pYES2(Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.), 用于巴斯德毕赤氏酵母(P. Pastoris)表达的载体的实例包括pPIC载体家族(Invitrogen Corp, San Diego, Calif.)。

[0175] 替代地,BAFF-R可用杆状病毒表达载体在昆虫细胞中表达。现有的可用于在培养的昆虫细胞(例如,SF9细胞)中表达蛋白的杆状病毒载体包括pAc系列(Smith et al. (1983) Mol. Cell. Biol. 3:2156-2165)和pVL系列(Lucklow and Summers(1989) Virology 170:31-39)。

[0176] 另一个实施方案中,本发明所述的核酸用哺乳动物表达载体表达在哺乳动物

细胞中。哺乳动物表达载体的实例包括 pCDM8 (Seed (1987) Nature 329 :840-842) 和 pMT2PC (Kaufman et al. (1987) EMBO J. 6 :187-195)。当用于哺乳动物细胞时,所述表达载体的调控功能通常是由病毒调控元件来提供的。例如,常常使用来自多瘤病毒、腺病毒 2、巨细胞病毒和猴病毒 40 (SV40) 的启动子。其他对于原核细胞及真核细胞均适合的表达系统参见,例如 Sambrook et al., MOLECULAR CLONING :A LABORATORY MANUAL. 2ND ED., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ColdSpring Harbor, N. Y., 1989. 的第 16 和 17 章。

[0177] 另一实施方案中,重组哺乳动物表达载体能够指导核酸在特定细胞类型中优先表达(例如,用组织特异性调控元件来表达核酸)。组织特异性调控元件已为本领域已知。合适的组织特异性启动子的非限制性实例包括白蛋白启动子(肝特异性;Pinkert et al. (1987) Genes Dev. 1 :268-277)、淋巴-特异性启动子 (Calame 和 Eaton (1988) Adv. Immunol. 43 :235-275), 具体有 T 细胞受体启动子 (Winoto 和 Baltimore (1989) EMBO J. 8 :729-733) 和免疫球蛋白启动子 (Banerji et al. (1983) Cell 33 :729-740; Queen 和 Baltimore (1983) Cell 33 :741-748)、神经元-特异性启动子(例如,神经丝启动子;Byrne 和 Ruddle (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 :5473-5477), 胰腺-特异性启动子 (Edlund et al. (1985) Science 230 :912-916)、以及乳腺-特异性启动子(例如,乳清启动子;美国专利 4,873,316 和公开号为 264,166 的欧洲申请)。还包括发育-调控启动子,例如小鼠 hox 启动子 (Kessel 和 Gross (1990) Science 249 :374-379) 和 α -胎蛋白启动子 (Campes 和 Tilghman (1989) Genes Dev. 3 :537-546)。

[0178] 本发明进一步还提供了重组表达载体,其中含有以反义方向克隆入该表达载体中的本发明所述 DNA 分子。也就是说,该 DNA 分子被可操作地连接于调控序列,连接方式可使与 BAFF-R mRNA 反义的 RNA 分子能够被表达(通过 DNA 分子的转录)。可以选择能指导反义 RNA 分子在多种类型细胞中连续表达的调控序列,将其可操作地连接于以反义方向克隆的核酸,例如可以选择病毒启动子和/或增强子,或调控序列,以使它们能指导反义 RNA 组成性、组织特异性或细胞类型特异性的表达。反义表达载体可以是重组质粒、噬菌粒或减毒的病毒,在这些载体中反义核酸在高效调控区域的控制下生成,其活性可以通过该载体导入的细胞类型来测定。有关用反义基因来调控基因的表达的讨论见 Weintraub et al. (1986) " Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis, " Reviews--Trends in Genetics, 1(1) :。

[0179] 本发明另一方面涉及已导入了本发明所述重组表达载体的宿主细胞。术语“宿主细胞”和“重组宿主细胞”在本发明中可交互使用。应该理解的是这类术语不仅指具体受试细胞而且也指该细胞的后代或可能的后代。虽然在连续传代过程中由于突变或环境影响可能会发生一些修饰,而使所述后代实际上可能已经不同于亲代细胞,但是它们仍包括在本发明使用术语包括的范围之内。

[0180] 宿主细胞可以是任一原核或真核细胞。例如,BAFF-R 蛋白可以表达于细菌细胞如大肠杆菌、昆虫细胞、酵母或哺乳动物细胞(如中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 或 COS 细胞)。其他合适的宿主细胞已为本领域技术人员已知。

[0181] 可通过常规的转化或转染技术,将载体 DNA 导入原核或真核细胞。本发明使用的“转化”和“转染”是指多种本领域认可的将外源核酸(例如, DNA) 导入宿主细胞

的技术,包括磷酸钙或氯化钙共沉淀、DEAE-葡聚糖-介导的转染、脂质转染法或电穿孔。用于转化或转染宿主细胞的合适方法可见于 Sambrook et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL 2ND ED., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989), 以及其他实验手册。

[0182] 就稳定转染哺乳动物细胞而言,本领域已知,根据所使用的表达载体及转染技术,只有一小部分细胞可将外源 DNA 整合入其基因组。为了鉴定和选择这些整合子,通常将编码可选择标记(对抗生素的抗性)的基因与目的基因一起导入宿主细胞。各种可选择标记物包括那些赋予药物抗性的标记物,如对 G418、潮霉素及甲氨蝶呤的抗性的标记物。可将编码可选择标记物的核酸与编码 BAFF-R 的核酸置于同一载体导入宿主细胞,或者各自置于不同载体。被导入核酸稳定转染的细胞可通过药物筛选来鉴定(例如,已引入可选择标记物的细胞将存活,而其他细胞会死亡)。

[0183] 本发明的宿主细胞,如培养物中的原核细胞或真核宿主细胞,可用来制备(即,表达)BAFF-R 蛋白。因此,本发明进一步提供了用本发明所述宿主细胞制备 BAFF-R 蛋白的方法。在一个实施方案中,该方法包括:将本发明所述宿主细胞(其中已经导入了编码 BAFF-R 的重组表达载体)培养在合适的培养基中从而生成 BAFF-R 蛋白。另一实施方案中,该方法进一步还包括从培养基或宿主细胞中分离 BAFF-R。

[0184] 转基因动物

[0185] 本发明的宿主细胞还可以用于制备非人转基因动物。例如,在一个实施方案中,本发明的宿主细胞为其中导入了 BAFF-R 编码序列的受精的卵母细胞或胚胎干细胞。然后将这种宿主细胞用于生产非人转基因动物,在该动物中外源 BAFF-R 序列已被导入其基因组中,或者将这种宿主细胞用于生产同源重组动物,其中内源 BAFF-R 序列已被改变。上述这些动物可用于研究 BAFF-R 的功能和/或活性,以及用于鉴定和/或评估 BAFF-R 活性的调节剂。本发明中的“转基因动物”是非人动物,优选为哺乳动物,更优选为啮齿类动物如大鼠或小鼠,其中该动物的一个或多个细胞包含转基因。转基因动物的其他实例包括非人灵长类动物、绵羊、狗、牛、山羊、鸡、两栖类动物,等。转基因是外源 DNA,其被整合入细胞的基因组中,转基因动物从该细胞发育而来,并且该外源 DNA 仍保留在成熟动物的基因组中,从而指导所编码的基因产物在转基因动物的一种或多种类型细胞或组织中表达。本发明中的“同源重组动物”为非-人动物,优选为哺乳动物,更优选为小鼠,其中内源性 BAFF-R 基因由于该内源基因与导入该动物细胞(例如,动物发育之前的动物胚胎细胞)的外源 DNA 分子间的同源重组而被改变。

[0186] 本发明的转基因动物可以通过将编码 BAFF-R 的核酸导入受精卵母细胞的雄前核(male pronuclei)制得,例如通过微注射、反转录病毒感染以及让卵母细胞在假孕雌性养育动物体内发育。图 2A (SEQ ID NO :3), 图 2C (SEQ ID NO :4), 图 3 (SEQ ID NO :6) 所示的人源 BAFF-R DNA 序列可作为转基因被导入非-人动物的基因组。

[0187] 替代地,人源 BAFF-R 基因的非人源同系物,如小鼠 BAFF-R 基因(图 4A) (SEQ ID NO :8),可通过与人源 BAFF-R cDNA(上文有进一步的描述)的杂交而分离得到,并用做转基因。内含子序列及聚腺苷酸化信号也可被包含在转基因中用以提高转基因的表达效率。组织-特异性调控序列可以被可操作地连接于 BAFF-R 转基因用来指导 BAFF-R 蛋白在特定细胞中的表达。用于通过胚胎操作和微注射制备转基因动物的方法,具体为小鼠等动物,已经

成为本领域的常规技术,其描述见,例如美国专利 4,736,866 ;4,870,009 ;和 4,873,191 ;以及 Hogan 所著 MANIPULATING THE MOUSE

[0188] EMBRYO, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986。类似方法可用于其他转基因动物的制备。转基因建立动物 (transgenic founder animal) 可根据其基因组中是否有 BAFF-R 转基因存在和/或该动物组织或细胞中是否有 BAFF-R mRNA 的表达来鉴定。然后将转基因建立动物用于再繁殖带有该转基因的动物。另外,带有编码 BAFF-R 转基因的转基因动物还可繁殖其他带有别的转基因的转基因动物。

[0189] 为了创建同源重组动物,制备其中含有至少一部分 BAFF-R 基因的载体,这部分基因中导入了缺失、添加或取代从而改变了(例如功能性地破坏)BAFF-R 基因。BAFF-R 基因可以为人类基因(例如,图 2A(SEQ ID NO:3),图 2C(SEQ ID NO:4),图 3(SEQ ID NO:6)),但更优选为人类 BAFF-R 基因的非-人同系物。例如,图 2A(SEQ ID NO:3)、图 2C(SEQ ID NO:4)、图 3(SEQ ID NO:6)所示人类 BAFF-R 基因的小鼠同系物(图 4a)可用于构建适于改变小鼠基因组中内源 BAFF-R 基因的同源重组载体。在一个实施方案中,设计载体使得,当进行同源重组时,内源性 BAFF-R 基因被功能性地破坏(即,不再编码功能蛋白;该载体也称为“敲除”载体)。

[0190] 替代地,载体可被设计成这样,当进行同源重组时,内源性 BAFF-R 基因突变或被改变但是仍能编码功能蛋白(例如,上游调控区域被改变从而改变了内源 BAFF-R 蛋白的表达)。在同源重组载体中,BAFF-R 基因的被改变部分的 5' 和 3' 端连接有 BAFF-R 基因的其他核酸从而可使该载体所携带的外源 BAFF-R 基因与胚胎干细胞中的内源 BAFF-R 基因之间能够发生同源重组。为了能与内源基因间成功进行同源重组,上述侧翼连接的 BAFF-R 基因的其他核酸要有足够的长度。通常,载体中包含几个 Kb 长的侧翼 DNA(5' 和 3' 端均如此)。参见,例如,Thomas et al. (1987)Cell 51:503 中的同源重组载体的描述。该载体被导入胚胎干细胞系(例如,通过电穿孔)。选取在其中已经发生了被导入 BAFF-R 基因与内源 BAFF-R 基因间的同源重组的细胞(参见,例如,Li et al. (1992)Cell 69:915)。

[0191] 然后将被选取的细胞注射入动物(例如,小鼠)的胚胎形成聚集嵌合体 (aggregation chimera)。参见,例如,Bradley, TERATOCARCINOMAS AND EMBRYONIC STEM CELLS: A PRACTICAL APPROACH, Robertson, Ed. IRL, Oxford, 1987, pp. 113-152。然后,将嵌合胚胎植入合适的假孕雌性养育动物,使胚胎发育至足月。在其生殖细胞中带有同源重组的 DNA 的后代可用来繁殖动物,在繁殖得到的动物中由于转基因的生殖系传递而使得该后代动物的所有细胞中都含有所述同源重组的 DNA。用于构建同源重组载体和同源重组动物的方法还可参见 Bradley (1991)Curr. Opin. Biotechnol. 2:823-829;PCT 国际公开号:WO 90/11354;WO 91/01140;WO 92/0968;和 WO 93/04169。

[0192] 另一实施方案中,制备的转基因非-人动物中含有可保证转基因调控表达的选择系统。所述系统的一个实例为噬菌体 P1 的 cre/loxP 重组酶系统。cre/loxP 重组酶系统的描述,参见,例如,Lakso et al. (1992)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-6236。重组酶系统的另一实例为酿酒酵母的 FLP 重组酶系统 (O' Gorman et al. (1991)Science 251:1351-1355)。如果用 cre/loxP 重组酶系统来调控转基因的表达,那么就需要动物中含有编码 Cre 重组酶和被选择蛋白的转基因。这类动物可以通过构建“双”转基因动物来得到,例如通过让两个转基因动物交配,其中的一个含有编码选择蛋白的转基因,而另一个含有编

码重组酶的转基因。

[0193] 本发明所述的非-人转基因动物的克隆还可用下列文献中描述的方法来制备：Wilmut et al. (1997) Nature 385 :810-813。简而言之，可将来自转基因动物的细胞，例如体细胞，分离出来，并诱导其脱离生长周期进入 G0 期。然后，将该静止期细胞通过电脉冲融合入被摘除细胞核的卵母细胞，该卵母细胞与所述静止细胞分离自同一种动物。然后，培养重新构建的卵母细胞从而使其发育成桑椹胚或胚细胞，然后将其转移到假孕雌性养育动物。该雌性养育动物所繁殖的后代就是可从中分离细胞，例如体细胞的动物克隆。

[0194] 药物组合物

[0195] BAFF-R 核酸分子、BAFF-R 蛋白以及抗-BAFF-R 抗体（本发明中又称为“活性化合物”），及其衍生物、片段、类似物和同系物，都可以掺入适于给药的药物组合物中。这类组合物通常包括核酸分子、蛋白质或抗体以及药物学上可接受载体。本发明使用的“药物学上可接受载体”是指与药物给药相适宜的任一及所有溶剂、分散介质、包被物、抗菌及抗真菌剂、等涉及吸收延迟剂等。合适载体的描述见最新版的 Remington's Pharmaceutical Sciences, 本领域一标准教科书，在此引入作为参考。这类载体或稀释剂的优选实例包括，但不限于，水、盐水、finger's 溶液、葡萄糖溶液以及 5% 人血清白蛋白。也可使用脂质体及无水载体如不挥发性油。这类用于药物活性物质的介质及试剂的使用为本领域技术人员所熟知。除非任一常规介质或试剂与活性化合物不相容，否则其在组合物中的用途都是可预期的。另外，还可在组合物中掺入辅助性活性化合物。

[0196] 本发明药物组合物配制成与其给药途径相容的形式。所述给药途径的实例包括肠胃外给药，例如，静脉内、皮内、皮下、经口（例如，吸入）、经皮（局部）、经粘膜及直肠给药。用于肠胃外、皮内或皮下使用的溶液或悬液可以包括下列组分：用于注射的无菌溶剂如注射用水、盐溶液、不挥发的油、聚乙二醇、甘氨酸、丙二醇或其他合成溶剂；抗菌试剂如苯甲醇或甲基对羟基苯甲酸酯；抗氧化剂如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合剂如乙二胺四乙酸（EDTA）；缓冲液如醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐的缓冲液，以及用于调节张力的溶剂如氯化钠或葡萄糖。PH 可用酸或碱来调节，如盐酸或氢氧化钠。肠胃外给药制剂可以封装入安瓿、一次性注射器或玻璃或塑料制的多剂小瓶中。

[0197] 适于注射使用的药物组合物包括无菌水溶液（当可溶于水时）或分散液（dispersion）以及用于即时配制无菌注射溶液或分散液的无菌粉末。就静脉给药而言，合适载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL (BASF, Parsippany, N. J.) 或磷酸盐缓冲液 (PBS)。所有情况下，所述组合物都必须无菌而且均应当为流动性达到易于注射的程度。它必须在制造和储存条件下是稳定的，还必须防止微生物如细菌和真菌的污染。所述载体可以是一种溶剂或分散介质含有，例如水、乙醇、多元醇（例如甘油、丙二醇及液态聚乙二醇等），及其合适的混合物。保持适当的流动性可以通过，例如，使用卵磷脂等包被，在分散液情况下保持所需颗粒大小，以及使用表面活性剂来实现。防止微生物污染可以通过各种抗菌及抗真菌的试剂来实现，例如，对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚，抗坏血酸，乙基汞硫代水杨酸钠等。在许多情况下，优选在组合物中包含等渗试剂，例如糖，多元醇如甘露糖醇、山梨醇，氯化钠。注射组合物的缓慢吸收可以通过在该组合物中包含一延迟吸收的试剂来实现，例如一硬脂酸铝和明胶。

[0198] 无菌注射液可以通过向合适溶剂中引入需要量的活性化合物（例如，BAFF-R 蛋白

或抗-BAFF-R 抗体) 以及一种或多种上述列举成分(如需要), 然后过滤灭菌制备而成。通常, 分散液的制备方法为将活性化合物引入一种含有基本分散介质以及上述列举的所需其他成分的无菌载体中。就用于制备无菌注射溶液的无菌粉末而言, 制备方法为真空干燥和冷冻干燥, 所产生的活性成分的粉末中再加入由预先无菌过滤的溶液制得的其它的所需成分。

[0199] 口服组合物通常包括一惰性溶剂或可食用载体。它们可以被包裹在明胶胶囊中或被压缩成片剂。当口服治疗给药时, 可将所述活性化合物和赋形剂组合在一起, 以片剂、锭剂或胶囊的形式使用。口服组合物还可用于流体载体制备成漱口剂来使用, 其中流体载体中的化合物可在口腔中敷涂, 漱口后吐出或咽下。药物相容的粘合剂, 和 / 或佐剂材料也可以掺入作为组合物的部分。所述片剂、丸剂、胶囊、锭剂等可含有下列成分中的任一种, 或类似性质的化合物: 粘合剂如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶; 赋形剂如淀粉或乳糖; 崩解剂如褐藻酸 (alginic acid)、Primogel 或玉米淀粉; 润滑剂如硬脂酸镁或 Sterotes; 助流剂 (glidant) 如胶状二氧化硅; 甜味剂如蔗糖或糖精; 或调味剂如薄荷油、甲基水杨酸盐或桔味矫味剂。

[0200] 就吸入给药而言, 所述化合物以气溶胶喷射方式从受压容器或配送器中释放出来, 所述容器中含有适当的抛射剂, 例如气体 (如二氧化碳), 或所述化合物也可以从喷雾器中释放出来。

[0201] 另外还可以通过经粘膜或经皮的方式来系统给药。就经粘膜或经皮给药而言, 在制剂中使用了适合于要通透屏障的渗透剂。这类渗透剂通常为本领域所已知, 包括, 例如, 经粘膜给药时, 清洁剂、胆汁酸盐和梭链孢酸衍生物。经粘膜给药可通过鼻腔喷雾或栓剂来实现。就经皮给药而言, 所述的活性化合物被配制成本领域通常已知的油膏、软膏、凝胶剂、霜剂。

[0202] 该化合物还可以配制成栓剂 (例如, 用常规的栓剂基质如可可油以及其他甘油酯) 或用于直肠给药的滞留灌肠剂。

[0203] 一个实施方案中, 活性化合物用能够保护该化合物不被机体迅速排除的载体来配制, 例如一种缓释制剂, 包括输注及微胶囊释放系统。可以使用可生物降解、生物相容性聚合物, 如乙烯乙酸乙烯酯, 聚酐, 聚乙醇酸 (polyglycolic acid), 胶原, 聚原酸酯 (polyorthoester) 和聚乳酸。用于制备这类制剂的方法对于本领域技术人员而言是显而易见的。所用材料还可以从 Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. 购得。脂质体悬液 (包括用抗病毒抗原的单克隆抗体靶向感染细胞的脂质体) 也可以用作药物学上可接受的载体。这些制剂可以按照本领域技术人员已知的方法来配制, 例如美国专利 US 4, 522, 811 中所述的方法。

[0204] 按剂量单位的形式配制成口服或非肠道用组合物因易于给药并能保证剂量的均一性而特别有益。本发明中使用的剂量单位是指合适用作被治疗患者单次剂量的物理分割单位; 每一单位中包含预先计算出能与所需药物载体共同作用产生预期治疗效果的量的活性化合物。本发明所述的剂量单位形式的规定受制于或直接取决于活性化合物的独特的特性以及要达到的具体疗效。

[0205] 本发明所述的核酸分子可以被插入载体并被用作基因治疗载体。基因治疗载体可以通过多种途径中的任一种递送给患者, 例如, 静脉注射、局部给药 (见美国专利

No. 5, 328, 470) 或定向注射 (stereotactic injection) (参见, 例如, Chen et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 91 :3054-3057)。所述基因载体的药物制剂可以包括可接受的稀释液中的基因治疗载体, 或者可以含有一缓释基质, 基因递送载体埋于其中。替代地, 所述的完整基因递送载体可以由重组细胞完整地制备而成, 例如逆转录病毒载体, 所述药物制剂可以包括一种或多种能产生基因递送系统的细胞。

[0206] 可将药物组合物与使用说明书一起装入容器、包装或配送器中。

[0207] 本发明的用途和方法

[0208] 本发明所述的核酸分子、蛋白质、蛋白同系物及抗体可以用于下列的一种或多种方法: (a) 筛选试验; (b) 检测试验 (例如, 染色体作图、组织分型、法律生物学), (c) 预测医学 (例如, 诊断试验, 预测试验, 监测性临床试验以及药物基因组学); 以及 (d) 治疗方法 (例如, 治疗和预防方法)。如本发明所述, 在一个实施方案中, 本发明所述的 BAFF-R 蛋白能与 BAFF 结合。

[0209] 本发明所述的分离的核酸分子可以用于表达 BAFF-R 蛋白 (例如, 通过基因治疗应用中宿主细胞内的重组表达载体), 用于检测 BAFF-R mRNA (例如, 生物样品中) 或 BAFF-R 基因中的基因损伤, 以及用于调控 BAFF 和 / 或 BAFF-R 活性, 见本发明下文所述。此外, BAFF-R 蛋白还可用于筛选能调控 BAFF-R 活性或表达的药物或化合物以及用于治疗以 BAFF 和 / 或 BAFF-R 蛋白生成不足或过量为特征的病症, 或相对于野生型 BAFF-R 蛋白其活性减弱或异常的 BAFF-R 蛋白形式的生成为特征的病症。此外, 本发明所述的抗 -BAFF-R 抗体可用于检测及分离 BAFF-R 蛋白以及调节 BAFF 和 / 或 BAFF-R 活性。

[0210] 本发明进一步还提供了通过上述筛选试验鉴定出的新型药物及其用在本发明所述治疗中的用途。

[0211] 筛选试验

[0212] 本发明提供了一种用于鉴定调控剂的方法 (本发明又称筛选试验), 所述调控剂即能结合 BAFF-R 蛋白或对例如 BAFF-R 表达或 BAFF-R 活性具有刺激或抑制功效的候选或待测化合物或试剂 (例如, 肽、肽模拟物, 小分子或其他药物)。

[0213] 一个实施方案中, 本发明提供了用于筛选能够结合 BAFF-R 蛋白或多肽或其生物活性部分或调控 BAFF-R 蛋白或多肽或其生物活性部分活性的候选物或待测化合物的试验。本发明所述的待测化合物可以使用本领域已知的大量组合文库方法 (combinatorial library method) 中任一种制得, 所述组合文库方法包括: 生物文库; 空间可定位的平行固相或液相文库 (spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries); 需去旋 (deconvolution) 的合成文库法; "一微粒一化合物" 文库方法; 以及使用亲和层析选择的合成文库法。上述生物文库方法仅限于肽文库, 而其他四种方法可用于肽、非-肽寡聚体或小分子化合物文库 (Lam(1997) Anticancer DrugDes. 12 : 145-167)。

[0214] 用于合成分子文库的方法的实例可见于现有技术中, 例如见: DeWitt et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :6909-6013; Erb et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 :11422-11426; Zuckermann et al. (1994) J. Med. Chem. 37 :2678-2685; Cho et al. (1993) Science 261 :1303; Carrell et al. (1994) Angew Chem. Int. Ed. Engl. 33 :2059; Carrell et al. (1994) Angew Chem. Int. Ed. Engl. 33 :2061; 以及 Gallop et al. (1994)

J. Med. Chem. 37 :1233-1251.

[0215] 化合物文库可以以如下形式呈现:溶液中(例如, Houghten(1992) *Biotechniques* 13:412-421), 或微粒上(Lam(1991) *Nature* 354:82-84), 芯片上(Fodor(1993) *Nature* 364:555-556), 细菌(Ladner 美国专利 5, 223, 409), 孢子(Ladner U. S. Patent 5, 223, 409), 质粒(Cull et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869) 或噬菌体上(Scott 和 Smith(1990) *Science* 249:386-390; Devlin(1990) *Science* 249:404-406; Cwirla et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-6382; Felici(1991) *J. MOL Biol.* 222:301-310; Ladner U. S. Patent 5, 223, 409)。

[0216] 一个实施方案中, 试验是以细胞为基础的试验, 其中细胞表面上表达有膜结合型 BAFF-R 蛋白或其生物活性部分, 让该细胞与待测化合物接触, 测定待测化合物与 BAFF-R 蛋白间的结合能力。所述细胞, 例如, 可源自哺乳动物或为酵母细胞。待测化合物结合 BAFF-R 蛋白能力的测定可以通过, 例如, 将待测化合物与放射性同位素或酶标记物偶联从而使得待测化合物与 BAFF-R 蛋白或其生物活性部分的结合的测定可以通过检测复合物中的被标记化合物来实现。例如, 待测化合物可以用 ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C 或 ^3H 直接或间接标记, 通过放射量 (radioemission) 直接计量或者通过闪烁计量检测放射性同位素。替代地, 待测化合物可以用酶标记, 例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或荧光素酶, 通过测定合适底物转化成产物的情况来检测酶标记物。一个实施方案中, 所述试验包括让细胞表面上表达有膜结合型 BAFF-R 蛋白或其生物活性部分的细胞与能结合 BAFF-R 的已知化合物接触形成试验混合物, 让试验混合物与待测化合物接触, 测定待测化合物与 BAFF-R 蛋白间相互作用的能力, 其中所述的测定待测化合物与 BAFF-R 蛋白间相互作用的能力包括测定待测化合物相对于已知化合物优先结合 BAFF-R 或其生物活性部分的能力。

[0217] 另一实施方案中, 试验是以细胞为基础的试验, 其中包括让表面上表达有膜结合型 BAFF-R 蛋白或其生物活性部分的细胞与待测化合物接触, 测定待测化合物调节(例如, 刺激或抑制) BAFF-R 蛋白或其生物活性部分活性的能力。对待测化合物调节 BAFF-R 蛋白或其生物活性部分活性的能力的测定可以通过, 例如, 测定 BAFF-R 蛋白与 BAFF-R 目标分子结合或相互作用的能力来实现。本发明中的“目标分子”是指 BAFF-R 蛋白能够与其实质性结合或相互作用的分子, 例如, 表达 BAFF-R 蛋白的细胞表面的分子, 第二种细胞 (second cell) 表面上的分子, 胞内环境中的分子, 细胞膜内表面相连的分子或者胞质分子 (cytoplasmic molecule)。BAFF-R 目标分子可以是非 BAFF-R 分子或者是本发明所述的 BAFF-R 蛋白或多肽。一个实施方案中, BAFF-R 目标分子是信号传导途径的一个组分, 该组分可有助于胞外信号(例如, 因化合物与膜结合型 BAFF-R 分子结合而产生的信号) 通过细胞膜并进入胞内传导。该目标分子可以是, 例如, 一种具有催化活性的第二种胞内蛋白 (second intracellular protein), 或者是一种能够促进下游信号分子与 BAFF-R 结合的蛋白。

[0218] 对 BAFF-R 蛋白与 BAFF-R 目标分子间结合或相互作用能力的测定可以通过上述用于测定直接结合的方法中的一种来完成。一个实施方案中, 对 BAFF-R 蛋白与 BAFF-R 目标分子间结合或相互作用能力的测定可以通过测定目标分子的活性来实现。例如, 目标分子的活性可以通过下列方法来测定: 对细胞的第二信使靶(即, 胞内 Ca^{2+} , 甘油二酯, IP3, 等) 的诱导进行检测, 对该靶对于合适底物的催化/酶活性进行检测, 对报告基因(含有一个可

操作地连接于编码可检测标记物的核酸分子上的 BAFF-R 应答调控元件,例如,萤光素酶)的诱导进行检测,或者对细胞应答反应,例如,细胞存活、细胞分化或细胞增生,进行检测。

[0219] 在另一个实施方案中,本发明的试验是一个无细胞试验,其中包括让 BAFF-R 蛋白或其生物活性部分与待测化合物接触,测定该待测化合物结合 BAFF-R 蛋白或其生物活性部分的能力。待测化合物与 BAFF-R 蛋白的结合可以通过上述方法直接或间接测定。一个实施方案中,所述试验包括让 BAFF-R 蛋白或其生物活性部分与一已知能结合 BAFF-R 的化合物接触形成试验混合物,让该试验混合物与待测化合物接触,测定待测化合物与 BAFF-R 蛋白间相互作用的能力,其中所述的测定待测化合物与 BAFF-R 蛋白间相互作用的能力包括测定待测化合物相对于已知化合物优先结合 BAFF-R 或其生物活性部分的能力。

[0220] 在另一个实施方案中,本发明的试验是一个无细胞试验,其中包括让 BAFF-R 蛋白或其生物活性部分与待测化合物接触,测定待测化合物调节(例如,刺激或抑制)BAFF-R 蛋白或其生物活性部分活性的能力。对待测化合物调节 BAFF-R 蛋白或其生物活性部分活性的能力的测定可以例如用上述一种用于测定直接结合的方法通过测定 BAFF-R 蛋白结合 BAFF-R 目标分子的能力来实现。在另一个替代方案中,对待测化合物调节 BAFF-R 活性的能力的测定可以通过测定 BAFF-R 蛋白进一步调节 BAFF-R 目标分子的能力来实现。例如,如上所述,测定目标分子对合适底物的催化/酶促活性。

[0221] 另一个实施方案中,所述的无细胞试验包括让 BAFF-R 蛋白或其生物活性部分与一已知能结合 BAFF-R 的化合物接触形成试验混合物,让该试验混合物与待测化合物接触,测定待测化合物与 BAFF-R 蛋白间相互作用的能力,其中所述的测定待测化合物与 BAFF-R 蛋白间相互作用的能力包括测定待测化合物优先结合 BAFF-R 目标分子或优先调节其活性的能力。

[0222] 在本发明所述的无细胞试验中 BAFF-R 的可溶性或膜结合两种形式均可使用。就包括膜结合型 BAFF-R 的无细胞试验而言,需要使用一种溶解剂(solubilizing agent)以使膜结合型 BAFF-R 能停留在溶液中。所述溶解剂的实例包括非离子性去污剂如 n-辛基葡糖苷, n-十二烷基葡糖苷, n-十二烷基麦芽糖苷, 辛酰-N-甲基葡糖酰胺, 十二酰-N-甲基葡糖酰胺, Tritone[®]X-100, Triton[®]X-114, Thesit[®], Isotridecypoly(乙烯乙二醇酯)_n, 3-(3-胆酰胺丙基)二乙铵-1-丙磺酸(CHAPS), 3-(3-胆酰胺丙基)二乙铵-2-羟基-1-丙磺酸(CHAPSO), 或 N-十二烷基-N,N-二甲基-3-铵基-1-丙磺酸。

[0223] 在本发明上述试验方法的不止一个的实施方案中,都需要将 BAFF-R 或其目标分子固定,从而使得复合形式的蛋白质能与两种蛋白中的一种或二者的非复合形式分离开来,并能适应该试验的自动化。待测化合物与 BAFF-R 的结合,或者有无候选化合物存在情况下 BAFF-R 与目标分子的相互作用,都可以在任一适于容纳该反应物的器皿中进行。所述器皿的实例包括微量滴定板、试管以及微量离心管。在一个实施方案中,提供了一种融合蛋白,该融合蛋白上添加了一能使两蛋白中的一种或二者均能结合于基质上的结构域。例如,可将 GST-BAFF-R 融合蛋白或 GST-目标融合蛋白吸附于谷胱甘肽琼脂糖凝胶微粒(Sigma Chemical, St. Louis, MO)或者谷胱甘肽衍生的微量滴定板上,然后让其与待测化合物或者待测化合物与非吸附的目标蛋白或 BAFF-R 蛋白结合,在有助于复合物形成的条件下(例如,生理盐浓度和 pH)孵育上述混合物。孵育后,洗涤微粒或微量滴定板的孔以去除任一未结合的成分,使用微粒时被固定的基质,对复合物进行直接或间接测定,例如用上述

方法进行测定。替代地,可将上述复合物从基质上解离下来,用常规技术测定 BAFF-R 的结合或活性水平。

[0224] 用于将蛋白固定在基质上的其他技术也可以用于本发明所述的筛选试验。例如,可以利用生物素与链霉亲和素的结合来固定 BAFF-R 或其目标分子。用本领域熟知的技术(例如,生物素化试剂盒, Pierce Chemicals, Rockford, III.) 由生物素-NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)制备生物素化的 BAFF-R 或目标分子,将其固定于链霉亲和素包被的 96 孔板(Pierce Chemical)上。替代地,可以使用能与 BAFF-R 或目标分子反应但不干扰 BAFF-R 蛋白与其目标分子结合的抗体来处理滴定板的孔,通过抗体偶联将未结合的目标蛋白或 BAFF-R 俘获在孔中。除上述用于 GST-固定复合物的方法外,检测所述复合物的方法还包括用能与 BAFF-R 或目标分子反应的抗体以及依赖于检测与 BAFF-R 或目标分子连接的酶的活性的酶联试验对复合物进行免疫检测。

[0225] 另一实施方案中,可在如下方法中鉴定 BAFF-R 表达的调节物:让细胞与候选化合物接触,测定细胞中 BAFF-R mRNA 或蛋白的表达。将候选化合物存在下 BAFF-R mRNA 或蛋白的表达水平与无候选化合物存在时 BAFF-R mRNA 或蛋白的表达的水平进行比较。然后根据该对比结果就可将该候选化合物鉴定为 BAFF-R 表达的调节物。例如,当在有候选化合物存在时 BAFF-R mRNA 或蛋白的表达水平高于(统计学上显著高于)无候选化合物存在时,就可将该候选化合物认定为 BAFF-R mRNA 或蛋白表达的激动剂。相反,当在有候选化合物存在时 BAFF-R mRNA 或蛋白的表达水平低于(统计学上显著低于)无候选化合物存在时,就可将该候选化合物认定为 BAFF-R mRNA 或蛋白表达的抑制剂。细胞内 BAFF-R mRNA 或蛋白的表达水平可以使用本发明所述用于检测 BAFF-R mRNA 或蛋白的方法来测定。

[0226] 本发明的另一方面, BAFF-R 蛋白可用作双杂交试验或三杂交试验中的“诱饵(bait)蛋白”(参见,例如,美国专利 5,283,317;Zervos et al. (1993)Cell 72:223-232;Madura et al. (1993)J. Biol. Chem. 268:12046-12054;Bartel et al. (1993)Biotechniques 14:920-924;Iwabuchi et al. (1993)Oncogene 8:1693-1696;和 Brent WO 94/10300),以鉴定能与 BAFF-R 结合或相互作用的其他蛋白(“BAFF-R-结合蛋白”或“BAFF-R-bp”)以及能调节 BAFF-R 活性的其他蛋白。所述 BAFF-R-结合蛋白还可能参与以 BAFF-R 蛋白例如作为 BAFF-R 途径的上游或下游元件的信号传播。

[0227] 双杂交系统是基于多个转录因子的调节特性建立的,所述转录因子由可分离的 DNA-结合及活化结构域组成。简而言之,该试验使用两种不同的 DNA 构建体。一个构建体中,编码 BAFF-R 的基因被融合到编码一已知转录因子(例如,GAL-4)的 DNA 结合结构域的基因上。另一个构建体中,将来自 DNA 序列文库编码未鉴定蛋白(“猎物”或“样品”)的 DNA 序列融合到编码上述已知转录因子活化结构域的基因上。如果,所述“诱饵”及所述“猎物”蛋白能在体内相互作用形成 BAFF-R-依赖性复合物,那么就可使所述转录因子的 DNA-结合结构域与活化结构域十分靠近,这种靠近使得报告基因(例如,LacZ)能够转录,该报告基因可操作地连接于响应该转录因子的转录调控位点。可对所述报告基因的表达进行检测,并且分离含有功能转录因子的细胞克隆,用其来获得编码可与 BAFF-R 相互作用的蛋白的克隆的基因。

[0228] 本发明进一步还提供了用上述筛选试验鉴定到的新的物质,及其用于本发明所述治疗的用途。

[0229] 检测试验

[0230] 本发明中鉴定出的 cDNA 序列的部分或片段（以及相应的全长基因序列）可作为多聚核苷酸反应物用于多种用途。例如，这些序列可用于：(i) 将其各自基因在染色体上作图；从而将与遗传性疾病相关的基因区域定位；(ii) 从微小的生物样本鉴定出个体（确定组织型别 (tissue typing)）；以及 (iii) 辅助生物样本的法医学鉴定。这些用途的描述见下列章节。

[0231] 染色体作图

[0232] 基因的序列（或该序列的一部分）一旦被分离，那么就可以用该序列绘出该基因在染色体上的位置图。这种方法称为染色体作图。因此，本发明所述的 BAFF-R 序列的片段或部分，可以用来绘出 BAFF-R 基因在染色体上各自的位置。BAFF-R 序列的染色体作图是在这些序列和与疾病相关基因间建立相关关系的重要的第一步。

[0233] 简单地说，可通过从 BAFF-R 序列制备 PCR 引物（优选长度为 15-25bp）将 BAFF-R 基因图示于染色体。电脑分析 BAFF-R 序列可用于快速筛选出跨度不超过基因组 DNA 中 1 个外显子的引物，因而使扩增过程复制化。然后将这些引物用于含特定物种个体染色体的体细胞杂合体的 PCR 筛选。只有那些其中含有相应于 BAFF-R 序列的种 - 特异性基因的杂合体才能产生扩增的片段。

[0234] 体细胞杂合体的 PCR 作图是一种将特定序列排布在特定染色体上的快速方法。用单个热循环仪每天可排布 3 个或多个序列。用 BAFF-R 序列设计寡核苷酸引物时，用来自特定染色体的多组片段可实现亚定位。

[0235] DNA 序列与中期染色体展布 (metaphase chromosomal spread) 的荧光原位杂交 (FISH) 还可以进一步用于在一步之内完成准确的染色体定位。可以用这样的细胞制备染色体展布，即该细胞的分裂已被能够破坏有丝分裂纺锤体的化学制剂如秋水仙酰胺在中期阻断。可用胰蛋白酶简单地处理染色体，然后用吉姆萨染色。每一染色体上都出现明暗条带的模式，因而染色体能够被单个鉴定。FISH 技术可使用短至 500 或 600 个碱基的 DNA 序列。但是，大于 1000 个碱基的克隆与独特的染色体座位结合的可能性更大，信号强度足以满足简单检测。优选 1,000 个碱基，更优选 2,000 个碱基，能够在一段合理时间得到好的结果。该技术的综述见, Verma et al. HUMAN CHROMOSOMES : A MANUAL OF BASIC TECHNIQUES, Pergamon Press, N. Y., 1988。

[0236] 用于染色体作图的反应物可单独用于标记单个染色体或该染色体上的单个位点，或者用多组的反应物标记多个位点和 / 或多个染色体。实际上，优选对应于基因非编码区的反应物进行作图。编码序列在基因家族中保守的可能性较大，因此提高了染色体作图过程中交叉杂交的机会。

[0237] 序列一旦被绘图至到一确切的染色体座位，那么就可在该序列在染色体上的物理位置与基因图谱数据之间建立相关关系。这类数据可见于，例如，McKusick, MENDELIAN INHERITANCE IN MAN, 可从 Johns Hopkins University Welch Medical Library 在线获得）。然后通过连锁分析（自然邻接基因的共遗传）在绘图至同一染色体区域的基因和疾病间建立联系，描述见，例如，Egeland et al. (1987) Nature, 325 : 783-787。

[0238] 此外，可对受 BAFF-R 基因相关疾病影响的个体与未受影响的个体之间在 DNA 序列上的差异进行测定。如果部分或全部受影响个体中出现了突变，而非受影响个体无一出现，

那么该突变就可能是特定疾病的致病因子。受影响个体与未受影响个体间的比较通常涉及：首先寻找染色体中的结构的改变，如缺失或转位，这些改变可从染色体展布中观察到或者可用以该 DNA 序列为基础的 PCR 来检测。最后，对来自数个个体的基因完整测序以确定突变的存在并从多态性中辨别出突变。

[0239] 确定组织型别

[0240] 本发明所述的 BAFF-R 序列还可用于从微小的生物样本鉴定个体。该技术中，用 1 种或多种限制性酶消化个体的基因组 DNA，并在 Southern 印迹进行探针检测产生用于鉴定的独特性条带。本发明的序列可作为附加 DNA 标记物用于 RFLP（“限制性片段长度多态性，”描述见美国专利 5,272,057）。

[0241] 另外，本发明的序列可以用于提供一种替代性的技术，该技术能够对个体基因组中所选部分的 DNA 序列进行真正的逐个碱基的测序。因此，可用本发明所述的 BAFF-R 序列从该序列的 5' 和 3' 端制备出两个 PCR 引物。然后可用这些引物扩增个体的 DNA，然后测定其序列。

[0242] 由于每一个体因等位差异都具有一套独特的所述 DNA 序列，所以用这种方式从个体制备的多组相应的 DNA 序列，可为个体提供独一无二的鉴别。本发明的序列可用于从个体和从组织获得所述鉴定序列。本发明的 BAFF-R 序列独一无二地代表人基因组的部分。等位突变一定程度上出现于编码区域，更大程度上出现于非编码区域。据估计人个体之间等位突变出现的频率为每 500 个碱基中约 1 个碱基。等位突变多数归因于单个核苷酸多态性 (SNPs)，其中包括限制性片段长度多态性 (RFLPs)。

[0243] 本发明所述的每一序列一定程度上都可以作为标准，用于与来自个体的 DNA 进行比较鉴定。由于较多的多态性出现在非编码区，所以区分个体只需要较少的这种序列。图 1A (SEQ ID NO :1)，图 1B (SEQ ID NO :2)，图 2A (SEQ ID NO :3)，图 2B (SEQ ID NO :4)，图 3 (SEQ ID NO :6) 中的非编码区 可以很容易地提供阳性个体鉴定，所用的是大约 10 ~ 1,000 个引物的一组引物，每一引物都能得到长为 100 个碱基的非编码扩增序列。如果使用的是编码序列，如图 1A (SEQ ID NO :1)，图 1B (SEQ ID NO :2)，图 2A (SEQ ID NO :3)，图 2B (SEQ ID NO :4)，图 3 (SEQ ID NO :6) 中的编码序列，提供阳性个体鉴定的较合适的引物数目为 500-2,000 个。

[0244] 预测医学

[0245] 本发明还涉及可预测医学领域，其中诊断试验、预测试验、药物基因组学以及临床监测试验都用于预测（预见）目的，从而达到预防性地治疗个体。因此，本发明的一个方面涉及诊断试验，用于测定生物样本（例如，血液、血清、细胞、组织）中 BAFF-R 蛋白和 / 或核酸表达以及 BAFF-R 活性，从而确定个体是否在患与 BAFF-R 表达异常或活性异常相关疾病或病症或者是否有患这类疾病的危险。本发明还提供了诊断（预见）试验，用来测定个体是否有患与 BAFF-R 蛋白、核酸表达或活性相关的病症的危险。例如，可测定生物样本中 BAFF-R 基因的突变。这类测定试验可用于预测或预见目的，从而可在以 BAFF-R 蛋白、核酸表达或活性为特征或与其相关的疾病发生之前对个体进行预防性治疗。

[0246] 本发明另一方面提供了用于测定个体中 BAFF-R 蛋白、核酸表达或 BAFF-R 活性的方法，从而为该个体选择合适的治疗或预防物质（本发明中称为“药物基因组学”）。药物基因组学可以根据个体的基因型来为个体的治疗或预防选择物质（例如，药物）（例如，测

定个体的基因型以确定个体应答具体物质的能力)。

[0247] 本发明另一方面涉及在临床试验中监测物质(例如,药物,化合物)对 BAFF-R 表达或活性的影响。

[0248] 这些物质和其他物质在下列部分进一步详述。

[0249] 诊断试验

[0250] 用于检测生物样本中是否有 BAFF-R 存在的一个范例性的方法包括:从受试者获得生物样本,让该生物样本与能够检测 BAFF-R 蛋白或编码 BAFF-R 蛋白的核酸(例如, mRNA, 基因组 DNA) 的化合物或试剂接触,从而检测生物样本中是否有 BAFF-R 存在。用于检测 BAFF-R mRNA 或基因组 DNA 的试剂可以是能与 BAFF-R mRNA 或基因组 DNA 杂交的标记核酸探针。所述核酸探针可以是,例如全长 BAFF-R 核酸,例如图 1A(SEQ ID NO: 1),图 1B(SEQ ID NO: 2),图 2A(SEQ ID NO: 3),图 2B(SEQ ID NO: 4),图 3(SEQ ID NO: 6) 所示的任一核酸或其部分,如长至少 15, 30, 50, 100, 250 或 500 个核苷酸的寡核苷酸,并且该寡核苷酸足以能在严谨条件下与 BAFF-R mRNA 或基因组 DNA 杂交。本发明还描述了其他可用于诊断试验的合适探针。

[0251] 用于检测 BAFF-R 蛋白的试剂是能结合 BAFF-R 蛋白的抗体,优选带有可检测标记的抗体。抗体可为多克隆抗体,或者更优选为单克隆抗体。完整抗体或其片段(例如, Fab 或 F(ab')₂) 都可使用。术语“标记”就探针或抗体而言包括,通过将可检测物质连接(即,物理连接)到探针或抗体而对探针或抗体进行的直接标记,以及通过与另一被直接标记了的反应物进行反应而对探针或抗体进行的间接标记。间接标记的实例包括用荧光标记第二抗体对第一抗体进行检测以及用生物素末端标记 DNA 探针再用荧光标记的链霉亲和素对其进行检测。“生物样本”包括从受试者分离而来的组织、细胞和生物体液,以及存在于受试者体内的组织、细胞和体液。也就是说,本发明的检测方法可用于体内或体外检测生物样本中的 BAFF-R mRNA,蛋白或基因组 DNA。例如,体外检测 BAFF-R mRNA 的技术包括 Northern 杂交和原位杂交。体外检测 BAFF-R 蛋白的技术包括酶联免疫吸附试验(ELISAs), Western 印迹,免疫沉淀和免疫荧光。体外检测 BAFF-R 基因组 DNA 的技术包括 Southern 杂交。另外,体内检测 BAFF-R 蛋白的技术包括将一标记后的抗-BAFF-R 抗体导入受试者。例如,用放射性标记物标记抗体,该标记物在受试者体内的存在和定位可通过标准成像技术来检测。

[0252] 一个实施方案中,所述生物样本包括来自受试者的蛋白分子。替代地,所述生物样本可包含来自受试者的 mRNA 分子或基因组 DNA 分子。优选的生物样本为用常规方法从受试者分离到的外周血淋巴细胞。

[0253] 另一实施方案中,所述方法进一步还包括:从对照受试者获得对照用生物样本,让对照生物样本与能够检测 BAFF-R 蛋白、mRNA 或基因组 DNA 的化合物或试剂接触,从而检测生物样本中是否有 BAFF-R 蛋白、mRNA 或基因组 DNA 存在,将对照样本中 BAFF-R 蛋白、mRNA 或基因组 DNA 的存在情况与待测样本中 BAFF-R 蛋白、mRNA 或基因组 DNA 的存在情况进行比较。

[0254] 本发明还包括用于检测生物样本中 BAFF-R 存在的试剂盒。例如,该试剂盒可包含:可用于检测生物样本中 BAFF-R 蛋白或 mRNA 的标记化合物或试剂;用于检测样本中 BAFF-R 含量的方法;以及用于将样本中 BAFF-R 含量与标准进行比较的方法。所述化合物或试剂可包装于合适的容器中。所述试剂盒还可进一步包括说明书,该说明书教导如何用

该试剂盒检测 BAFF-R 蛋白或核酸。

[0255] 预后分析

[0256] 本发明的诊断方法还可用于鉴定受试者是否患有与异常 BAFF-R 表达或活性相关的疾病或病症或者有无患该病的危险。例如本发明所述试验,如前面的诊断试验或下列试验,都可以用于鉴定受试者是否患有与 BAFF-R 蛋白、核酸表达或活性相关的病症或者有无患该病的危险,所述病症例如,自身免疫疾病,如自身免疫溶血性贫血和系统性红斑狼疮。替代地,预后分析也可用于鉴定受试者是否患有疾病或病症或者有无患病危险。因此,本发明提供了一种用于鉴定与异常 BAFF-R 表达或活性相关的疾病或病症的方法,其中测试样本获自受试者,并检测其中的 BAFF-R 蛋白或核酸(例如, mRNA, 基因组 DNA),其中有无 BAFF-R 蛋白或核酸存在是判断受试者是否患有与异常 BAFF-R 表达或活性相关的疾病或者有无患该病危险的诊断依据。本发明中“测试样本”是指从目的受试者中获取的生物样本。例如测试样本可以为生物体液(例如,血清),细胞样本或组织。

[0257] 此外,本发明所述预后分析可用于测定受试者是否可被给药试剂(例如,激动剂、拮抗剂、肽模拟物、蛋白质、肽、核酸、小分子或其他药物候选物)以治疗与异常 BAFF-R 表达或活性相关的疾病或病症。例如,该方法可用于测定受试者的病症用试剂治疗。因此,本发明提供了用于测定受试者与异常 BAFF-R 表达或活性相关的病症用试剂是否能得到有效治疗的方法,该方法包括获得测试样本并检测其中的 BAFF-R 蛋白或核酸(例如,其中有无 BAFF-R 蛋白或核酸存在是判断受试者能否被给药该试剂来治疗与异常 BAFF-R 表达或活性相关的病症的诊断依据)。

[0258] 本发明的方法还用于检测 BAFF-R 基因中的基因损伤 (genetic lesion),从而判定带有损伤基因的受试者是否有患致瘤性疾病或自身免疫疾病的危险,或者正患该病。不同实施方案中,所述方法包括检测来自受试者的细胞样本中是否有基因损伤存在,该损伤的特征在于至少有 1 处改变影响 BAFF-R 蛋白编码基因的完整性,或者使 BAFF-R 基因错误表达。例如,所述基因损伤可通过确定至少一种下列情况存在来检测:(1) 从 BAFF-R 基因中缺失 1 个或多个核苷酸;(2) 向 BAFF-R 基因添加 1 个或多个核苷酸;(3) BAFF-R 基因中的 1 个或多个核苷酸被取代;(4) BAFF-R 基因的染色体重排;(5) BAFF-R 基因在信使 RNA 转录本水平发生了变化;(6) BAFF-R 基因的异常修饰,如基因组 DNA 的甲基化模式;(7) BAFF-R 基因存在有信使 RNA 转录本的非野生型剪接模式;(8) 非野生型水平的 BAFF-R-蛋白,(9) BAFF-R 基因的等位缺失,以及 (10) BAFF-R-蛋白的翻译后的非适当修饰。如本发明所述,本领域中有大量已知试验技术可用于检测 BAFF-R 基因中的损伤。优选的生物样本是用常规技术从受试者分离到的外周血淋巴细胞样本。但是,任何一种含有核细胞的生物样本都可使用,包括,例如,口腔粘膜细胞。

[0259] 某些实施方案中,所述损伤的检测涉及在聚合酶链反应 (PCR) 中使用探针/引物(见,例如,美国专利 4,683,195 和 4,683,202),所述 PCR 如锚定 PCR 或 RACE PCR,或者,替代地,连接酶链反应 (LCR)(见,例如,Landegranet al. (1988) Science 241:1077-1080;和 Nakazawa et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:360-364),其中后者可具体用于检测 BAFF-R-基因中的点突变(见 Abrahava et al. (1995) Nucl. Acids Res. 23:675-682)。该方法包括下列步骤:收集患者的细胞样本;从样本的细胞中分离核酸(例如,基因组核酸, mRNA 或者二者均有),使该核酸样本与一个或多个引物接触;这些引物能够在使 BAFF-R 基

因（如果存在）能发生杂交或扩增的条件下与 BAFF-R 基因杂交；检测有无扩增产物存在，或者检测扩增产物的大小并与对照样本比较长度。可以想到的是，可期望 PCR 和 / 或 LCR 用做与检测本发明所述突变的任一技术联用时的一预先扩增步骤。

[0260] 可替代地扩增方法包括：自我维持序列复制 (self sustained sepuencereplication) (Guatelli et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 : 1874-1878), 转录扩增系统 (Kwoh, et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 1173-1177), Q- β 复制酶 (Replicase) 反应 (Lizardi et al. (1988) BioTechnology 6 : 1197) 或任一其他核酸扩增方法, 然后用本领域技术人员已知的方法检测扩增到的分子。如果核酸分子存在的数目极少, 那么这些检测方案特别适用于这样的核酸分子的检测。

[0261] 替代的实施方案中, 来自样本细胞的 BAFF-R 基因中的突变可以通过 限制性酶切割模式的变化来鉴定。例如, 分离样本 DNA 和对照 DNA, 扩增 (可任选), 用一种或多种限制性内切酶消化, 通过凝胶电泳测定片段长度并加以比较。样本 DNA 和对照 DNA 间片段大小的差异表明样本 DNA 中存在突变。另外, 可使用序列特异性核酶 (参见, 例如, 美国专利 5, 493, 531) 通过核酶切割位点的产生或缺失来判定特异性突变的存在。

[0262] 另一实施方案中, 通过使样本核酸和对照核酸, 例如 DNA 或 RNA, 与含成百或成千个寡核苷酸探针的高密度阵列杂交, 检测 BAFF-R 中的基因突变 (Cronin et al. (1996) Human Mutation 7 : 244-255; Kozal et al. (1996) Nature Med. 2 : 753-759)。例如, BAFF-R 中的基因突变可用含发光的 DNA 探针的二维阵列来检测, 对此的描述见 Cronin et al. (1996) Human Mutation 7 : 244-255。简而言之, 用第一杂交阵列的探针对样本和对照中的 DNA 长段序列进行筛选, 通过制备连续重叠探针的线性阵列鉴定序列间的碱基变化。该步骤可用来检测点突变。该步骤后接着用第二杂交阵列, 通过使用较小的互补于所有所检测的变体或突变的特异性探针阵列显示特异性突变的特征。每一突变阵列由多组平行的探针组成, 每组探针中的一个探针与野生型基因互补, 另一个与突变基因互补。

[0263] 另一实施方案中, 本领域已知的多种测序反应中的任一种都可用于直接测序 BAFF-R 基因, 并通过将样本 BAFF-R 序列与相应的野生型 (对照) 序列比较来检测突变。测序反应的实例包括以下列文献中技术为基础的测序反应 : Maxim 和 Gilbert (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 : 560 或 Sanger (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 : 5463。还可以预见的是当实施诊断性试验时, 多种自动测序方法中的任一种都可使用 (Naeve et al. (1995) Biotechniques 19 : 448), 包括质谱法测序 (见, 例如, PCT 国际公开号为 WO 94/16101 的专利申请 ; Cohen et al. (1996) Adv. Chromatogr. 36 : 127-162 ; 和 Griffin et al. (1993) Appl. Biochem. Biotechnol. 38 : 147-159)。

[0264] 其他用于检测 BAFF-R 基因中突变的方法包括用能否免受切割试剂切割的方法来检测 RNA/RNA 或 RNA/DNA 异源双链中的错配碱基 (Myers et al. (1985) Science 230 : 1242)。通常, 本领域“错配切割”技术首先需要使含野生型 BAFF-R 序列的 (标记的) RNA 或 DNA 与获自组织样本的可能突变的 RNA 或 DNA 杂交形成异源双链。用试剂处理得到的双链双螺旋, 该试剂能够切割双螺旋中的单链区, 如由于对照和样本链间的碱基对错配而存在的单链区。例如, RNA/DNA 双螺旋可用 RNase 处理, DNA/DNA 杂合体可用 S1 核酸酶处理, 以酶促消化错配区。其他实施方案中, DNA/DNA 或 RNA/DNA 双螺旋二者都可用羟胺或四氧化钨以及用哌啶处理以消化错配区。错配区被消化后, 用变性聚丙烯酰胺凝胶将上述得到的材料

根据大小分离开来从而测定出突变的位点。参见,例如, Cotton et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 :4397 ;Saleeba et al (1992) *Methods Enzymol.* 217 :286-295。一个实施方案中,可标记对照 DNA 或 RNA 用于检测。

[0265] 另一个实施方案中,所述错配切割反应可在特定系统中使用一种或多种能识别双链 DNA 中错配碱基对的蛋白(故称为“DNA 错配修复”酶)来检测获自细胞样本的 BAFF-R cDNAs 中的点突变并作图。例如,大肠杆菌的 mutY 酶能切割 G/A 错配中的 A,来自 HeLa 细胞的胸苷 DNA 糖基化酶可切割 G/T 错配中的 T(Hsu et al. (1994) *Carcinogenesis* 15 :1657-1662)。根据范例性实施方案,使基于 BAFF-R 序列,例如野生型 BAFF-R 序列的探针与来自待测细胞的 cDNA 或其他 DNA 产物杂交。用 DNA 错配修复酶处理得到的双螺旋,如果有切割产物的话,该产物可用电泳或类似的方法来检测。参见,例如,美国专利 5,459,039。

[0266] 其他实施方案中,用电泳迁移率的变化来检测 BAFF-R 基因中的突变。例如,可用单链构象多态性(SSCP)来检测突变体和野生型核酸间电泳迁移率的差异(Orita et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 :2766, 还参见 Cotton(1993) *Mutat. Res.* 285 :125-144 ;Hayashi (1992) *Genet. Anal. Tech. Appl.* 9 :73-79)。把样本和对照 BAFF-R 核酸的单链 DNA 片段变性,并使其复性。单链核酸的二级结构因序列不同而不同,电泳迁移率出现的变化使得即使只有 1 个碱基改变也能被检测出来。可 DNA 片段标记或者用标记探针来检测。可通过使用 RNA(而不是 DNA)来提高检测的敏感度,这是由于 RNA 的二级结构对序列中的变化更敏感。一个实施方案中,本发明所述方法使用异源双链分析,根据电泳迁移率的变化将双链异源双链分子分离开来(Keen et al. (1991) *Trends Genet.* 7 :5)。

[0267] 另一个实施方案中,用变性梯度凝胶电泳(DGGE)方法(Myers et al. (1985) *Nature* 313 :495),在含梯度变性剂的聚丙烯酰胺凝胶中分析突变体或野生型片段的移动。用 DGGE 作为分析方法时,要修饰 DNA 以确保其不致完全变性,例如通过 PCR 添加约 40bp 的富含 GC 的高熔点 DNA 即 GC 夹子(clamp)。另一个实施方案中,用温度梯度取代变性梯度来鉴别对照和样本 DNA 间迁移率的差异(Rosenbaum 和 Reissner (1987) *Biophys. Chem.* 265 :12753)。

[0268] 其他用于检测点突变的实例包括,但不限于,选择性寡核苷酸杂交,选择性扩增,或选择性引物延伸。例如,制备寡核苷酸引物,将已知突变置于其中心,然后使其在只有出现最佳匹配时才杂交的条件下与目标 DNA 杂交(Saiki et al. (1986) *Nature* 324 :163 ; Saiki et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 :6230)。当寡核苷酸结合到杂交膜并与标记的目的 DNA 杂交时,所述等位基因特异性寡核苷酸杂交于 PCR 扩增的目的 DNA 或大量不同的突变。

[0269] 替代地,取决于选择性 PCR 扩增的等位基因特异性扩增技术可与本发明结合使用。用作特异性扩增的引物的寡核苷酸可将目标突变带入分子中心(以便使扩增取决于示差杂交)(Gibbs et al. (1989) *Nucl. Acids Res.* 17 :2437-2448)或者在一个引物的 3' 末端,在合适的条件下,防止错配,或减少聚合酶延伸(Prossner (1993) *Tibtech* 11 :238)。此外,还期望在突变区导入新的限制性位点以创造出以切割为基础的检测(Gasparini et al. (1992) *Mol. Cell. Probes* 6 :1)。可以预料的是,在一些实施方案中,还可使用扩增用的 Taq 连接酶实施扩增反应(Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 :189)。这些情况下,如果在 5' 序列的 3' 末端存在有最佳匹配时才会发生连接反应,这样就使得有可能通过

查找有无扩增发生来检测特异位点有无已知突变发生。

[0270] 本发明所述方法可通过,例如,用预包装好的诊断试剂盒来实施,所述试剂盒中包含至少 1 种本发明所述的探针核酸或抗体反应物,该试剂盒可方便地用于如临床,对表现出 BAFF-R 基因相关疾病的症状或有该疾病家族史的患者进行诊断。

[0271] 另外,任一类型的表达 BAFF-R 的细胞或组织都可用于本发明所述预后分析。但是,任一种含有核细胞的生物样本都可使用,包括,例如,口腔粘膜细胞。

[0272] 药物基因组学

[0273] 经本发明所述筛选试验鉴定出的对 BAFF-R 活性(例如,BAFF-R 基因表达)具有刺激或抑制作用的试剂或调节剂,可用来向个体给药治疗(预防或治疗)疾病(例如,癌相关疾病或自身免疫疾病)。可考虑将个体的药物基因组学(即对个体基因型与该个体对外来化合物或药物应答之间的关系进行的研究)与所述治疗结合使用。由于改变剂量与药理活性药物血浓度间的关系,治疗物代谢的差异能引发严重的毒性反应或导致治疗失败。因此,用个体药物基因组学可根据个体的基因型筛选出用于预防或治疗的有效试剂(例如,药物)。所述药物基因组学还可进一步用于测定合适的剂量和治疗方案。因此,可对个体的 BAFF-R 蛋白活性、BAFF-R 核酸表达或 BAFF-R 基因突变范围进行测定从而筛选出合适的试剂用于预防或治疗个体。

[0274] 药物基因组学涉及的是,由于受影响的人体内药物分布的变化及异常的作用而导致的临床上具有重要意义的药物应答方面的遗传性差异。参见,例如, Eichelbaum(1996) Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 23 :983-985 和 Linder(1997) Clin. Chem. 43 :254-266。通常,两种药物遗传疾病可被区分。因为改变了药物作用于机体的途径(改变了药物作用)这一单一因素而被传递的遗传疾病或者由于改变了机体作用于药物的途径(改变了药物代谢)这一单一因素而被传递的遗传疾病。这些药物遗传疾病或者是因为罕见的缺陷或者是因为多态性而发生。例如,葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)缺陷是一种常见的遗传性酶病,该病的主要临床并发症是摄取了氧化剂药物(抗-疟疾药物、磺胺药物、止痛药、硝基呋喃)和蚕豆后的溶血反应。

[0275] 作为解释性实施方案,药物代谢酶活性是药物作用强度和作用时间的决定因素。药物代谢酶(例如,N-乙酰转移酶 2(NAT 2)和细胞色素 P450 酶 CYP2D6 和 CYP2C19)的基因多态性的发现为下述现象提供了解释:为什么一些患者在服用了标准及安全剂量的药物后没有获得期望的药效或者表现出超乎寻常的药物应答和严重的毒性。这些多态性在群体中表现为两个表型,强代谢者(extensive metabolizer)(EM)和弱代谢者(poor metabolizer)(PM)。不同群体中 PM 的分布(prevalence)不同。例如,编码 CYP2D6 的基因高度多态并且在 PM 中已鉴定出数个突变,这些都导致功能性 CYP2D6 的缺乏。CYP2D6 和 CYP2C19 的弱代谢者当服用了标准剂量时极常表现出超乎寻常的药物应答及副反应。如果代谢物是活性治疗单元,PM 就不表现治疗应答,这一现象也表现在可待因的止痛效果上,所述可待因的止痛效果要通过其 CYP2D6-形成的代谢物吗啡来介导。另一个极端是所谓的超-快速代谢者,它们不应答标准剂量。近来,超-快速代谢的分子基础已被鉴定为由于 CYP2D6 基因的扩增。

[0276] 因此,可对个体的 BAFF-R 蛋白活性、BAFF-R 核酸表达或 BAFF-R 基因的突变范围进行测定从而选择出可对该个体有效治疗或预防的合适药剂。此外,可利用药物遗传学研究

将编码药物代谢酶的多态性等位基因的基因型用于鉴定个体的药物应答表型。这一知识，当用于确定剂量或进行药物选择时，可避免副反应或治疗失败，因而当用 BAFF-R 调节剂处理受试者时可提高治疗或预防的效力，如本发明所述的一种范例性筛选试验鉴定出的调节剂。

[0277] 监测临床效能

[0278] 监测试剂（例如，药物、化合物）对 BAFF-R 表达或活性的影响（例如，调控异常细胞增殖和 / 或分化的能力）不仅可用于基础药物筛选，还可用于临床试验。例如本发明所述筛选试验测定的试剂在增加 BAFF-R 基因表达、蛋白水平或上调 BAFF-R 活性方面的有效性，可用对表现出 BAFF-R 基因表达下降、蛋白水平降低或 BAFF-R 活性下调的受试者进行临床试验来监测。替代地，筛选试验测定的试剂在减弱 BAFF-R 基因表达、下调蛋白水平或 BAFF-R 活性方面的有效性，可用对表现出 BAFF-R 基因表达增加、蛋白水平升高或 BAFF-R 活性上调的受试者进行临床试验来监测。在这些临床试验中，BAFF-R 的表达或活性以及，优选，参与疾病的其他基因，可作为特定细胞的免疫应答的“指示 (read out)”或标记。

[0279] 例如，可以鉴定这样的基因，包括 BAFF-R，所述基因即当用能调控 BAFF-R 活性（经本发明所述筛选试验鉴定）的试剂（例如，化合物、药物或小分子）进行处理时能够在细胞中得到调控的基因。因此，为了研究试剂对细胞增殖紊乱的影响，例如在临床试验中，可以分离细胞，制备 RNA，分析 BAFF-R 和参与疾病的其他基因的表达水平。基因表达水平（即，基因表达模式）可用 Northern 印迹试验或 RT-PCR 定量，如本发明所述，或者替代地用本发明所述方法中的一种测定所产生蛋白的量，或者测量 BAFF-R 或其他基因的活性水平。在这种情况下，基因表达模式可作为标记，指示细胞对试剂的生理应答。因此，可以在用试剂对个体处理之前或处理过程中的不同时间点对该应答状态进行测定。

[0280] 一个实施方案中，本发明提供了一种用于监测试剂（例如，激动剂、拮抗剂、蛋白质、肽、肽模拟物，核酸、小分子、或本发明所述筛选试验鉴定到的其他候选药物）对受试者治疗有效性的方法，该方法包括下列步骤：(i) 在给药试剂前从受试者获取给药前样本；(ii) 检测给药前样本中的 BAFF-R 蛋白、mRNA、或基因组 DNA 的表达水平；(iii) 从受试者获取一份或多份给药后样本；(iv) 检测给药后样本中 BAFF-R 蛋白、mRNA 或基因组 DNA 的表达或活性水平；(v) 将给药前样本中 BAFF-R 蛋白、mRNA 或基因组 DNA 的表达或活性水平与给药后样本进行比较；以及 (vi) 据此来调整受试者的试剂给药量。例如，期望通过增加试剂给药量来将 BAFF-R 的表达或活性提高到比检测前更高的水平，即，提高试剂的有效性。替代地，可通过减少试剂给药量来将 BAFF-R 的表达或活性减少到比检测前更低的水平，即，减弱试剂的有效性。

[0281] 治疗方法

[0282] 本发明提供了一种预防及治疗方法，该方法对有患与异常 BAFF-R 表达或活性有关的疾病的危险（或易患该疾病）或者患有该疾病的受试者进行处理。

[0283] 特征在于水平或生物活性增高（相对于未患所述疾病或病症的受试者而言）的疾病或病症可用拮抗（即，减弱或抑制）活性的治疗物处理。拮抗活性的治疗物可以治疗或预防方式给药。可利用的这类治疗物包括，但不限于，(i) BAFF-R 多肽或者其类似物、衍生物、片段或同系物；(ii) 抗 BAFF-R 肽的抗体；(iii) 编码 BAFF-R 肽的核酸；(iv) 给药反义核酸以及用“功能不良的 (dysfunctional)”核酸（即，由于 BAFF-R 肽编码序列中的异源

插入)通过同源重组来“敲除”内源功能性 BAFF-R 肽(见,例如, Capecchi (1989) Science 244 :1288-1292);或者(v)能改变 BAFF-R 肽与其结合配偶体间相互作用的调节剂(即,抑制剂、激动剂及拮抗剂,包括本发明所述的额外的肽模拟物或者特异于本发明肽的抗体)。

[0284] 特征在于水平或生物活性减弱(相对于未患该疾病或病症的受试者而言)的疾病及病症可用能增强(即,有激动作用)活性的治疗物来治疗。可以治疗或预防的方式来给药可上调活性的治疗物。可使用的这样的治疗物包括,但不限于,BAFF-R 肽或者其类似物、衍生物、片段或同系物;或者能增强生物利用率的激动剂。

[0285] 水平的增加或减少可通过对肽和/或 RNA 定量很容易地检测出来,即获取患者组织样本(例如,来自活组织检查),体外测定 RNA 或肽的水平、所表达肽(或 BAFF-R 肽的 mRNAs)的结构和/或活性。本领域熟知的方法包括,但不限于,免疫检测法(例如,通过 Western 印迹试验,免疫沉淀和之后的十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳,免疫细胞化学,等)和/或杂交试验检测 mRNAs 的表达(例如, Northern 试验,点印迹,原位杂交,等)。

[0286] 一方面,本发明提供了一种方法,该方法通过向受试者给药能调控 BAFF-R 表达或至少 1 种 BAFF-R 活性的试剂,来防止受试者患上与异常 BAFF-R 表达或活性相关的疾病或病症。有患因异常 BAFF-R 表达或活性所引发或导致的疾病危险的受试者可通过,例如,本发明所述任一诊断试验或预测试验或其结合来鉴定。可在特征在于 BAFF-R 异常的症状出现之前给药预防药物,从而防止疾病或病症,或者延缓其进展。根据 BAFF-R 异常的类型,例如,可用 BAFF-R 激动剂或 BAFF-R 拮抗剂来治疗受试者。合适试剂可根据本发明所述筛选试验来测定。

[0287] 本发明另一方面涉及为治疗目的而调控 BAFF-R 表达或活性的方法。本发明所述调控方法包括让细胞与能调控与该细胞相关的一种或多种 BAFF-R 蛋白活性试剂接触。能调控 BAFF-R 蛋白活性的试剂就可作为本发明所述试剂,例如核酸或蛋白质、天然生成的 BAFF-R 蛋白相应配体、肽、BAFF-R 肽模拟物或其他小分子。一个实施方案中,所述试剂刺激 BAFF-R 蛋白的一种或多种活性。这类刺激试剂的实例包括活性 BAFF-R 蛋白和已导入细胞的编码 BAFF-R 的核酸分子。另一实施方案中,所述试剂抑制 BAFF-R 蛋白的一种或多种活性。这类抑制试剂的实例包括反义 BAFF-R 核酸分子和抗 -BAFF-R 抗体。这些调控方法可体外进行(例如,将细胞与试剂一起培养)或者,可替代地,在体内进行(例如,向受试者给药该试剂)。因此,本发明提供了对患有特征在于 BAFF-R 蛋白或核酸分子表达或活性异常的疾病或病症的个体进行治疗的方法。一个实施方案中,所述方法包括给药试剂(例如,用本发明筛选试验鉴定的试剂),或与能调控(例如,上调或下调)BAFF-R 表达或活性的试剂联用。另一实施方案中,所述方法包括给药 BAFF-R 蛋白或核酸分子作为治疗补偿 BAFF-R 表达或活性的减少或异常。

[0288] 一个实施方案中,本发明提供了使用 BAFF-R 的方法。这类方法中包括用 BAFF-R 多肽抑制动物体内 B 细胞生长、树突状细胞 - 介导的 B 细胞的生长及成熟或者免疫球蛋白生成的方法,所述多肽至少包含 BAFF-R 的 BAFF 结合部分。其他实施方案包括用 BAFF-R 多肽刺激动物体内 B 细胞生长、树突状细胞 - 介导的 B 细胞的生长及成熟或者免疫球蛋白生成的方法(例如用能有效表达 BAFF-R 的载体转染 BAFF-R 缺陷细胞,或者给药能结合 BAFF-R 的抗体及模拟 BAFF)。

[0289] 另一实施方案中,本发明提供了用 BAFF-R 治疗下列疾病的方法:自身免疫疾病、高血压、心血管病、肾功能紊乱、B- 淋巴细胞增生疾病、免疫抑制疾病、器官移植,以及 HIV。本发明还提供了用试剂治疗、抑制或改变涉及 BAFF-R 和其配体间信号通路的免疫应答的方法,本发明还提供了通过给药特异于 BAFF-R 或其表位的抗体抑制炎症的方法。

[0290] 优选通过给药治疗有效量的 BAFF-R 多肽、含融合到异源氨基酸序列的 BAFF-R 多肽的嵌合分子,或抗 -BAFF-R 抗体同系物,实施本发明所述方法。一个实施方案中,本发明提供了药物组合物,其中包括 BAFF-R 多肽和药物学上可接受的赋形剂。

[0291] 另一实施方案中,本发明提供了含有融合有异源多肽或氨基酸序列的 BAFF-R 多肽的嵌合分子。所述嵌合分子的实例包括将 BAFF-R 融合于免疫球蛋白 Fc 区或表位标签序列。

[0292] 另一实施方案中,本发明提供了可与 BAFF-R 多肽特异性结合的抗体。任选地,该抗体为单克隆抗体。

[0293] 本发明的一个实施方案是:通过向哺乳动物给药治疗有效量的含 BAFF-R 拮抗剂的组合物,治疗哺乳动物的与不期望的细胞增生相关的疾病,其中所述的 BAFF-R 拮抗剂包括可拮抗 BAFF-R 与其相应受体间相互作用的多肽以及药物学上可接受的赋形剂。

[0294] 优选实施方案中,细胞表面 BAFF 的相应受体为 BAFF-R。

[0295] 所述方法可使用具有可拮抗 BAFF-R 与其相应受体间相互作用的多肽的任一 BAFF-R 拮抗剂。BAFF-R 拮抗剂的实例包括但不限于可溶性 BAFF-R 多肽、可溶性嵌合 BAFF-R 分子,包括但不限于 BAFF-R-IgG-Fc 和抗 -BAFF-R 抗体同系物。

[0296] 本发明所述方法可用于与不期望的细胞增生相关的任一疾病。具体而言,本发明的方法可用于治疗表达 BAFF 和 / 或 BAFF-R 的肿瘤细胞。

[0297] 其细胞增生可被 BAFF 调控的癌症的实例可以通过体外测量肿瘤组织文库中 BAFF 和 / 或 BAFF-R 信使的表达水平筛选出来。其中 BAFF 和 / 或 BAFF-R 信使高表达的肿瘤组织文库可作为候选者。替代地,可用例如 全长人源 BAFF cDNA 序列搜索公共及私人数据库 (即, Incyte 数据库) 来筛选候选者。

[0298] 本发明所述的用于治疗不期望的细胞增生相关疾病的 BAFF-R 拮抗剂,具体而言就是肿瘤的拮抗剂,可有利地抑制肿瘤细胞生长 10% 以上, 20% 以上, 30% 以上或 40% 以上,最有利地 50% 以上。所述 BAFF-R 拮抗剂可筛选获得。例如,可根据对人结肠癌 HT29 或对人肺癌 A549 的生长抑制活性 (即,超过 10%, 20%, 30%, 40% 或 50% 的抑制) 来筛选 BAFF-R 拮抗剂,人结肠癌 HT29 和人肺癌 A549 分别来自结肠肿瘤和肺肿瘤。

[0299] 本发明的另一实施方案,提供了用上述那些 BAFF-R 多肽抑制动物体内 B 细胞和非 B 细胞生长、树突状细胞 - 介导的 B 细胞生长及成熟或者免疫球蛋白生成的方法。

[0300] 所述的抑制 B 细胞和非 B 细胞的生长、树突状细胞 - 介导的 B 细胞的生长及成熟或者免疫球蛋白生成的方法还可包括给药抗 -BAFF-R 抗体 (多克隆或单克隆),该抗体能结合 BAFF-R 并且能抑制 BAFF 与 BAFF-R 的结合。给药该抗体从而抑制 B 细胞和非 B 细胞生长、树突状细胞 - 介导的 B 细胞的生长及成熟或者免疫球蛋白的生成。适于使用的抗体的量可以从本发明提供的体内数据推算出来。本领域已知多种从动物试验推算剂量的方法,包括,例如,根据体重或体表面积推算。

[0301] 本发明一些实施方案中,BAFF-R:Fc 多肽或抗 -BAFF-R 抗体的给药量为约 1-20mg/

kg/剂。所用剂量可一周二次给予,一周一次给予,每两周一次或者一月一次给予,根据需要而定。临床医师可以在疗效与减少副作用两方面平衡来确定合适的剂量。

[0302] 另一实施方案中,本发明提供了使用了 BAFF-R 或抗 -BAFF-R 抗体治疗下列疾病的方法:自身免疫疾病、高血压、心血管病、肾功能紊乱、B-淋巴细胞增生疾病、免疫抑制疾病、器官移植,炎症以及 HIV。本发明还提供了用试剂治疗、抑制或改变涉及 BAFF-R 和其配体间信号通路的免疫应答的方法。

[0303] 抑制所表达的蛋白(包括 BAFF-R 和 BAFF-R:Fc)凝集的方法

[0304] 本发明还提供了用于抑制或减弱表达蛋白凝集的方法,具体为人 BAFF-R 或 huBAFF-R:Fc,这些表达蛋白在表达过程中有凝集倾向,阻止高产量纯化。本发明的方法中,将在重组系统表达时有凝集倾向的蛋白的氨基酸序列与表现较弱凝集活性的所述蛋白的同系物的氨基酸序列进行比较。这两种同系物具有保守区域,非保守氨基酸位于保守区域之间或者散布于区域之内。通常,可将凝集蛋白中的至少 1 个非保守氨基酸取代为同系物中的氨基酸以减弱凝集。一些实施方案中,非极性氨基酸可被取代。非极性氨基酸包括甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸及半胱氨酸。一些实施方案中,非极性氨基酸取代其他非极性氨基酸。抑制或减弱凝集的优选非极性氨基酸为脯氨酸及丙氨酸。其他实施方案中,不带电荷的极性氨基酸被取代为非极性氨基酸。不带电荷的极性氨基酸包括天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸以及酪氨酸。

[0305] 本发明的方法中,所作的取代优选使该蛋白保留生物活性。通常,非-保守氨基酸允许取代而不会明显地影响生物活性。

[0306] 本发明所述方法的一个具体实施例中,人 BAFF-R 蛋白可有这样的氨基酸取代,在 SEQ ID NO:5 的 V20, P21, A22 和 L27(或 SEQ ID NO:12 的 V41, P42, A43 和 L48)位置上导入氨基酸取代或其不同组合,这些取代可大大减弱蛋白的凝集。类似策略可用于其他当用重组系统表达时有凝集倾向的蛋白。尽管不希望受到任何具体操作理论的限制,但是可确信的是用不带电的极性氨基酸取代非极性氨基酸会赋予该蛋白溶解性,并阻碍蛋白间非极性区域的凝集。

[0307] 本发明不仅限于本发明所述具体实施方案的范围。实际上,除本发明描述之外,对本发明的各种改进本领域技术人员都可以从上述说明书及附图中显而易见地获知。这些改动都落在所附权利要求请求保护的范围之内。

[0308] 实施例

[0309] 实施例 1

[0310] 本实施例描述了 BAFF-R, BAFF 的一种新受体的分子克隆。

[0311] 材料和方法

[0312] 从 BJAB 细胞中制备寡聚 -dT 引导的 cDNA 文库,并将该文库定向克隆入表达载体 CH269,所述 BJAB 细胞是一种能结合人 BAFF 的人 B 细胞系。CH269 是 pCEP4(Invitrogen)的衍生物,其中包含驱动所克隆的 DNA 表达的 CMV 启动子,还包含 EBV 的 oriP。这使得这些质粒能在 EBNA-1 稳定转化的细胞中多拷贝自动复制,例如在 293EBNA 中。可将上述 BJAB cDNA 文库转染入大肠杆菌 DH10B 细胞中,并种植于 96 孔板中,形成每孔约 2500 个独立克隆的库。用 Qiagen BioRobot 9600 从这些库中制备 DNA。用 Lipofectamine(Life Technologies)将该 DNA 库转染入种植在纤连蛋白包被的 6 孔培养皿中的 293EBNA 细

胞中。转染后 48 小时,去除培养基,用平板检测洗涤缓冲液 (20mM HEPES,0.5mg/ml 牛血清白蛋白,0.1% NaN_3) 洗涤细胞。用含有 100mg/ml 生物素标记的人重组可溶性 mycBAFF (myc-huBAFF) 的结合缓冲液 (PBS,2% 胎牛血清,0.1% NaN_3) 覆盖细胞单层,室温下孵育 1 小时。试验中使用的 myc-huBAFF (136-285 位的氨基酸) 表达于巴斯德毕赤氏酵母 (*Pichia pastoris*),用阴离子交换层析纯化后再凝胶过滤纯化。

[0313] 除去 BAFF 溶液,洗涤细胞,用含 1.8% 甲醛-0.2% 戊二醛的 PBS 溶液孵育 5 分钟固定细胞。再次洗涤细胞,将偶联有碱性磷酸酶的链霉亲和素 (SAV-AP) (Jackson ImmunoResearch) 原液以 1 : 3000 稀释于结合缓冲液,然后用其孵育细胞 30 分钟。

[0314] 洗涤细胞,用固红 / 奈酚磷酸盐 (Pierce) 染色。可通过低倍显微镜下观察时红色沉淀物存在,鉴定出结合有生物素-BAFF/SAV-AP 复合物的细胞。二级筛选要作的是从 BAFF 结合库的 DH10B 甘油储存物中挑出多个单克隆,接种培养 100 个库,然后重复上述 BAFF 结合试验。类似地,将二级筛选阳性库分散为多个单克隆,用上述方法转染到 293EBNA 中时测定 BAFF 结合情况。对独立的 BAFF 结合克隆的 DNA 序列进行测定。

[0315] 结果

[0316] BAFF 结合克隆中的一个为 pJST576。其中含有的插入片段大小为 1201 个碱基对 (bp) 但不包括聚-A 尾。pJST576 插入片段的序列见图 1A (SEQ ID NO :1)。该克隆的 BLAST 分析显示在 Genbank 数据库中与染色体 22 BAC 克隆 HS250D10 (登记号 Z99716) 具有同源性。pJST576 全序列出现于该 BAC 中。还发现该序列与人 EST, AI250289 (IMAGE 克隆 2000271) 的 3' 端具有同源性。所述 EST 制备自人滤泡性淋巴瘤文库。EST AI250289 获自 Incyte,并测定了插入片段的序列 (图 1B) (SEQ ID NO :2)。该序列将 15bp 的 5' 端序列添加到了 pJST576 序列上,该序列与基因组序列邻接,而长 23bp 的序列,不与基因组序列邻接。EST 序列其余的部分与 pJST576 具有理想的同源性。这些克隆中未鉴定到开放阅读框。

[0317] 实施例 2

[0318] 该实施例中,我们测定出 JST576 cDNA 中含有内含子,然后我们构建了开放阅读框。

[0319] 方法

[0320] 对 JST576 cDNA 序列运行 GENSCAN (Burge, C. & Karlin, S. J. (1997) Mol. Biol. 268 :78-94) 外显子预测程序。该程序预测的结果表明该 cDNA 中存在有内含子。为了确定该预测是否正确,对来自 2 个表达 JST576 的细胞系的第一链 cDNA 进行 PCR 分析。用 RNeasy 试剂盒 (Qiagen) 按照说明书建议的方法,从约 10^7 个 BJAB 或 IM-9 细胞纯化出 RNA。对 RNA 定量,取 5 μ g,用 Superscript 预扩增试剂盒 (Life Technologies) 进行第一链 cDNA 反应。用寡聚 dT 和随机六聚体制备第一链产物。按照推荐的方法合成第一链。每一反应物各取 3 μ l,然后用 10ng JST576 或者不含 DNA 的试样作 PCR 模板,使用位于所预测内含子两侧的寡核苷酸作引物。反应中使用的寡核苷酸为 5' 寡聚体 BAF-225 [5' -GGCC GAGTGCTTCGACCTGCT-3'] (SEQ ID NO :33) 或 BAF-226 [5' -GGTCCGCCACTGCGTGGCCTG-3'] (SEQ ID NO :34) 和 3' 寡聚体 BAF-191 [5' -CACCAAGACGGCCGGCCCTGA-3'] (SEQ ID NO :35)。每一反应体系中包含 1xPfu 缓冲液 (Stratagene), 200 μ M dNTPs, 10% DMSO, 每种寡聚体各 150ng, 以及 1.25 单位 Turbo Pfu 聚合酶 (Stratagene)。反应在下列参数下进行 35 个循环: 94 $^{\circ}$ C, 30 秒; 60 $^{\circ}$ C, 1 分钟; 以及 72 $^{\circ}$ C, 1.5 分钟。每一种反应物各取 10 μ l, 在 1%

琼脂糖凝胶上电泳。用 High PurePCR 产物纯化试剂盒 (Roche Molecular Biochemicals) 对来自 BJAB 和 IM-9BAF-225/191 反应体系的剩余产物进行纯化,对大批产物进行 DNA 测序。此外,用引物 BAF-225 和 BAF-191,从静止的 B 细胞 cDNA 制备出 PCR 产物,进行亚克隆,并对单个的克隆进行测序。取 5 μ l 静止的 B 细胞 cDNA (Clontech) 用于上文详述的用 BAF-225 和 BAF-191 作为引物的 PCR 反应中。然后用 High Pure PCR 产物纯化试剂盒纯化 PCR 产物,并浓缩。为了亚克隆上述 PCR 片段,按推荐的方法用 Sure Clone 连接试剂盒 (Amersham Pharmacia Biotech) 将片段的末端磷酸化,并补平。将得到的产物克隆入 pBluescriptII (Stratagene) 的 EcoRV 位点,然后转化大肠杆菌。培养单个克隆,小量制备质粒 DNA。对 6 个单个的克隆进行测序。

[0321] 结果

[0322] 用 GENSCAN 程序推测到的 JST576 的成熟核苷酸序列和氨基酸序列见图 2A (SEQ ID NO :3)。来自 BJAB 和 IM9 反应体系的 PCR 产物包含推测内含子显示于图 2B,这确证了 JST576 cDNA 克隆中有内含子存在。用 BAF-225/BAF-191 从 JST576 cDNA 扩增到的 PCR 产物的推测长度为约 788bp,而用 BAF-226/BAF-191 时为约 767bp。从 JST576 模板得到的 PCR 产物大约也是这样大小 (泳道 10 和 11)。用 BAF-225/BAF-191 从 oligo dT 引导的 BJAB 或 IM-9 第一链 cDNA 得到的 PCR 产物 (泳道 2 和 6) 大小相同,并且明显的小于来自 JST576 cDNA 的产物。不包含推测内含子的该片段的推测大小为 484 bp。PCR 产物的大小与该推测结果一致。如果用随机六聚体作引物扩增 BJAB 或 IM-9 RNA 得到了同样的结果 (泳道 4 和 8)。使用 BAF-226/BAF-191 的反应不会在第一链 cDNA 模板上发生。因此,显然用 GENSCAN 程序推测的内含子确实存在于 JST576 cDNA。从 BJAB 和 IM-9RNA 得到的剪接产物的序列可以通过对大批 PCR 产物测序得到确证,并反映于图 2C (SEQ ID NO :4) 所示序列中。该序列与图 2A (SEQ ID NO :3) 所示序列相同,只是没有第 149 位核苷酸处的丙氨酸密码子 (GCA) (用小写字母显示)。对来自静止 B 细胞 cDNA RT-PCR 反应的 6 个独立的克隆测序的结果表明两个剪接受体位点都已被使用。优选的受体位点是那种能产生 1 个丙氨酸残基的产物 (6 个克隆中的 5 个是这种情况)。但是,由 GENSCAN 推测出的含两个丙氨酸的序列 (SEQ ID NO :3),仅出现于在这 6 个克隆中的 1 个。因此,人 JST576 的开放阅读框已建立,并已确定出单个氨基酸剪接变体。该开放阅读框预示的是图 2D 所示的含 184 个氨基酸的蛋白质 (SEQ ID NO :5)。用粗体字表示的丙氨酸 (A) 残基代表该剪接变体。该蛋白被称为 BAFF-R。推导出的 BAFF-R 的氨基酸序列包括一从第 72-100 位残基的疏水区域 (Hopp-Woods 算法) 以及一用 TMPred 算法分析出的从第 84-102 位残基的潜在跨膜区段。该区域后面接的是一段高度带电的氨基酸片段,其功能是作为终止转移信号。BAFF-R 不含 N-末端信号序列,是 III 型膜蛋白,类似于其他的 BAFF 结合蛋白 BCMA (Laabi et al. (1992)EMBO J. 11 :3897-3904) 和 TACI (von Bulow 和 Bram, (1997)Science 278 :138-141)。N-末端被推测为是 BAFF-R 的胞外区,在第 19 ~ 35 位残基的部位含 4 个半胱氨酸基序,这一点与 TNF 受体家族其他任一成员都不同。BAFF-R 的 C-末端被推测为胞内区。

[0323] 实施例 3

[0324] 该实施例中,我们测定了人 BAFF-R 中推定的起始蛋氨酸上游的 DNA 序列,人 BAFF-R 包含框内终止密码子。

[0325] 方法

[0326] 根据 BAC HS250d10 (Genbank 登记号 Z99716) 中出现于推定的 ATG 上游的基因组序列, 设计引物 BAF-254 (5' GGGCGCCTACAATCTCAGCTA3') (SEQ ID NO:36), 并将其与寡聚体 BAF-236 (5' GGCGGACCAGCAGGTCTGAAGCACTC 3') (SEQ ID NO:37) 一起用于 PCR 扩增反应。该反应所用模板为第一链 cDNA, 该 cDNA 是用 PCR 预扩增试剂盒按照厂家推荐方法 (Life Technologies) 从人脾 RNA (Clontech) 制得的。PCR 反应体系包括: 3 μ l 第一链反应物, 1xPfu 缓冲液 (Stratagene), 10% DMSO, 0.2 mM dNTPs, 每一引物各 150ng, 以及 1.25 单位的 Pfu Turbo 聚合酶 (Stratagene)。遵照产品说明用 High Pure PCR 产物纯化试剂盒 (Roche Molecular Biochemicals) 纯化上述 PCR 产物。用 Sure Clone 连接试剂盒 (Amersham Pharmacia Biotech) 将该 PCR 产物末端补平, 并进行末端磷酸化, 并将该产物克隆入 pBSK2 (Stratagene) 的 EcoRV 位点, 然后转化 DH5 细胞。用 Wizard 系统 (Promega) 小量制备连接反应得到的克隆, 然后用 ABI 仪器测序。

[0327] 结果

[0328] 对 PCR 产物的测序证实了 mRNA 中包含有这样的序列, 即包含于基因组序列中直接位于 ATG 上游的序列。该序列为图 3 所示序列的下划线部分。框内上游终止密码子的存在以及其它蛋氨酸的缺如表明, JST576 cDNA 中发现的蛋氨酸是真正的起始蛋氨酸。

[0329] 实施例 4

[0330] 该实施例描述了小鼠 BAFF-R cDNA 的克隆。

[0331] 方法

[0332] 按照厂商的详细说明, 从购自 Stratagene (La Jolla, CA) 的小鼠 A20 细胞系 cDNA 文库中, 筛选约 1 百万个噬菌体噬斑。用 EcoNI 消化 JST576 人 BAFF-R cDNA, 并在 1% 低熔点凝胶上电泳。切下含 425 bp 片段的凝胶条, 称重。加入 3 倍体积的水, 将该凝胶条煮沸 5 分钟。然后用 50 μ Ci 32 P-dCTP (Amersham) 标记该片段, 所用的反应体系包括 50 mM Tris pH8, 5mM MgCl₂, 10 μ M (β -巯基乙醇, 200mM HEPES pH 6.5, 20 μ M dNTPs (dCTP 除外), 0.27 单位 pd(N)6 六聚核苷酸 (Amersham Pharmacia Biotech) 以及 1 单位 Klenow 酶 (USB), 室温过夜。该探针以每毫升探针约 1 百万个噬斑的量与滤膜一起在噬菌斑筛选缓冲液中 (50mM Tris, 1% SDS, 1M NaCl, 0.1% 硫代硫酸钠, 0.2% PVP, 0.2% Ficoll, 0.2% BSA) 65°C 过夜孵育。50°C 下, 用 2XSSC 和 0.1% SDS 漂洗滤膜 1.5 小时 (3 $\times$ 2 升), 然后对 X- 线胶片曝光两天。这样鉴定出约 36 个阳性噬菌斑, 对其中 6 个噬菌斑进行了噬菌斑纯化。用 Stratagene 详述的体内剪切方法释放出噬菌粒。培养所获得的克隆, 然后小量制备 DNA (Qiagen)。并对 cDNA 克隆测序。

[0333] 结果

[0334] 小鼠 BAFF-R 共有核苷酸序列见图 4A (SEQ ID NO:8), 共有氨基酸序列见图 4B (SEQ ID NO:9)。其中的 3 个克隆缺失了鼠 BAFF-R 胞内区的第 119 ~ 129 位的 10 个氨基酸。将人 BAFF-R 与小鼠 BAFF-R 的序列进行比对显示: 胞外区中的 4 个半胱氨酸残基是保守的, 起始的蛋氨酸的位置是类似的, 人和小鼠该蛋白的 C- 末端区域高度保守 (图 4C), 最后的 24 个残基是相同的。这些序列的全长有约 56% 的同源性。

[0335] 实施例 5

[0336] 该实施例中, 描述了人重组可溶性 BAFF 能够与用 pJST576 和 GFP 报告质粒共转染后的细胞结合。

[0337] 材料和方法

[0338] 报告质粒编码膜锚定 GFP 分子,使得可从非转染细胞中鉴定出转染细胞。用该报告质粒和 pJST576 共转染 293EBNA 细胞,所使用的转染试剂为 Lipofectamine 2000 (Life Technologies)。转染后 18-20 小时,用含 5mM EDTA 的 PBS 缓冲液将细胞从平板上解离下来,并计数。用 FACS 缓冲液 (PBS 中含 10% 胎牛血清,0.1% NaN₃) 洗涤细胞两次,将生物素标记的 myc-huBAFF 以 8ng/ml 至 5 μg/ml 浓度范围稀释于 FACS 缓冲液,取 2.5×10^5 个上述细胞,与该稀释液在冰上孵育 1 小时。用 FACS 缓冲液洗涤孵育后的细胞,在链霉亲和素-藻红蛋白偶联物的储存液 (SAV-PE) (Jackson ImmunoResearch) 以 1 : 100 稀释后,再用该稀释液孵育细胞 30 分钟。然后用 FACS 缓冲液再次洗涤细胞,并将其重悬于含 1% 多聚甲醛的 FACS 缓冲液中。通过 FACS 分析细胞的 GFP 及 PE 荧光,将得到的数据绘制成 4 象限的点图。右侧两个象限中的点代表表达有转染报告物 GFP 的细胞。上面两个象限中的点代表通过 SAV-PE 所显示的结合作用结合了生物素标记的 myc-huBAFF 的细胞。右上象限中的细胞是转染后的细胞,该细胞结合了生物素标记的 myc-huBAFF。

[0339] 结果

[0340] 未被染色的细胞以及只被 SAV-PE 染色的细胞中,约 50% 为 GFP 阳性,已经被报告质粒共转染 (图 5)。当被 GFP 报告物和 pJST576 共转染的细胞用 1 μg/ml 生物素标记的 myc-huBAFF 染色时,右下象限内的细胞几乎全部都上移,这表明这些细胞结合了 BAFF。如果用表达 huTACI 的质粒代替 pJST576 进行共转染,可得到类似的结果。已知 huTACI 能结合 BAFF。将生物素标记的 myc-huBAFF 在 5 μg/ml ~ 8ng/ml 范围内 5 倍稀释,用得到的系列稀释液染色细胞,随着生物素化的 myc-huBAFF 浓度降低,上述细胞的上移程度减弱。

[0341] 实施例 6

[0342] 该实施例中,描述了人重组可溶性 BAFF 或小鼠重组可溶性 BAFF 能够与用 pJST576 和 GFP 报告质粒共转染后的细胞结合。

[0343] 材料和方法

[0344] 按照实施例 5 描述共转染 293EBNA。转染后 18-20 小时,移出细胞,并计数,染色进行 FACS 分析,与实施例 5 类似,仅作下述改动。将所述细胞置于冰上用 5 μg/ml 小鼠或人重组可溶性标签-BAFF 孵育 1 小时。洗涤,然后用 5 μg/ml 抗-标签单克隆抗体 M2 (Sigma Aldrich) 孵育 30 分钟,然后,将 PE 偶联的驴抗-小鼠 IgG (Jackson ImmunoResearch) 原液作 1 : 100 稀释,用该稀释液孵育洗涤后的细胞 30 分钟显色。再次洗涤细胞,用多聚甲醛固定,用 FACS 分析 GFP 和 PE 阳性细胞。

[0345] 结果

[0346] 约 50% 细胞为 GFP 阳性,因而已被报告质粒共转染 (图 6)。当被 GFP 报告物和 pJST576 共转染的细胞用 5 μg/ml 人或小鼠重组可溶性标签-BAFF 染色时,右下象限内的细胞几乎全部都上移,这表明小鼠和人 BAFF 都能结合 pJST576 转染后的细胞。

[0347] 实施例 7

[0348] 该实施例中,描述了小鼠重组可溶性 APRIL 与用 pJST576 和 GFP 报告质粒共转染后的细胞不能结合。

[0349] 材料和方法

[0350] 按照实施例 5 描述共转染 293EBNA。转染后 18-20 小时,移出细胞,计数,染色进行

FACS 分析,与实施例 5 类似,仅作下述改动。将所述细胞置于冰上用 $1\mu\text{g/ml}$ 小鼠重组可溶性 myc-APRIL 孵育 1 小时。洗涤,然后用 5g/ml 抗-小鼠 APRIL 单克隆抗体孵育 30 分钟,然后,用 $5\mu\text{g/ml}$ 生物素标记的抗-大鼠 IgG2b (Pharmingen) 将洗涤后的细胞孵育 30 分钟,最后用 SAV-PE 将洗涤后的细胞孵育 30 分钟显色。再次洗涤细胞,用多聚甲醛固定,用 FACS 分析 GFP 和 PE 阳性细胞。

[0351] 结果

[0352] 约 50% 细胞为 GFP 阳性,因而已被报告质粒共转染(图 7)。当被 GFP 报告物和 pJST576 共转染的细胞用 $1\mu\text{g/ml}$ 小鼠 myc-APRIL 染色时,右下象限内的细胞无一上移,这与用表达人 TACI 的质粒替代 pJST576 共转染的细胞相反。在这些转染细胞中,几乎全部细胞都能结合 myc-APRIL。此前已表明 BAFF 与 APRIL 二者均能结合 TACI 和 BCMA。因此,APRIL 不能与 pJST576 转染细胞表达的 BAFF-R 结合这一事实表明 BAFF-R 与 BAFF 的结合是特异性的。

[0353] 实施例 8

[0354] 该实施例描述了,当 BAFF-R 表达自 pJST576 时其能与重组可溶性人标签-BAFF 免疫共沉淀。

[0355] 材料和方法

[0356] 用 pJST576、用仅作为对照的载体、或者用表达 huTACI 的作为 BAFF 结合的阳性对照的质粒,通过 Lipofectamine 2000 转染 293EBNA 细胞。孵育 20 小时后,吸出转染培养基,用 PBS 洗涤细胞,将培养基改换为 ^{35}S 标记的培养基(不含蛋氨酸和半胱氨酸的 DMEM 9 份与 1 份完全 DMEM 混合而成,其中添加了 10% 透析后的胎牛血清、 4mM 谷氨酰胺、和 $100\mu\text{Ci/ml}$ ^{35}S 蛋氨酸和半胱氨酸 (Translabel, ICN Radiochemicals))。将细胞在该培养基中孵育 6 小时后,除去培养基。用 PBS 洗涤细胞,然后用 250 (1 提取缓冲液 (1% Brij 98, 150mM NaCl, 50mM Tris pH7.5) 溶解细胞。取 $75\mu\text{l}$ ^{35}S 标记的细胞的提取物,使该提取物与含有 $5\mu\text{g}$ 重组可溶性人标签-BAFF 并添加了 10% 胎牛血清和 0.1% NaN_3 的 1ml DMEM 4°C 孵育过夜,进行共-免疫沉淀,加入 $10\mu\text{g}$ 抗-标签单克隆抗体 M2 和蛋白 A-Sepharose,继续孵育 2 小时。离心收集 Sepharose 微粒,用 FACS 缓冲液洗涤,然后重悬于 SDS 上样缓冲液,该缓冲液中加入 β -巯基乙醇作为还原剂。样本煮沸 5 分钟,简短离心沉淀 Sepharose 微粒,分成等份后用 SDS-PAGE 电泳。用 Enlightning (NewEngland Nuclear) 孵育凝胶,干燥后,在 -80°C 对胶片曝光。

[0357] 结果

[0358] 这种免疫共沉淀将标签-BAFF 通过抗-标签抗体 M2 结合到蛋白 A-Sepharose 微粒上。这样也就能把细胞提取物中的任一种可结合标签-BAFF 的蛋白质一起沉淀下来,用放射自显影的方法检测这些放射性标记的蛋白质。293EBNA 细胞没有结合 BAFF 时,空载体显示该方法固有的背景(图 8)。当转染 TACI 的细胞的提取物与标签-BAFF 发生免疫共沉淀时,观察到一条表观分子量约 34kDa 的条带。这几乎相当于全长人 TACI 的推测分子量 (31.2kDa),该 TACI 蛋白已知能结合 BAFF。当 pJST576 转染的细胞的提取物与标签-BAFF 发生免疫共沉淀时,观察到一条表观分子量约 12kDa 的条带。表达自 pJST576 的 BAFF-R 的推测分子量为 18.9kDa 。推测分子量与观察到的分子量之间的差异可能是由于 BAFF-R 的电荷或构象引发异常电泳迁移所导致的。另一种解释是 12kDa 可能为 BAFF-R 的蛋白水解片

段。

[0359] 实施例 9

[0360] 本实施例描述了可溶型 BAFF-R 的制备。设计互补于 pJST576 的寡核苷酸引物, 用其进行 PCR 扩增不含跨膜结构域和胞内结构域的 BAFF-R 胞外结构域。通常, 该部分包含茎干 (stalk) 的大部分, 或者位于配体结合结构域与跨膜结构域之间的氨基酸区。可通过改变所包含的茎干区域的大小使得到的可溶型受体的功效达到最佳。可利用合适的限制性位点来改造该扩增片段, 使得各种异源前导序列克隆到该片段 5' 末端, 以及可通过 3' 末端克隆入各种 Ig 融合嵌合体融合载体。替代地, 可在 BAFF-R 胞外结构域的 3' 末端插入终止信号, 制备该受体的可溶形式, 或者在无需使用 Ig 融合嵌合体方法的情况下用另一种 C- 末端融合配偶体 (partner)。另外, 可构建由融合配偶体组成的 N- 末端融合蛋白, 所述融合配偶体包含信号序列和其后的 BAFF-R 的 N- 末端胞外结构域。得到的载体可在生物工程学中所使用的大多数系统中表达, 所述系统包括酵母、昆虫细胞、细菌和哺乳动物细胞, 且对于所有这些类型的表达都有实例。可根据需要附加不同的人 Fc 结构域来优化或消除 FcR 及补体的相互作用。替代地, 这些 Fc 结构域的突变形式 可用于选择性地消除 FcR 或补体的相互作用或将 N- 连接的糖附加到 Fc 结构域, 从而获得一些优势。BAFF-R:Fc 融合分子的实例见图 9。该分子包括: 来自小鼠 Ig-k 基因的 I 型前导序列, 该序列通过 Aat2 限制性位点连接于 BAFF-R 胞外结构域 (图 2D 所示的第 2-71 位氨基酸残基), 该结构域再通过 SalI 限制性位点连接于人 IgG1 的 Fc 结构域。

[0361] 实施例 10

[0362] 该实施例中, 我们用 Northern 印迹分析展示了 BAFF-R 在人多种组织和细胞系中的表达谱。

[0363] 材料和方法

[0364] 在合适条件下培养不同的 B 细胞及非-B 细胞系。用 RNeasy 试剂盒 (Qiagen) 从约 10^7 个细胞中提取 RNA。对该 RNA 进行定量, 并且每一样本各取 20 μ g 在 1.2% 甲醛凝胶上电泳, 按照 Sambrook et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 1989 所述方法。将该凝胶印迹到尼龙膜 (BMB) 上, 然后进行紫外线 (UV) 交联。数个人 Northern 印迹 (12 泳道多个-组织, 人 II 和免疫系统 II) 购自 Clontech。在 65°C, 将滤膜置于 ExpressHyb (Clontech) 缓冲液中预杂交 30 分钟, 然后与来自 JST576 3' 端的随机引导的 32 P 标记的 EcoNI 片段杂交约 3 小时。将该滤膜用 2X SSC/0.05% SDS 室温下漂洗 45 分钟, 然后用 0.1XSSC/0.1% SDS 在 50°C 漂洗 45 分钟。使用 2 个增光屏将该滤膜对照 X- 线胶片曝光 4 天。此外, 数个人 Northern 印迹 (12 泳道多个-组织, 人 II 和免疫系统 II) 购自 Clontech, 与 JST576 探针杂交, 并用上述方法进行处理。

[0365] 结果

[0366] 在这一检测水平上, BAFF 的 mRNA 在免疫系统器官中的表达占绝对的优势。表达水平最高的是脾和淋巴结, 但是 mRNA 还出现在 PBLs, 胸腺、小肠和结肠 (图 10A, B 和 C)。该信使 RNA 的大小约为 4.5kb; 样本中显示有两个 mRNA 群的基因没有高表达。这两群 mRNA 也存在于脾和淋巴结中。这一点表明: BAFF-R 具有不同的 polyA 添加位点, 或者 RNA 经历了不同的剪接。当检测多种细胞系有无 BAFF-R mRNA 存在时, 对这一相同的 4.5kb mRNA 进行了检测。只有 B 细胞系表达 BAFF-R mRNA (图 11)。在 U266、RPMI8226 和 Daudi 细胞系或者

被检测的非-B 细胞系中未检测到所述 mRNA。

[0367] 实施例 11

[0368] 该实施例中,我们发现 JST576 的表达仅限于能结合 BAFF 的细胞系。

[0369] 材料和方法

[0370] 细胞系购自 ATCC,并在推荐的条件下培养。

[0371] 在合适条件下培养不同的 B 细胞系及非-B 细胞系。用 RNeasy 试剂盒 (Qiagen) 从约 10^7 个细胞中提取 RNA。对该 RNA 定量,并且每一样本各取 20 μ g 在 1.2% 甲醛凝胶上电泳,按照 Sambrook et al. MOLECULAR CLONING :A LABORATORY MANUAL,1989 所述方法。将该凝胶印迹到尼龙膜 (BMB) 上,然后紫外线 (UV) 交联。让该滤膜与 JST576 标记的片段杂交,然后用实施例 10 的方法洗涤。用 FACS 分析来检查这些细胞结合 BAFF 的能力。收集约 $2.5-5 \times 10^5$ 个细胞,并洗涤。将标签-标记的 BAFF 稀释于 PBS+5% FCS 和 0.05% 叠氮钠 (FACS 缓冲液) 中,用一定浓度范围 (8-0.125 μ g/ml) 的该稀释液在冰上孵育所述细胞 30 分钟。用 FACS 缓冲液洗涤细胞,然后用 5 μ g/ml 的抗-标签单克隆抗体 M2 (Sigma) 在冰上孵育 30 分钟。再次用 FACS 缓冲液洗涤细胞,然后用山羊抗-小鼠 IgG PE 偶联抗体 (Jackson Immuno Research) 的 1 : 5000 稀释液在冰上孵育该细胞 30 分钟。用上述方法洗涤细胞,然后用 CellQuest 软件在 FACSCalibur 流体分选仪 (Becton-Dickinson) 上分析这些细胞。

[0372] 结果

[0373] BAFF 结合试验的结果列于表 1。能结合 BAFF 的细胞系是 Ramos, Namalwa, IM-9, NC-37, Raji, BJAB 和 SKW6.4。用“+”的数目来表示结合的水平。不能结合 BAFF 的细胞系是 U266, RPMI 8226, Daudi, U937, Jurkat, HT29, A549, SW480 和 ME260。细胞系结合 BAFF 的能力与 BAFF-R mRNA 的存在相关,见图 11。

[0374] 表 1

[0375]

细胞系	类型	结合 BAFF 的能力
BJAB IM9	Burkitt 淋巴瘤 原淋巴细胞 IgG	+++ +++
NC-37	原淋巴细胞 EBV+	++
Ramos	Burkitt 淋巴瘤 EBV-	++
Raji	Burkitt 淋巴瘤	++
SKW6.4	原淋巴细胞 IgM	++
Namalwa	Burkitt 淋巴瘤	+
Daudi	Burkitt 淋巴瘤 EBV+	-
U266	浆细胞瘤	-
RPMI8226	浆细胞瘤	-
U937	单核细胞	-
Jurkat	T 细胞白血病	-
HT29	结肠直肠腺癌	-
A549	肺癌	-
SW480	结肠直肠腺癌	-
ME260	黑色素瘤	-

[0376] 实施例 12

[0377] 该实施例描述了:通过瞬时转染 293EBNA 细胞而表达并分泌到条件培养基中的 huBAFF-R:huIgG1 融合蛋白,能够免疫共沉淀重组可溶性生物素标记的 myc-huBAFF。

[0378] 材料和方法

[0379] 用表达 huBAFF-R(aa2-71):Fc 的 pJST61 8, 用表达 huBCMA:huIgG1 的质粒作为 BAFF 结合阳性对照, 或用表达 huFN14:huIgG1 的质粒作为 BAFF 结合阴性对照, 通过 Lipofectamine 2000 (Life Technologies) 转染 293EBNA 细胞。孵育 24 小时后, 收集条件培养基。

[0380] SDS-PAGE 通过下述操作来进行: 将加有或不加还原剂的 2X SDS 电泳缓冲液与上述条件培养基等体积混合, 煮沸 5 分钟。然后将样本在 4-20% SDS 聚丙烯酰胺凝胶上电泳。将已知量的纯化 hBCMA:Fc 上样于邻近泳道, 以测算上述条件培养基中 hIgG 1 融合蛋白的量。

[0381] 用 Western 印迹试验, 在 0.01M CAPS pH11-10% MeOH 缓冲液中将样品转移到膜 (Immobilon P, Millipore) 上。用含 5% 脱脂干奶粉 (NFDM) 的 TBST 封闭该膜, 并将该膜与 1:3000 稀释的山羊抗-人 IgG-HRP (Jackson ImmunoResearch) 作用 1 小时, 然后用 TBST 洗膜, 对胶片曝光。取 200 μ l 上述条件培养基, 与溶于 1ml DMEM-10% 胎牛血清-0.1% NaN_3 中的 200ng 重组可溶性人标签 -BAFF 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 进行免疫共沉淀。加入蛋白 A-Sepharose, 继续孵育 2 小时。离心收集 Sepharose 微粒, 再用 FACS TBST 缓冲液洗涤, 然后重悬于其中加有还原剂 β -巯基乙醇的 SDS 上样缓冲液中。将样品煮沸 5 分钟, 简短离心沉淀 Sepharose 微粒, 分成等份在 SDS-PAGE 上电泳。标签 -huBAFF 50ng 电泳作为阳性对照。用 Western 印迹试验, 在 0.01M CAPS pH11/10% MeOH 缓冲液中将样品转移到 PVDF 膜 (Immobilon P, Millipore) 上。用 5% NFDM-TBST 封闭膜, 再将该膜与 1 μ g/ml 抗-标签 M2-HRP 作用 1 小时, 用 TBST 洗膜后, 对胶片曝光。

[0382] 结果

[0383] 免疫共沉淀反应通过融合配偶体与蛋白 A-Sepharose 间的相互作用带着各种受体:Fc 融合体沉落下来。能与 R:IgG1 融合体相互作用的任何一种蛋白质也都能被带着沉落下来, 如标签 -BAFF。表达 hBCMA:Fc 的细胞的条件培养基与标签 -BAFF 发生了免疫共沉淀, 正如预想的那样, 且 western 印迹出现了与标签 -BAFF 共-迁移的条带 (图 12)。表达 hFN14:Fc 的细胞的条件培养基与标签 -BAFF 未发生免疫共沉淀。表达 BAFF-R:Fc 的细胞的条件培养基能够共-免疫沉淀标签 -BAFF, western 印迹出现了与标签 -BAFF 共-迁移的条带, 且该条带的强度与 huBCMA:huIgG 1 免疫共沉淀时出现的条带近似。

[0384] 实施例 13

[0385] 该实施例说明, BAFF-R:Fc 融合蛋白, huBAFF-R(aa2-71):huIgG1, 能够阻断 huBAFF 与 BJAB 细胞间的结合。

[0386] 材料和方法

[0387] 制备实施例 9 中所述的 huBAFF-R(2-71)-huIgG1 融合体, 称其为 pJST618。将该构建体瞬时转染入 293EBNA 细胞, 收获该条件培养基。蛋白纯化的方法为: 用酸从蛋白 A-Sepharose 洗脱, 然后凝胶过滤层析。取 200ng/ml 的生物素标记的 myc-huBAFF, 与 50 μ l FACS 缓冲液或与在 5 μ g/ml ~ 200ng/ml 范围内 5 倍连续稀释的纯化的 huBAFF-R:Fc 在冰上预孵育 30 分钟。然后用这些溶液在冰上孵育 BJAB 细胞 (2.5×10^5 个细胞) 1 小时。用 FACS 缓冲液洗涤细胞, 并用 SAV-PE 染色。通过 FACS 分析细胞的 PE 荧光, 得到的数据绘制为重叠的柱形图。替代地, 将 200ng/ml 生物素标记的 -BAFF 与 2 倍连续稀释的 hBAFF-R:Fc,

hTACI:Fc,或 hLTBR:Fc 预孵育。按照上述方法染色细胞,以检测这些细胞与生物素标记的 BAFF 的结合。

[0388] 结果

[0389] 图 13A 显示在不同浓度 huBAFF-R:Fc 存在条件下由 huBAFF 结合 BJAB 所描绘的柱形图的重叠情况。用 "A" 标记的黑线代表 SAV-PE 结合的背景,用 "E" 标记的红线代表未经 BAFF-R:Fc 预孵育而直接用生物素标记 myc-huBAFF 染色后的细胞。生物素标记的 myc-huBAFF 与 5 μ g/ml huBAFF-R:Fc 预孵育后导致柱形图上移,几乎接近背景水平(曲线 B)。用 1 μ g/ml(曲线 C)或 200ng/ml(曲线 D) huBAFF-R-huIgG1 预孵育后导致与生物素标记 myc-huBAFF 的结合下降约 4 倍。

[0390] 图 13B 显示 BAFF-R:Fc 和 TACI:Fc 二者都能阻断 BAFF 与 BJAB 细胞的结合。用 LTBR:Fc 预孵育没有对 BAFF 的阻断作用。

[0391] 实施例 14

[0392] 该实施例描述了 BAFF-R: IgG1 融合蛋白能阻止 BAFF 诱导的 B 细胞增殖。

[0393] 材料和方法

[0394] 对于体外增殖试验,用 B 细胞回收柱(column(CollectTM Mouse B Cell Recovery Column; Cedarlane Laboratories Limited, Ontario, Canada.) 从 C57B16 小鼠(8 周龄)的脾分离小鼠 B 细胞。纯化后的 B 细胞进行 FACS 分析,发现 > 90% 的细胞为 B220 染色阳性。将 B 细胞在有或无 2mg/ml 山羊抗-人 m 链抗体(Sigma Chemical Co.) 存在的情况下,在 96-孔板(10⁵ 个细胞/孔,培养液为 50ml RPMI,其中添加了 10% FBS) 中孵育 72 小时,对照用 hIgG(10mg/ml) huBAFF-R:Fc(10mg/ml)。将样本以平行 3 份铺板,并使用建议浓度的 myc-hBAFF。再用 [³H] 胸苷(1 μ Ci/孔) 脉冲 18 小时标记细胞,然后收获细胞。通过液体闪烁计数检测 [³H] 胸苷的掺入量。将按照实施例 13 方法制备的人 BAFF-R:Fc 融合蛋白用于本试验,按照实施例 9 所述方法从 pJST618 转染的 293EBNA 细胞的培养上清液中制备该蛋白。收获所述上清,上样于蛋白 A 柱,用酸洗脱,然后进行中和,再进行凝胶层析,以获得没有聚集体的 huBAFF-R:Fc 蛋白。本试验中使用的 BAFF 表达于巴斯德毕赤氏酵母,通过阴离子交换层析和其后的凝胶过滤进行纯化。

[0395] 结果

[0396] 图 14 表明 BAFF 能够在有抗-m 抗体(正方形)和 hIgG(三角形)存在的情况下共刺激 B 细胞生长。BAFF 单独(菱形)不能诱导 B 细胞增殖。用 10mg/ml huBAFF-R:Fc(星形)孵育导致 BAFF-诱导的 B 细胞增殖被完全抑制。

[0397] 实施例 15

[0398] 材料和方法

[0399] 小鼠

[0400] 六周龄雌性 BALB/c 小鼠,获自 The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME),圈养于 Biogen Animal Facility。

[0401] 试剂和处理方案

[0402] 受体融合蛋白包含人 IgG 1 Fc 区域。小鼠(5 只/组)接受 200 μ g 融合蛋白(小鼠 BAFF-R:Fc 或人 BAFF-R:Fc) 2 次/周,共四周,ip(腹膜内注射)。对照小鼠接受多克隆人 IgG(PanglobulinTM) (hIgG), 200 μ g 2 次/周,共 4 周。最后一剂注射后 3 天,从眶下窦

(orbital sinus) 采血,然后让小鼠无痛苦死亡,再取脾、淋巴结及骨髓用于试验。

[0403] 流式细胞术分析

[0404] 宰杀时记录脾重。用低渗溶液溶解红细胞后,从脾和血液制备单细胞悬液。然后从腹股沟淋巴结和骨髓制备单细胞悬液。用抗 B220、IgM、IgD 和 CD21 的 mAbs 进行流式细胞计量术。脾 B 细胞亚群定名为滤泡状 B 细胞 (B220⁺, IgM^低, CD21^低), 边缘区 B 细胞 (B220⁺, IgM^高, CD21^高) 以及新生 B 细胞 (B220⁺, IgM^高, CD21⁻)。简单地说,取大约 1.5×10^6 个细胞,用 $10 \mu\text{g/ml}$ Fc 封闭液 (Pharminogen) 在冰上孵育 10 分钟封闭 Fc 受体,然后加入荧光标记的 mAbs,冰上孵育 30 分钟。洗涤细胞一次,然后重悬于 0.5% 多聚甲醛中。在 FACSCalibur 流式细胞仪 (Becton Dickinson, San Jose, CA) 上获得细胞荧光数据,并用 CellQuest 软件 (Becton Dickinson) 进行分析。

[0405] 结果

[0406] 在用小鼠或人 BAFF-R:Fc 作了为期 4 周的处理后,发现经小鼠和人 BAFF-R:Fc (图 15) 处理后的小鼠与用作对照的用人 IgG- 处理后的小鼠相比,脾重明显减轻。发现由于脾 B 细胞数目的减少而引发了脾细胞样结构 (splenic cellularity) 的明显衰减。经小鼠和人 BAFF-R:Fc- 处理后的小鼠,体内总 B220⁺ 脾 B 细胞的平均数目分别为 1.8×10^6 和 2.6×10^6 个细胞,与经 HIgG- 处理的对照动物体内的 B 细胞数目相比明显减少,后者的平均数目为 19.8×10^6 个细胞 (图 16)。对脾 B 细胞不同亚群检测,即滤泡状 B 细胞亚群,边缘区 B 细胞亚群及新生 B 细胞亚群进行的检测表明,经 BAFF-R:Fc- 处理后的小鼠体内各亚群 B 细胞都减少 (表 2),而滤泡状及边缘区 B 细胞减少的程度最严重。

[0407] 表 2. BAFF-R:Fc 处理导致脾 B 细胞各亚群的细胞数目减少

[0408]

	脾 B 细胞亚群(10^6 个细胞 $\pm$ SD)		
	滤泡状 B 细胞	边缘区 B 细胞	新生 B 细胞
人 IgG	14.5 ± 2.4	1.1 ± 0.3	1.5 ± 0.2
mBAFF-R:Fc	0.7 ± 0.1	0.06 ± 0.02	0.4 ± 0.1
hBAFF-R:Fc	1.4 ± 0.5	0.05 ± 0.02	0.5 ± 0.2

[0409] 在第 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22 和 25 天时,小鼠接受 $200 \mu\text{g}$ HIgG, mBAFF-R:Fc 或 hBAFF-R:Fc。在第 28 天时宰杀小鼠,取脾用于 B 细胞亚群分析。

[0410] 对腹股沟淋巴结 (LN) 中所含 B220⁺ B 细胞百分比的测试表明:经小鼠和人 BAFF-R:Fc- 处理后的小鼠体内 B 细胞群细胞平均值大幅减少,分别为 $12.3\% \pm 1.4$ 和 $18.6\% \pm 1.3$,而对照用经 HIgG- 处理后的小鼠, B 细胞的平均值为 $30.8\% \pm 4.1$ (图 17)。当测试外周血淋巴细胞时也得到类似结果,经人 IgG- 处理后的小鼠体内淋巴细胞中 $42.5\% \pm 2.9$ 为 B 细胞,而经小鼠和人 BAFF-R:Fc- 处理后的小鼠中, B 细胞分别仅占淋巴细胞的 $21.2\% \pm 6.1$ 和 $8.3\% \pm 4.5$ (图 18)。

[0411] 在经 BAFF-R:Fc- 处理后的小鼠中,尽管新生 (未成熟) B 细胞和成熟 B 细胞都减少,但是骨髓中的 B 细胞前体仍保持不变 (数据未给出)。

[0412] 讨论

[0413] 这些结果表明：用溶性 BAFF-R 受体融合蛋白体内封闭 BAFF 可导致 B 细胞存活和 / 或成熟被抑制。

[0414] 这些结果还表明,在临床治疗 B- 细胞介导疾病方面 BAFF-R 融合蛋白作为治疗药物的潜在用途。上述疾病包括那些本质上是自身免疫的疾病,例如系统性红斑狼疮、重症肌无力,自身免疫溶血性贫血、自发性血小板减少性紫癜、抗 - 磷脂综合征、恰加斯氏病、格雷夫氏斯病、韦格内氏肉芽肿病、结节性多动脉炎以及急进性肾小球肾炎。所述治疗剂还可用于浆细胞疾病,例如多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、重链疾病、原发性或免疫细胞相关性淀粉样变以及 monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS)。肿瘤学治疗目标包括 B 细胞癌、白血病及淋巴瘤。

[0415] 实施例 16

[0416] 该实施例中,描述了所制备的起始批次 (initial panel) 的抗 BAFF-R 胞外结构域的小鼠单克隆抗体的特征。所有这些抗体都能识别 BAFF-R 的胞外结构域,这些抗体的亚组具有拮抗剂活性,因为它们能够阻止 BAFF 与 BAFF-R 间的结合。

[0417] 材料和方法：

[0418] 免疫 RBF 小鼠,并用 huBAFF-R:Fc 加强免疫。将取自免疫小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤 FL653 细胞株融合,通过标准杂交瘤技术制备杂交瘤所述 FL653 细胞株是 P3-X63-Ag8.653 的衍生物。

[0419] 对来自分泌抗 huBAFFR 胞外结构域的抗体的杂交瘤克隆的条件培养基进行 FACS 分析。如实施例 5 所述用表达全长 huBAFF-R 或 muBAFF-R 的质粒和表达 GFP 的质粒共转染 293EBNA 细胞,然后对该细胞进行 FACS 结合分析。将杂交瘤条件培养基用 FACS 缓冲液作 1 : 10 稀释,再与上述转染细胞一起在冰上孵育 30 分钟。用 FACS 缓冲液洗涤细胞,通过用 1 : 100 稀释的 - 小鼠 IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch) 冰上孵育 30 分钟,来显示是否发生结合。细胞再次用 FACS 缓冲液洗涤,然后重悬于含 1% 多聚甲醛的 FACS 缓冲液。通过 FACS 分析细胞上的 GFP 和 PE 荧光,得到的数据按照实施例 5 中的方法绘制成 4 象限的点状图。通过使 10ug/ml 经蛋白 A 纯化的抗 -BAFF-R mAb 或对照抗体 (MOP C21) 与 BJAB 细胞在冰上孵育 30 分钟来完成 BAFF 封闭试验。洗涤后,细胞在冰上用 250ng/ml 生物素标记的 huBAFF 孵育 30 分钟。再次洗涤细胞,通过用 SAV-PE 孵育来显示 BAFF 的结合。用 FACS 分析这些细胞上的 PE 荧光,得到的数据绘制成重叠的柱形图。

[0420] 结果：

[0421] 观察发现来自 10 个克隆的上清液能够结合 huBAFF-R 转染后的细胞

[0422] 图 19A 给出了上述 10 份抗 -BAFF-R 上清液中 4 份的 FACS 数据点状图。转染效率约为 50%,用上清液染色后几乎所有转染细胞都向右上象限移动。这 10 份上清液中无一与 muBAFFR 转染后的 293EBNA 细胞结合 (数据未给出)。取来自能结合 BAFF-R 的克隆的条件培养基,测试其能否阻止 BAFF 与 BJAB 细胞表面表达的 BAFF-R 之间的结合。BJAB 细胞在其表面表达 BAFFR,并表达不可检测量的 BCMA 或 TACI (Thompson et al. (2001) Science Aug 16)。上述 10 个杂交瘤中 2 个,克隆 2 和克隆 9,产生的单克隆抗体能够阻断 BAFF-R 与 BAFF 间的相互作用。(克隆 2 于 2001 年 9 月 6 日保藏于 ATCC,名称为 " anti-BAFF-R clone #2.1" (IgG 1- κ 同种型),指定的保藏号为 ATCC No. PTA3689;克隆 9 于 2001 年 9

月6日保藏于ATCC,名称为"anti-BAFF-R clone#9.1"(IgG 1- κ 同种型),指定的保藏号为ATCC No. PTA3688)。图19B中出现的柱形图的重叠表明用10 μ g/ml mAb 克隆2(曲线(b))或9(曲线(c))的预孵育可使BAFF结合曲线向左移动10倍以上,几乎移到了无BAFF对照的信号处(曲线(a))。最右侧的柱形(曲线(d))显示在结合BAFF之前细胞用对照mAb MOPC21、抗-BAFF-R非-封闭性mAbs孵育或无蛋白孵育时的迁移情况。

[0423] 实施例17:

[0424] 该实施例描述了hBAFF-R(2-71)-Fc中氨基酸取代的构建,序列和蛋白特征,所述氨基酸取代导致重组表达分子的溶解性提高。

[0425] 材料和方法:

[0426] 通过将带有粘性末端的双链寡核苷酸盒,连接入hBAFF-R(2-71):IgG 1基因相同的位点,从而导入目标残基的取代。

[0427] 按照实施例5方法使用Lipofectamine 2000,将表达质粒转染入293EBNA细胞。通过下述操作测定凝集(Aggregation)情况:转染后20小时取条件培养基进行非-还原性SDS-PAGE电泳,然后进行western转印,用HRP偶联的抗-人IgG(1:100, Jackson ImmunoResearch)检测,以及如实施例12所述进行ECL检测。

[0428] 取转染后20小时的条件培养基100 μ l,在1ml DMEM/10% FBS/0.2% NaA3中与200 ng 标签-huBAFF免疫共沉淀。样本在4 $^{\circ}$ C振摇30分钟,每试管加入30 μ l 蛋白A-Sepharose,继续再振摇30分钟。离心收集Sepharose微粒,用1ml冷PBS洗涤3次。将微粒重悬于2XSDS还原性缓冲液,然后上样至4-20%丙稀酰胺凝胶。按照上述方法western转印后,通过用1 μ g/ml HRP偶联抗-标签M2(Sigma)孵育滤膜然后进行ECL检测,来显示免疫共沉淀标签-BAFF的能力。

[0429] 结果:

[0430] 尽管人BAFF-R:Fc高度凝集,但是小鼠BAFF-R:Fc却仅仅是轻微(<10%)凝集。缺失分析表明可将BAFF-R整个C末端部分从A71至V36(富含半胱氨酸的结构域(CRD)中的最后一个Cys为C35)缺失而凝集反应不减弱。这说明hBAFFR的N-末端和CRD区域是形成凝集所必需的。

[0431] 首先,制备数种小鼠-人BAFF-R:Fc嵌合体,其中人BAFF-R序列的不同长度的N-末端被同源的小鼠序列所取代,分析这一改变对蛋白凝集的影响。这些嵌合体的氨基酸序列以及hBAFF-R:Fc中所发生的氨基酸取代见图20。该图给出了“野生型”人(图9)和小鼠BAFF-R:Fc二者的BAFF-R部分,并对应于全长人(图2d)(SEQ ID NO:5)或小鼠BAFF-R(图4b)(SEQ ID NO:9)进行了编号。图20还给出了hBAFFR-R:Fc克隆具有的取代,被取代的残基用粗体红色下划线的方式来显示。其中在人源序列转换点之前包括最开始的不超过21个的鼠源残基(Q21)的嵌合体,其凝集性能类似于野生型的hBAFF-R:Fc;但是至少包含最开始39个鼠源残基的嵌合体,其凝集性能大大下降,与mBAFF-R相近似。这两个嵌合的BAFF-R:Fc构建体之间另外9个不同的残基中,4个在鼠和人之间是不同的。这表明在C19和L27之间的人源残基中至少1个是凝集所必需的,所述C19至L27是CRD的一个内部区域。

[0432] 用标准技术制备这样的构建体及其亚型,即仅在下述4个位点用相对应的鼠源残基取代人源残基。当只将V20N P21Q A22T L27P这4个残基取代入人BAFFR部分时,这种修

饰后的 BAFF-R:Fc 不再凝集。通过免疫沉淀试验发现 hBAFF-R(V20N P21Q A22T L27P):Fc 仍能与 BAFF 相互作用。所述 V20N L27P 取代也可使 hBAFF-R:Fc 的凝集从约 90% 下降至约 10%。所述 P21Q L27P(40%), L27P(60%), V20N L27A(60%) 和 V20N L27S(60%) 取代会使 hBAFF-R:Fc 发生中等程度的凝集。下列取代无一减少蛋白凝集:

[0433] V20N P21Q A22T ;V20N A22T ;V20N P21Q ;V20N ;和 P21Q。

[0434] 实施例 18

[0435] 该实施例描述了 p21-Arc 是一种与 BAFF-R 结合的蛋白质。用于测定这种相互作用的方法是免疫沉淀。

[0436] 方法

[0437] 构建构建体,该构建体包含编码 BAFF-R 胞内结构域(BAFF-R-i. c. d.)的 cDNA 并在其 N-末端融合标签 myc,将该构建体亚克隆入 CH269 质粒 NheI(5') 和 XhoI(3') 位点。将该构建体转染 293E 细胞,72 小时后裂解细胞,裂解缓冲液包含 150mM NaCl,50mM Tris-HCl,pH7.5,1mM Na3VO4,50mM NaF 和 1% Brij 97。用台式离心机 10,000g5 分钟,澄清裂解物,用抗-myc 单克隆抗体 9E10 进行免疫沉淀。通过进行还原条件下 10-20% SDS-PAGE 电泳分离免疫沉淀物,然后转印到 PVDF 膜上。用 0.2% PonceauS 溶液使转印后的蛋白质显色,切取与 BAFF-R 特异性结合的蛋白区域,进行 N-末端氨基酸序列测序。用 PATTERN SEARCH 算法在非-冗余蛋白数据库(non-redundant protein data base)中进行多义检索(ambiguous search)。

[0438] 结果

[0439] 与 myc- 标记的 BAFFR 胞质结构域特异性结合的蛋白质之一的表观分子量为 21kDa。该蛋白明确地鉴定为 p21-Arc(肌动蛋白相关蛋白复合体)。P21-Arc 是名为 Arp2/3 复合体的 7 亚基蛋白的组分,该复合体参与肌动蛋白聚合(Welch et al.(1997)J. Cell Biol. 138 :357)。最近报道,一种肌动蛋白-结合蛋白,细丝蛋白,其能够与肿瘤坏死因子受体-结合因子(TRAF2)结合(Leonardi et al.(2000)J. Biol. Chem. 275 :271)。因此,用 BAFFR 胞质结构域共沉淀反应鉴定 p21-Arc 表明,p21-Arc 既可直接结合 BAFFR 也可通过与 TRAF2 和 / 或其他 TRAF 蛋白的结合(TRAF2 和 / 或其他 TRAF 与 BAFFR 结合)来间接结合 BAFFR。

[0440] 从上述对本发明具体实施方案的详细描述中,应该可以明显地看出本发明的独特之处。尽管本申请详细公开了具体的实施方案,但是给出实施例的目的仅仅是为了更好地说明,而决不对所附权利要求的范围构成任何限制。特别指出,本发明人预见到,在不脱离权利要求所限定的本发明的实质和范围的情况下,可对本发明作出各种替换、变化及改动。

[0001]

序列表

<110> 比奥根艾迪克 MA 公司 (Biogen Idec MA, Inc.)
杰弗里.S. 汤普森 (Thompson, Jeffrey S)
克里斯廷.M. 安布罗斯 (Ambrose, Christine M)

<120> 新的受体核酸及多肽

<130> BIOG-0086

<150> 60/233,152

<151> 2000-09-18

<150> 60/234,140

<151> 2000-09-21

<150> 60/268,499

<151> 2001-02-13

<150> 60/312,185

<151> 2001-08-14

<160> 37

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1201

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 1

```

gcacatgag gcgaggcccc cggagcctgc ggggcagggg cgcgccagcc cccacgccct    60
gcgtcccggc cgagtgcctc gacctgctgg tccgccactg cgtggcctgc gggctcctgc    120
gcacgccgcg gccgaaaccg ggtaaggggg acccacgggg cgcgcggcgc cggcagctgc    180
ggggagaacg gggccccgat cgccaggggc caggcagagc cccgaccccc gggggcgccg    240
agggctgaaa ggacctgtg ggcaaggcct ggagggggccc gcgatcaccg cgtggccctc    300
accgccgcct ctctccctcc ccttgtccac cggcccccg cgtccctcc cctccccggc    360
cagcctcgcc cccctccgcc cctccccgtc cccgtccctc cctccccctg gccccctggc    420
ctccctccct glccccctcc gaagcagccg gggccagcag ccctgcgccc aggacggcgc    480
tgcagccgca ggagtcggtg ggcgcggggg ccggcgaggc ggcgctgccc ctgcccgggc    540
tgctctttgg cggccccgcg ctgctggggc tggcactggt cctggcgctg gtcctggtgg    600
gtctggtgag ctggaggcgg cgacagcggc ggcttcgcgg cgcgtccctc gcagaggccc    660
ccgacggaga caaggacgcc ccagagcccc tggacaaggt catcattctg tctccgggaa    720
tctctgatgc cacagctcct gcctggcctc ctcttgggga agaccagga accacccac    780

```

[0002]

ctggccacag tgtccctgtg ccagccacag agctgggctc cactgaactg gtgaccacca	840
agacggccgg ccctgagcaa caatagcagg gagccggcag gaggtggccc ctgccctccc	900
tctggacccc cagccagggg cttggaaatc aaattcagct cttcactcca gcatgcacat	960
gccctctttc tgggaccagg ctaaccctgc agaagcacag acactacaga ccacagcatt	1020
cagcccccat ggagtttggg gtgcttgcc tttggcttcag acctcacat ctttgacagc	1080
ccitgaaggt ggtagcccag ctccctgttc tgtgccttca aaaggctggg gcactatgag	1140
taaaagaccg cttttaaaat ggggaaggca ccattaagcc aaaatgaatc tgaaaaaaga	1200
c	1201
<210> 2	
<211> 992	
<212> DNA	
<213> 人(Homo sapiens)	
<400> 2	
gtcgaccac gcgtccgccc acgcgtccgg tgcggcggcg tcggcaccat gaggcgaggg	60
ccccggagcc tgcggggcag ggacgcgcca gccccacgc cctgcgtccc ggccgagtgc	120
ttcgacctgc tggtcgcca ctgcgtggcc tgcgggctcc tgcgcacgcc gcggccgaaa	180
ccgggtaagg gggaccacg gggcgcgcg cgccggcagc tgcggggaga acggggcccc	240
gatcgccagg gcgcaggcag agccccgacc cccggggcg ccgagggtg aaaggacct	300
gtgggcaggg cctggagggg ccgcgatca ccgcgtggc ctcaccgcc cctctctccc	360
tccccctgtc caccgcccc cggtgttccc tcccccccc gccagcctc gccccctcc	420
gcccccccc gtccccgtc ctcccccccc tcggccccct ggcttccctc cctgtccct	480
cccgaagcag ccggggccag cagccctgcg ccagggacgg cgctgcagcc gcaggagtgc	540
gtgggcgcgg gggccggcga ggccggcgtg cccctgcccc ggctgtcttt tggcgcccc	600
gcgctgtgtg gcctggcact ggtcctggcg ctggtcctgg tgggtcttgt gagctggagg	660
cggcgacagc ggcggttcg cggcgcgtcc tccgcagagg cccccgacgg agacaaggac	720
gccccagagc ccctggacaa ggtcatcatt ctgtctccgg gaatctctga tgccacagct	780
cctgcctggc ctctccttg ggaagaccca ggaaccaccc cacctggcca cagtgtccct	840
gtgccagcca cagagctggg ctccactgaa ctggtgacca ccaagacggc cggccctgag	900
caacaatagc agggagccgg caggaggtgg cccctgccct cctcttgga cccagccag	960
gggcttgga atcaaatca gctcttact cc	992
<210> 3	
<211> 906	

[0003]

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 3

```

ggcgcgccgc accatgaggc gagggccccc gagcctgcgg ggcagggacg cgccagcccc    60
cacgccctgc gtcccggccg agtgcttcga cctgctggtc cgccactgcg tggcctgcgg    120
gctcctgcgc acgccgcggc cgaaaccggc agccggggcc agcagccctg cgcccaggac    180
ggcgctgcag ccgcaggagt cgggtggcgc gggggccggc gaggcggcgc tggccctgcc    240
cgggctgctc tttggcgcgc ccgcgctgct gggcctggca ctggtcctgg cgctggctct    300
ggtgggtctg gtgagctgga ggcggcgaca gcggcggtt cgcgcgcggt cctccgcaga    360
ggcccccgac ggagacaagg acgccccaga gcccctggac aaggtcatca ttctgtctcc    420
gggaatctct gatgccacag ctcccgctg gcctcctcct ggggaagacc caggaaccac    480
cccacctggc cacagtgtcc ctgtgccagc cacagagctg ggctccactg aactggtgac    540
caccaagacg gccggccctg agcaacaata gcaggagcc ggcaggaggt gggccctgcc    600
ctccctctgg acccccagcc aggggcttgg aaatcaaatt cagctcttca ctccagcatg    660
cacatgccct ctttctggga ccaggctaac cctgcagaag cacagacact acagaccaca    720
gcattcagcc cccatggagt ttggtgtgct tgcctttggc ttcagacctc accatctttg    780
acagcccttg aaggtggtag ccagctcct gtccctgtgc ctcaaaaagg ctggggcact    840
atgagtaaaa gaccgccttt aaaatgggga aggcaccatt aagccaaaat gaatctgaaa    900
aaagac                                           906

```

<210> 4

<211> 903

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 4

```

ggcgcgccgc accatgaggc gagggccccc gagcctgcgg ggcagggacg cgccagcccc    60
cacgccctgc gtcccggccg agtgcttcga cctgctggtc cgccactgcg tggcctgcgg    120
gctcctgcgc acgccgcggc cgaaaccggc cggggccagc agccctgcgc ccaggacggc    180
gctgcagccg caggagtcgg tgggcgcggg ggccggcgag gcggcgctgc ccctgcccgg    240
gctgctcttt ggccccccg cgctgctggg cctggcactg gtcctggcgc tggtcctggt    300
gggtctggtg agctggaggc ggcgacagcg gcggcttcgc ggcgcgtcct ccgcagaggc    360
ccccgacgga gacaaggacg cccagagacc cctggacaag gtcattcatt tgtctccggg    420
aatctctgat gccacagctc ctgcctggcc tcctcctggg gaagaccacg gaaccacccc    480

```

[0004]

```

acc1ggccac ag1gtccctg tgccagccac agagctgggc tccactgaac tggtagaccac 540
caagacggcc ggccctgagc aacaatagca gggagccggc aggagggtggc cctgcccctc 600
cctctggacc ccagccagg ggcttggaaa tcaaattcag ctcttcactc cagcatgcac 660
atgccctctt tctgggacca ggctaaccct gcagaagcac agacactaca gaccacagca 720
ttcagccccc atggagt1tg gtgtgcttgc ctttggcttc agacctcacc atctttgaca 780
gcccttgaag gtggtagccc agctcctgtt cctgtgcctt caaaaggctg gggcactatg 840
agtaaaagac cgctttttaa atggggaagg caccattaag ccaaaatgaa tctgaaaaaa 900
gac 903

```

<210> 5
 <211> 185
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)

<400> 5

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

[0005]

Thr Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln Gln
180 185

<210> 6

<211> 1187

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 6

```

gggcgcctac aatctcagct actcgggagg ctgaggcaga gaattgtttg aaccggggag      60
gcagagcttg cagtgagccg agatagcgcc attgcactcc agcctgggcg acagagcgag      120
actccgtctc aaaaaaaaaa aaagaaaaga aagggggggc ccaggcgagc tcggtccac      180
ccagcaggcg ggggcggggc agggcagagt gctcccccg cccccgcct cctccccgag      240
ggccccggag ccagctcag cctcagtcgc cgcagcttgt gcggcggcgt cggcaccatg      300
aggcgagggc cccggagcct gcggggcagg gacgcgccag cccccacgcc ctgcgtcccg      360
gccgagtgtc tcgacctgtc ggtccgccac tgcgtggcct gcgggctcct gcgcacgccg      420
cggccgaaac cggccggggc cagcagccct gcgcccagga cggcgctgca gccgcaggag      480
tcggtgggcg cggggggcgg cgaggcggcg ctgcccctgc ccgggctgtc ctttggcgcc      540
cccgcgtgc tgggcctggc actggctcct gcgctggctc tgggtgggct ggtgagctgg      600
aggcggcgac agcggcggtc tcgcggcgcg tcctccgcag agggccccga cggagacaag      660
gacgccccag agcccctgga caaggtcatc attctgtctc cgggaatctc tgatgccaca      720
gtcctgcct ggcctcctcc tggggaagac ccaggaacca cccacctgg ccacagtgtc      780
cctgtgccag ccacagagct gggctccact gaactgggtga ccaccaagac ggccggccct      840
gagcaacaat agcagggagc cggcaggagg tggccccctgc cctccctctg gacccccagc      900
caggggcttg gaaatcaaat tcagctcttc actccagcat gcacatgccc tctttctggg      960
accaggctaa cctgcagaa gcacagacac tacagaccac agcattcagc ccccatggag      1020
tttggtgtgc ttgcctttgg cttcagacct caccatcttt gacagccctt gaagggtgta      1080
gcccagctcc tgttcctgtg ccttcaaaag gctggggcac tatgagtaa agaccgcttt      1140
taaaatgggg aaggcaccat taagccaaaa tgaatctgaa aaaagac      1187

```

<210> 7

<211> 266

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 7

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

[0006]

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

<210> 8

<211> 1943

<212> DNA

<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 8

gaattcggca cgagcccaga ctcggaactg tccagctgc atgaggcggc gacatgggcg 60

ccaggagact ccgggtccga agccagagga gccgggacag ctcggtgccc acccagtgc 120

[0007]

atcagaccga gtgcttcgac cctctggiga gaaactgcgt gtcctgtgag ctcttcaca	180
cgccggacac tggacataca agcagcctgg agcctgggac agctctgag cctcaggagg	240
gctccgcgct gagacccgac gtggcgctgc tcgtcggcgc ccccgcactc ctgggactga	300
tactggcgct gaccctggig ggictagtag gtctggtag ctggaggtag cgtcaacagc	360
tcaggacggc ctccccagac acttcagaag gactccagca agagtcctg gaaaatgtct	420
ttgtaccctc ctcaaaaacc cctcatgcct cagctcctac ctggcctccg ctcaaagaag	480
atgcagacag cgccctgcca cgccacagcg tcccggtgcc cgccacagaa ctgggctcca	540
ccgagctggt gaccaccaag acagctggcc cagagcaata gcagcagtg aggctggaac	600
ccagggatct ctactgggct tgtggacttc acccaacagc ttgggaaaga acttggccct	660
tcagtgacgg agtcctttgc ctggggggcg aaccggcag aaccagacac tacaggccac	720
atgagatigc ttttgttta gctctgact tgagaacgtt ccatttctga gatggttttt	780
aagcctgtgt gccctcagat ggttggatag acttgagggt tgcataatta atctcttag	840
tgagtcggag actggaaact taatctcgtt ctaaaaattt tggattactg ggctggagg	900
atggctcagc agttcggttt gtgtgctgtt ctagccgagg actccagttg ttcagcttcc	960
cggaactcag atctggcagc ttaagaccac ctgtcactcc agcccttga acatccttgc	1020
ctccaaaggc accagcactc atttgctcta gagcacacac acacacacac acacacacac	1080
acacacacac acacacacat atgcatgcat gcacacttaa aaatgtcaaa attagcggct	1140
ggagaaattc atggtcaaca gcgcttactg tgattccaga ggatgagagt ttgattccca	1200
gaatgcactg cgggiggctc attactgagc ataactttt cttcagggga cctgatgcct	1260
ctggacttca tgggcatctg tattcacgtg cacatcctac acacacacac acacacacac	1320
acagacatac acacacacac actcttttac aaatgataaa atataagata ggcatggtgg	1380
tacacacctt taatcccaac atgggggaag caaaggcagg caggtaactg agttggaggc	1440
catcctggtc tacatagcaa gttccaggct aaccagagct aaatggtgag accaagctc	1500
aaaataatac tccccccca aaaaaaaaaa acttttaaat ttgtattttt ttcttttatt	1560
attatttttt atattaattt catggtgitt agaagtggia tacttagatg gtgactaaga	1620
ggaggtaaag ccatcaggac tgagccccta acatacaagg agaaagcaga gacaatgaac	1680
acgcccctct cctgctgtgt gccagctcig gaccaccagc cagagggcaa tcatcagatg	1740
tgggccctag aaccttcaga gccgaaagct aaatcaatct catttctttg taaagctatt	1800
tagccttagg tgttttgta cggatgata aaatggacta acacaggcac tatgagtaag	1860

[0008]

aagcttttct ttgagctggg aaaggtactg ttaaaccaaa attaatctga ataaaaaaag 1920
gctaagggga agacacttaa aaa 1943

<210> 9
<211> 175
<212> PRT
<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 9

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

<210> 10
<211> 184
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 10

Met Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro
1 5 10 15
Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys
20 25 30

[0009]

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

<210> 11
 <211> 963
 <212> DNA
 <213> 人(Homo sapiens)

<220>
 <221> sig-peptide
 <222> (1).. (63)
 <223> 编码信号肽

<220>
 <221> misc-feature
 <222> (64).. (66)
 <223> 导入限制性位点

<220>
 <221> misc-feature
 <222> (67).. (276)
 <223> 编码 BAFF-R 胞外区

<220>
 <221> misc-feature
 <222> (277).. (279)
 <223> 导入限制性位点

<220>
 <221> misc-feature
 <222> (280).. (960)

[0010]

<223> 编码人 IgG1 Fc

<400> 11

```

atggagacag acacactcct gttatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccactggt    60
gacgtcaggc gagggccccc gagcctgcgg ggccaggacg cgccagcccc caccacctgc    120
gtcccgcccg agtgcttcca cctgctggtc cgccactgct tggcctgcgg gctcctgcgc    180
acgccgcggc cgaaaccggc cggggccagc agccctgcgc ccaggacggc gctgcagccg    240
caggagtcgg tgggcgcggg ggccggcgag gcggcggtcg acaaaactca cacatgccca    300
ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc    360
aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt gaggcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc    420
cacgaagacc ctgaggtaaa gttaacttgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc    480
aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc    540
gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggctct caacaaagcc    600
ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag    660
gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggctag cctgacctgc    720
ctggtaaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg    780
gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ttggactccg acggctcctt ctctctctac    840
agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg    900
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tcccgggaaa    960
tga                                                                    963

```

<210> 12

<211> 320

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1)..(21)

<223> 信号序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> 由导入限制性位点的区域所编码

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (23)..(92)

<223> BAFF-R 的胞外结构域

<220>

[0011]

<221> MISC_FEATURE

<222> (93).. (93)

<223> 由导入限制性位点的区域所编码

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (94).. (320)

<223> 人 IgG1 Fc

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0012]

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

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

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

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

<210> 13

<211> 70

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 13

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

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

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

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

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 14

<211> 65

<212> PRT

<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 14

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

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

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

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

Leu
65

<210> 15

[0013]

<211> 73
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<220>
<221> VARIANT
<222> (1).. (1)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (2).. (2)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (5).. (5)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (6).. (6)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (7).. (7)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (10).. (10)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (12).. (12)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (15).. (15)
<223> 取代

<400> 15

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

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

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

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

[0014]

Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 16
<211> 73
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<220>
<221> VARIANT
<222> (1).. (1)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (2).. (2)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (10).. (10)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (12).. (12)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (15).. (15)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (16).. (16)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (17).. (17)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (20).. (20)
<223> 取代

<400> 16

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

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

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

[0015]

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

Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 17
<211> 73
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<220>
<221> VARIANT
<222> (1).. (1)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (2).. (2)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (5).. (5)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (6).. (6)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (7).. (7)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (10).. (10)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (12).. (12)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (15).. (15)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (16).. (16)
<223> 取代

<220>

[0016]

<221> VARIANT
<222> (17).. (17)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (20).. (20)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (22).. (22)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (23).. (23)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (24).. (24)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (29).. (29)
<223> 取代

<400> 17

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

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

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

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

Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 18
<211> 73
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<220>
<221> VARIANT
<222> (1).. (1)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT

[0017]

<222> (2).. (2)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (5).. (5)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (6).. (6)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (7).. (7)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (10).. (10)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (12).. (12)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (15).. (15)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (16).. (16)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (17).. (17)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (20).. (20)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (22).. (22)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (23).. (23)
<223> 取代

[0018]

<220>
<221> VARIANT
<222> (24).. (24)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (29).. (29)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (33).. (33)
<223> 取代

<400> 18

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

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

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

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

Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 19
<211> 70
<212> PRT
<213> 人 (Homo sapiens)

<220>
<221> VARIANT
<222> (22).. (22)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (23).. (23)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (24).. (24)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (29).. (29)
<223> 取代

<400> 19

[0019]

```

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

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

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

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

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65           70

```

```

<210> 20
<211> 70
<212> PRT
<213> 人 (Homo sapiens)

```

```

<220>
<221> VARIANT
<222> (22).. (22)
<223> 取代

```

```

<220>
<221> VARIANT
<222> (24).. (24)
<223> 取代

```

```

<220>
<221> VARIANT
<222> (29).. (29)
<223> 取代

```

```

<400> 20

```

```

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

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

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

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

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65           70

```

```

<210> 21
<211> 70
<212> PRT
<213> 人 (Homo sapiens)

```

[0020]

<220>
<221> VARIANT
<222> (22).. (22)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (23).. (23)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (29).. (29)
<223> 取代

<400> 21

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

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

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

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

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 22
<211> 70
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<220>
<221> VARIANT
<222> (22).. (22)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (29).. (29)
<223> 取代

<400> 22

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

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

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

[0021]

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

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 23
<211> 70
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<220>
<221> VARIANT
<222> (23).. (23)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (24).. (24)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (29).. (29)
<223> 取代

<400> 23

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

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

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

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

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 24
<211> 70
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<220>
<221> VARIANT
<222> (23).. (23)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (29).. (29)
<223> 取代

[0022]

<400> 24

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

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

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

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

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 25

<211> 70

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<220>

<221> VARIANT

<222> (29).. (29)

<223> 取代

<400> 25

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

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

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

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

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 26

<211> 70

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<220>

<221> VARIANT

<222> (22).. (22)

<223> 取代

<220>

<221> VARIANT

<222> (29).. (29)

[0023]

<223> 取代

<400> 26

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

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

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

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

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 27

<211> 70

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<220>

<221> VARIANT

<222> (22).. (22)

<223> 取代

<220>

<221> VARIANT

<222> (29).. (29)

<223> 取代

<400> 27

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

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

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

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

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 28

<211> 70

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<220>

<221> VARIANT

[0024]

<222> (22).. (22)

<223> 取代

<220>

<221> VARIANT

<222> (23).. (23)

<223> 取代

<220>

<221> VARIANT

<222> (24).. (24)

<223> 取代

<400> 28

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

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

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

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

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 29

<211> 70

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<220>

<221> VARIANT

<222> (22).. (22)

<223> 取代

<220>

<221> VARIANT

<222> (24).. (24)

<223> 取代

<400> 29

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

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

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

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

[0025]

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 30
<211> 70
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<220>
<221> VARIANT
<222> (22).. (22)
<223> 取代

<220>
<221> VARIANT
<222> (23).. (23)
<223> 取代

<400> 30

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

Pro Cys Asn Gln Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys Val
20 25 30
Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
35 40 45

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

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 31
<211> 70
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<220>
<221> VARIANT
<222> (23).. (23)
<223> 取代

<400> 31

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

Pro Cys Val Gln Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys Val
20 25 30
Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
35 40 45

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

[0026]

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 32
<211> 70
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<220>
<221> VARIANT
<222> (22).. (22)
<223> 取代

<400> 32

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

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

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

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

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 33
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸引物

<400> 33
ggccgagtgcttcgacctgc t 21

<210> 34
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸引物

<400> 34
ggtccgccac tgcgtggcct g 21

<210> 35
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

[0027]

<220>		
<223> 寡核苷酸引物		
<400> 35		
caccaagacg gccggccctg a		21
<210> 36		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 寡核苷酸引物		
<400> 36		
gggcgcctac aatctcagct a		21
<210> 37		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 寡核苷酸引物		
<400> 37		
ggcggaccag caggtcgaag cactc		25

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

图 1A JST576 cDNA 克隆的序列

```
1      GTCGACCCAC GCGTCCGCCC ACGCGTCCGG TCGGCGGGCG TCGGCACCAT
51     GAGGCGAGGG CCCCGGAGCC TCGGGGGCAG GGACGCGCCA GCGGGGACGC
101    CCTGCGTCCC GGCCGAGTGC TTCGACCTGC TGGTCCGCCA CTGCGTGGCC
151    TCGGGGCTCC TCGGCACGCC GCGGCCGAAA CCGGGTAAGG GGGACCCACG
201    GGGCGCGCGG CGCCGGCAGC TCGGGGAGAG ACGGGGCCCC GATCGCCAGG
251    GCGCAGGCAG AGCCCCGACC CCCGGGGGGCG CCGAGGGCTG AAAGGACCCT
301    GTGGGCAGGG CCTGGAGGGG CCCGCGATCA CCGCGTGGCC CTCACCGCCG
351    CCTCTCTCCC TCCCCTTGTC CACCGCCCCC CGGCTGTCCC TCCCCTCCCC
401    GGCCAGCCTC GCGGGGCTCC GCGGCTCCCC GTCCCGGCTC CTCCCTCCCC
451    TCGGCCCCCT GGCCTCCCTC CCTGTCCCCT CCCGAAGCAG CCGGGGCCAG
501    CAGCCCTGCG CCCAGGACGG CGCTGCAGCC GCAGGAGTCG GTGGGCGCGG
551    GGGCCGGCGA GCGGCGGCTG CCCCTGCCCC GGCTGCTCTT TGGCGCCCCC
601    GCGCTGCTGG GCCTGGCACT GGTCTTGCGG CTGGTCCTGG TGGGTCTGGT
651    GAGCTGGAGG CGGCGACAGC GCGGGCTTCG CGGCGCGTCC TCCGAGAGG
701    CCCCCGACGG AGACAAGGAC GCGCCAGAGC CCCTGGACAA GGTGATCATT
751    CTGTCTCCGG GAATCTCTGA TGCCACAGCT CCTGCCTGGC CTCCTCCTGG
801    GGAAGACCCA GGAACCACCC CACCTGGCCA CAGTGTCCCT GTGCCAGCCA
851    CAGAGCTGGG CTCCACTGAA CTGGTGACCA CCAAGACGGC CGGCCCTGAG
901    CAACAATAGC AGGGAGCCGG CAGGAGGTGG CCCCTGCCCT CCCTCTGGAC
951    CCCCAGCCAG GGGCTTGAA ATCAAATTCA GCTCTTCACT CC
```

图 1B EST AI250289 的序列

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

图 2A 用 GENSCAN 推测出的 JST576 的序列

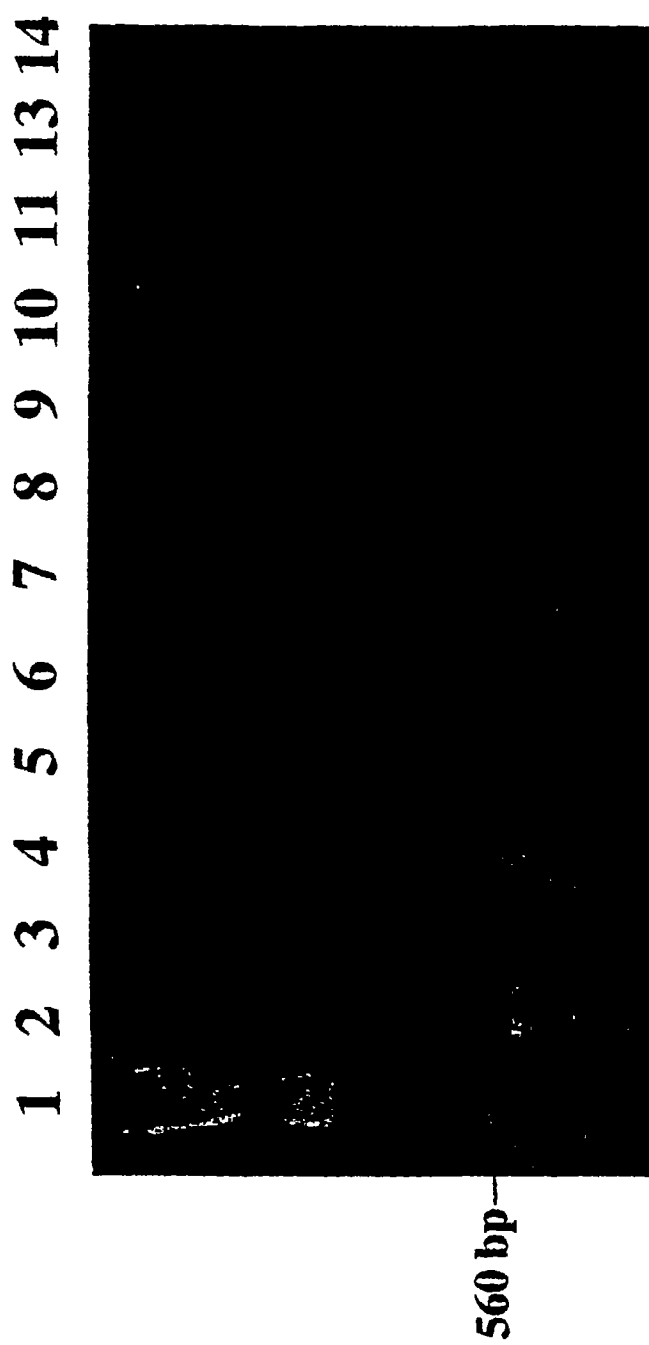


图 2B

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

图 2C 无内含子的 JST576 的序列

人 BAFF-R 氨基酸序列

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

图 2D

```

GGGCGCCTAC AATCTCAGCT ACTCGGGAGG CTGAGGCAGA GAATTGTTTG AACCCGGGAG
                                         *   T R E

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

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

CCAGCAGGCG GGGGCGGGGC AGGGCAGAGT GCTCCCCCGC CCCCCGCTT CCTCCCCGAG
P A G   G G G A   G Q S   A P P   A P R F   L P E

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

AGGCGAGGGC CCCGAGCCT GCGGGGCGAG GACGCGCCAG CCCCCACGCC CTGCGTCCCG
R R G   P R S L   R G R   D A P   A P T P   C V P

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

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

TCGTGGGCG CGGGGCGCG CGAGGCGGCG CTGCCCCTGC CCGGGCTGCT CTTTGCGGCC
S V G   A G A G   E A A   L P L   P G L L   F G A

CCCGCGCTGC TGGGCTGGC ACTGGTCTCG GCGCTGGTCC TGGTGGGTCT GGTGAGCTGG
P A L   L G L A   L V L   A L V   L V G L   V S W

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

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

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

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

GAGCAACAAT AGCAGGGAGC CGGCAGGAGG TGGCCCCTGC CCTCCCTCTG GACCCCCAGC
E Q Q   *

CAGGGGCTTG GAAATCAAAT TCAGCTCTTC ACTCCAGCAT GCACATGCCC TCTTTCTGGG
ACCAGGCTAA CCCTGCAGAA GCACAGACAC TACAGACCAC AGCATTGAGC CCCCATGGAG
TTTGGTGTGC TTGCCTTTGG CTTGAGACCT CACCATCTTT GACAGCCCTT GAAGGTGGTA
GCCCAGCTCC TGTTCTGTG CTTTCAAAAG GCTGGGGCAC TATGAGTAAA AGACCGCTTT
TAAAATGGGG AAGGCACCAT TAAGCCAAAA TGAATCTGAA AAAAGAC

```

图 3

```

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

```

图 4A 小鼠 BAFF-R 序列

MGARRLRVRSQRSRDSSVPTQCNQTECFDPLVRNCVSCEL
FHTPDTGHTSSLEPGTALQPQEGSALRPD VALLVGAPALLG
LILALTLVG LVSLVSWRWRQQLRTASPD TSEGVQQESLEN
VFVPSSETPHASAPTWPPLKEDADSALPRHSVPVPATELGS
TELVTTKTAGPEQ

图 4B 小鼠 BAFF-R 氨基酸序列

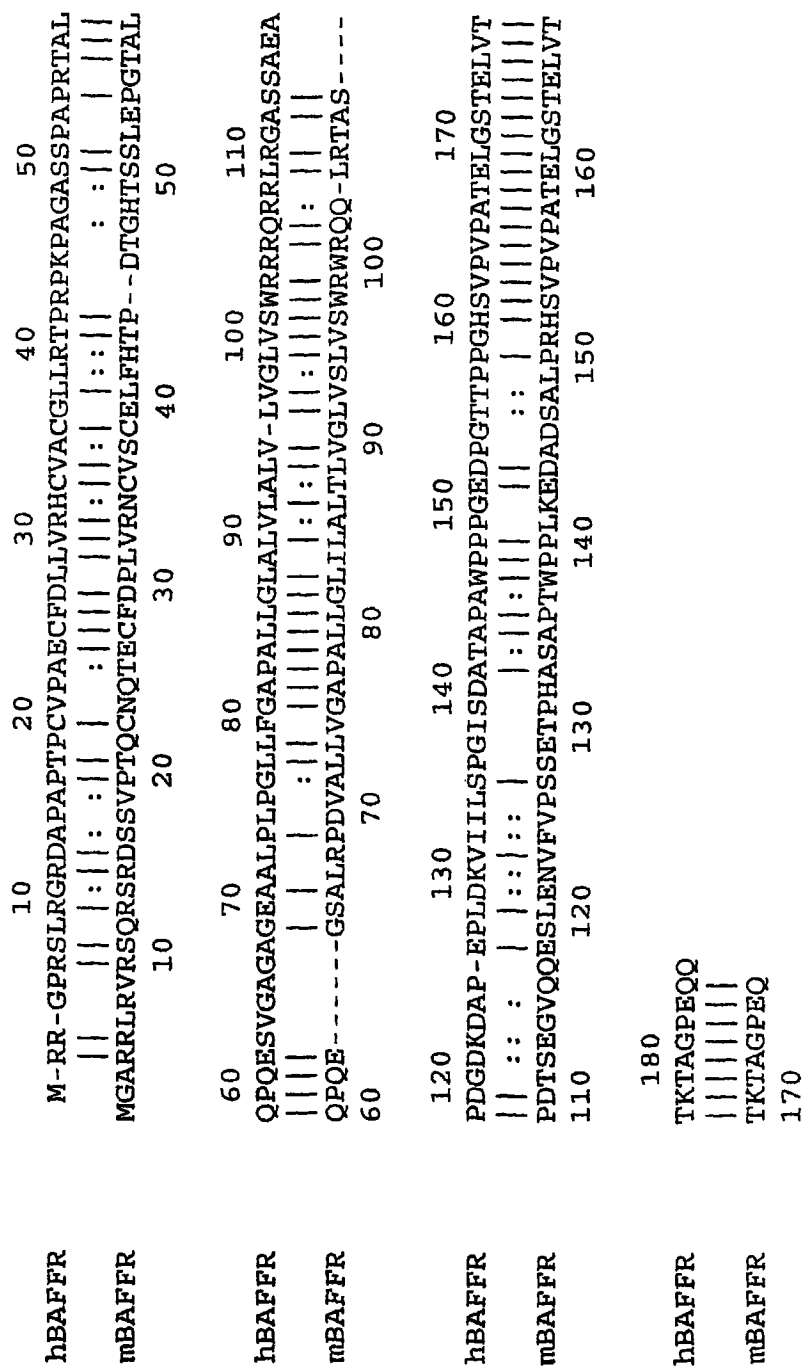


图 4C

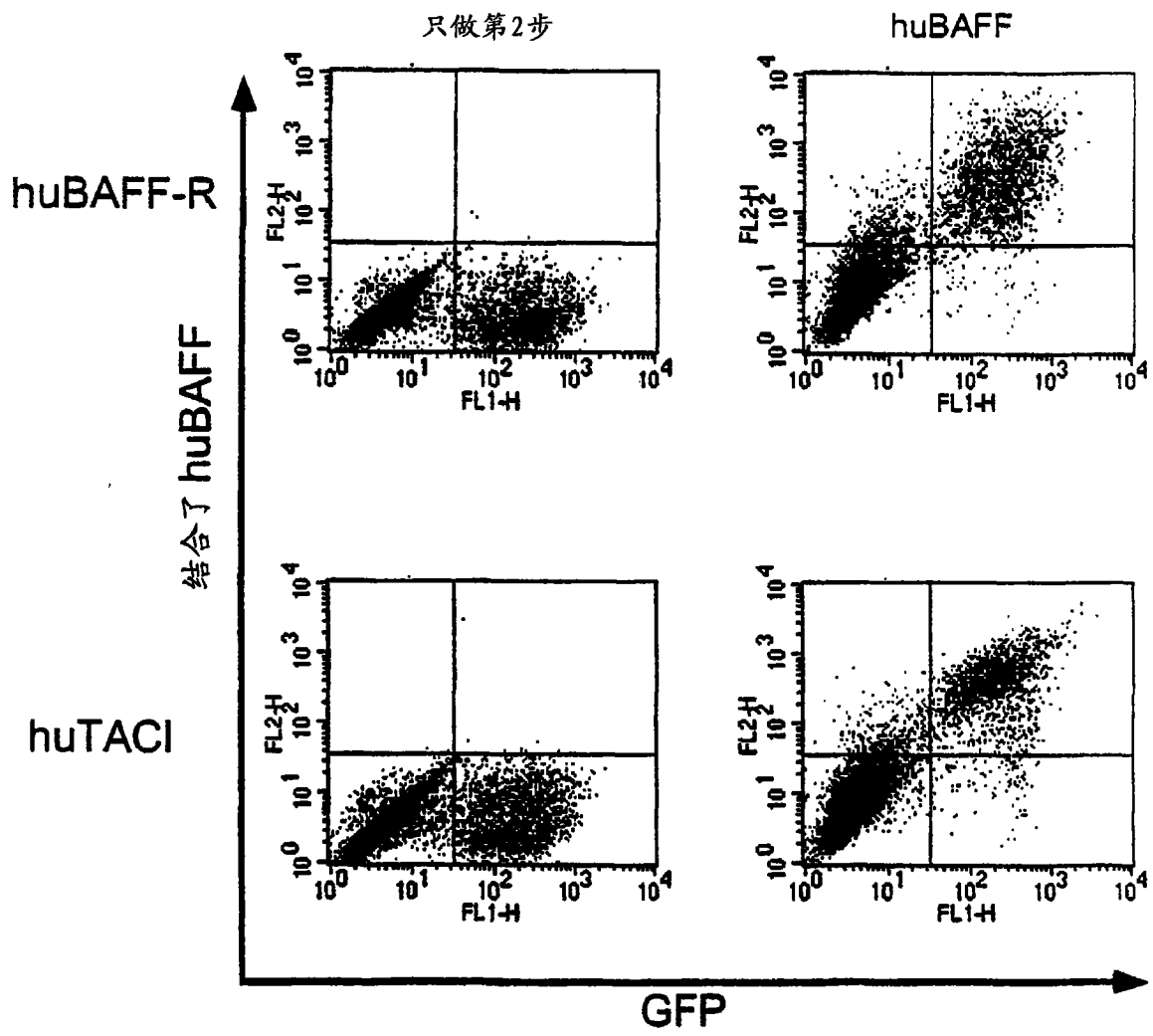


图 5

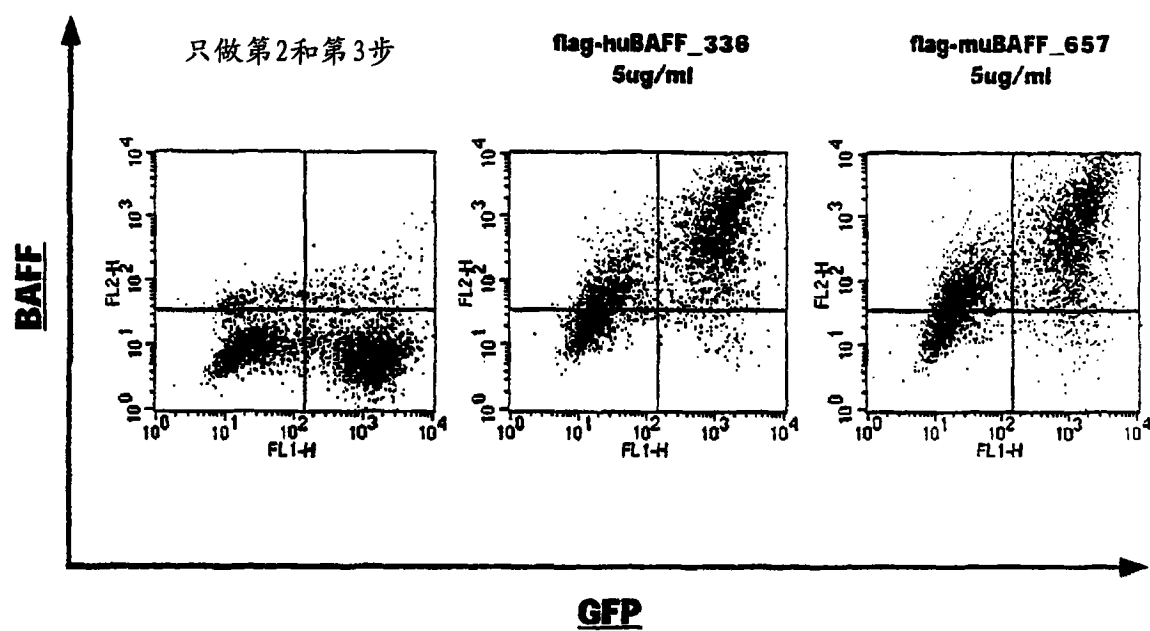


图 6

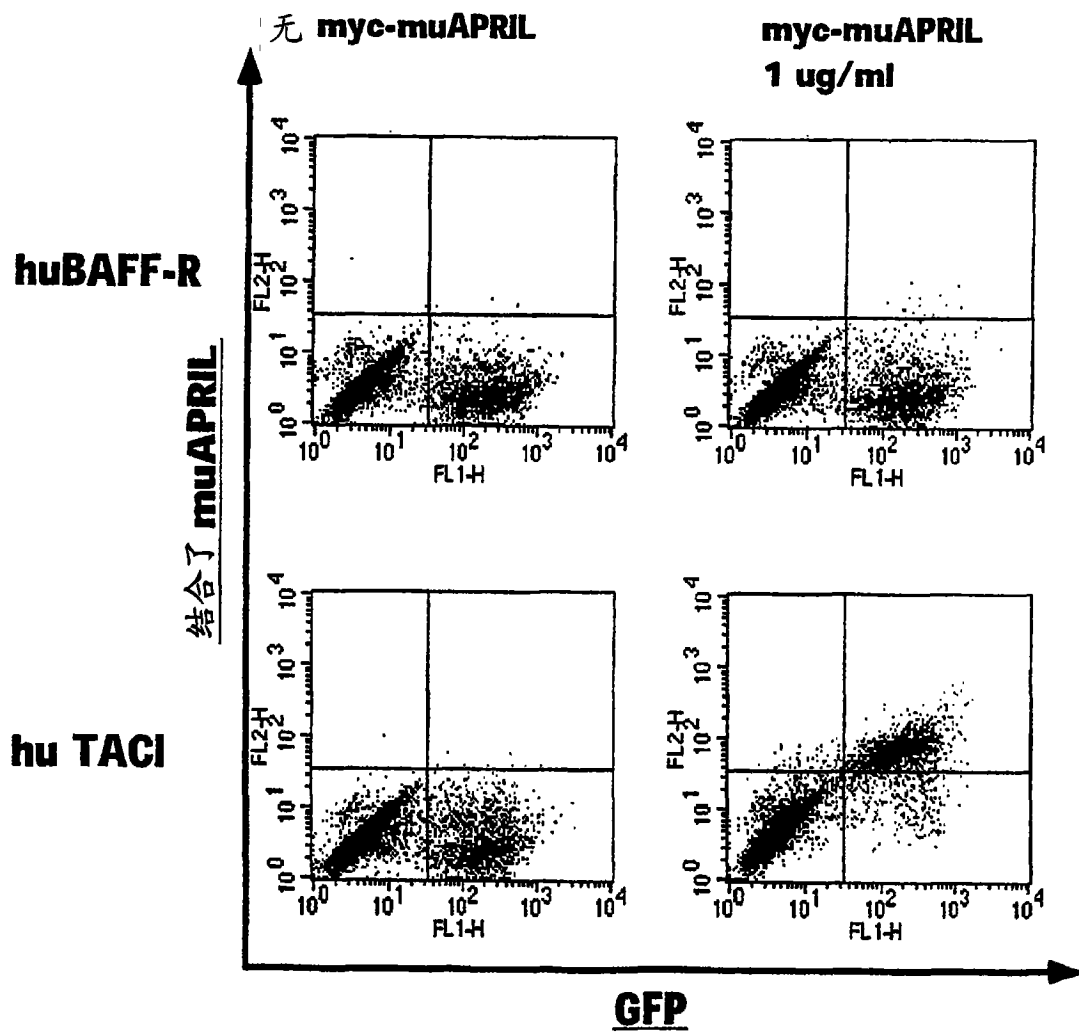


图 7

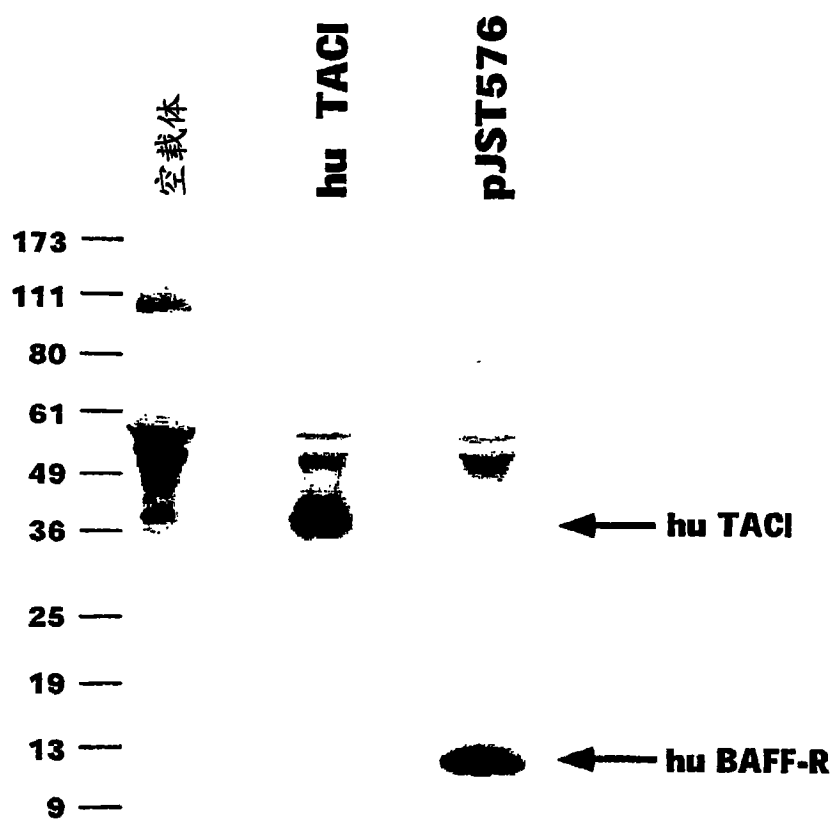


图 8

1 ATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCAGGTTCCACTGGT
M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

961 TGA
•

图 9

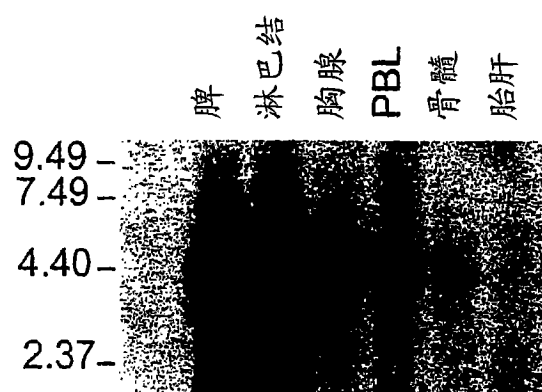


图 10A

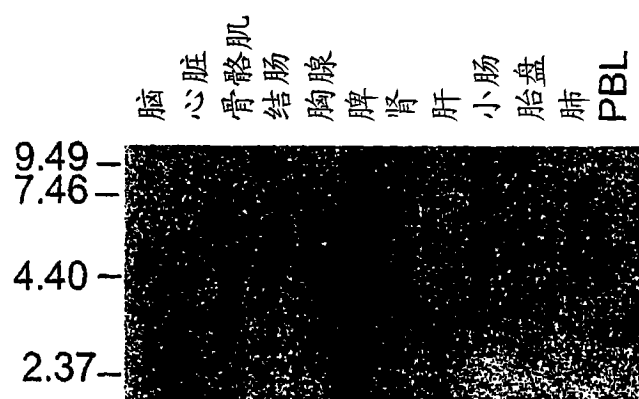


图 10B

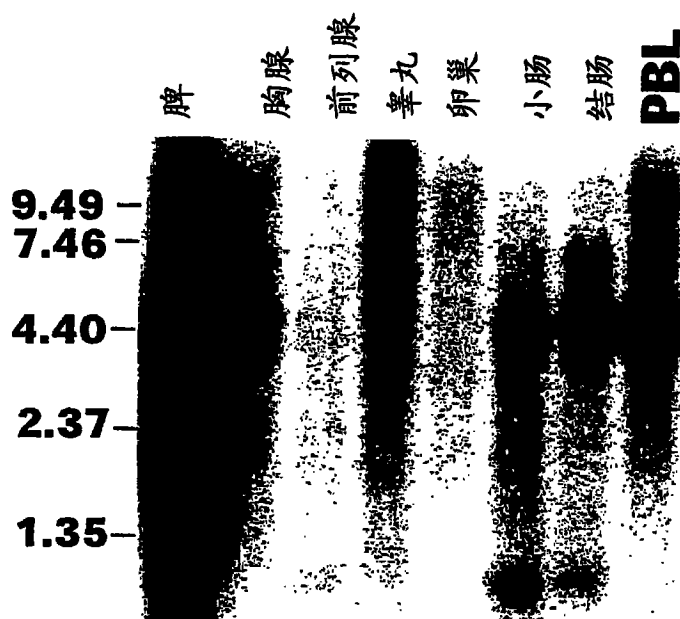


图 10C

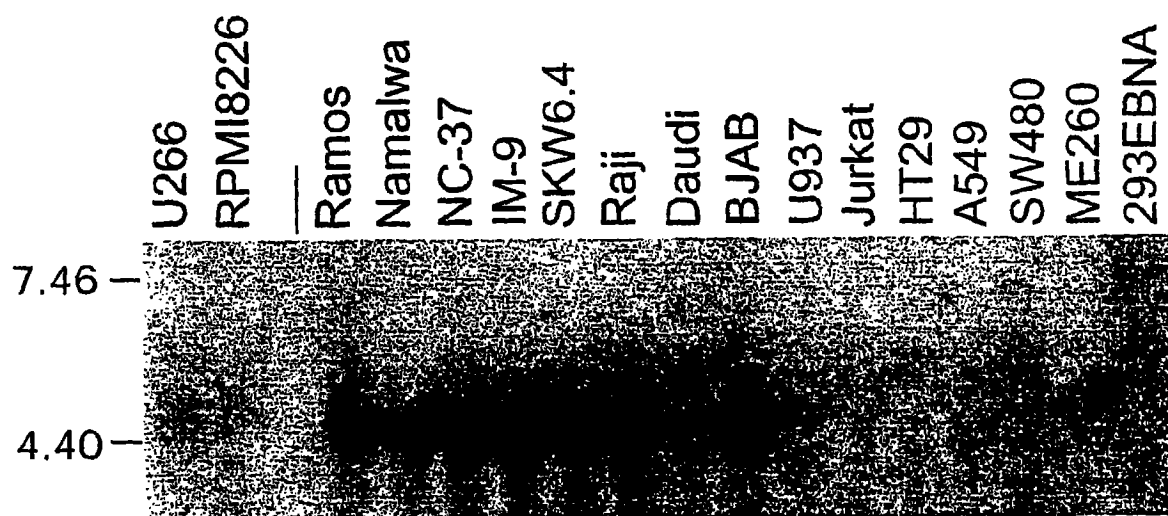


图 11

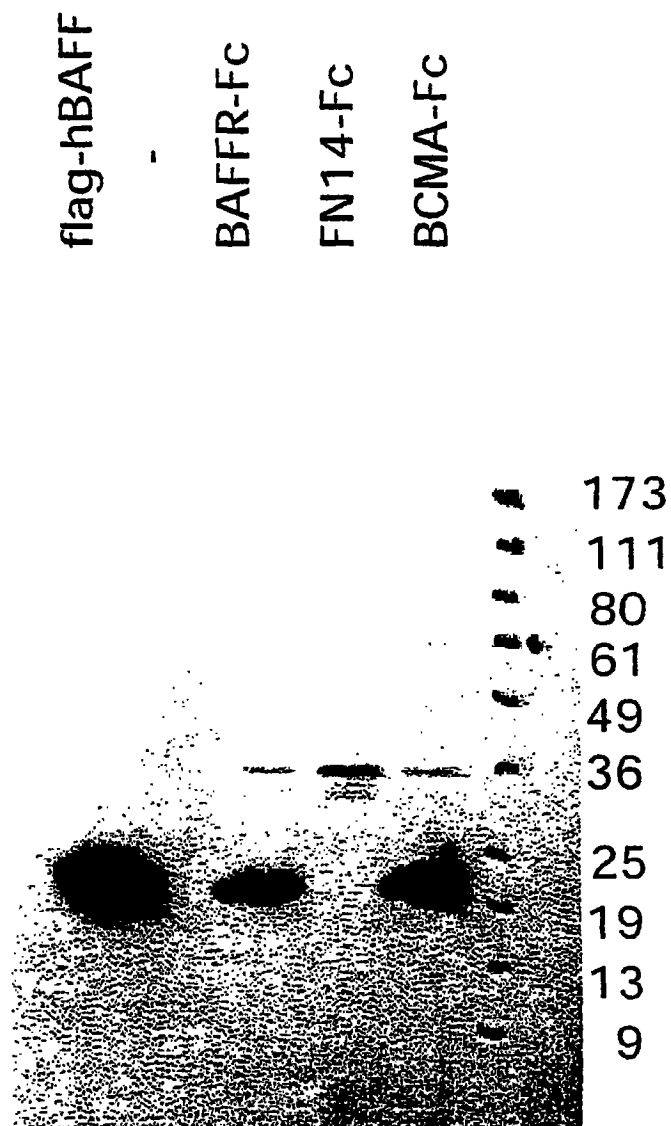


图 12

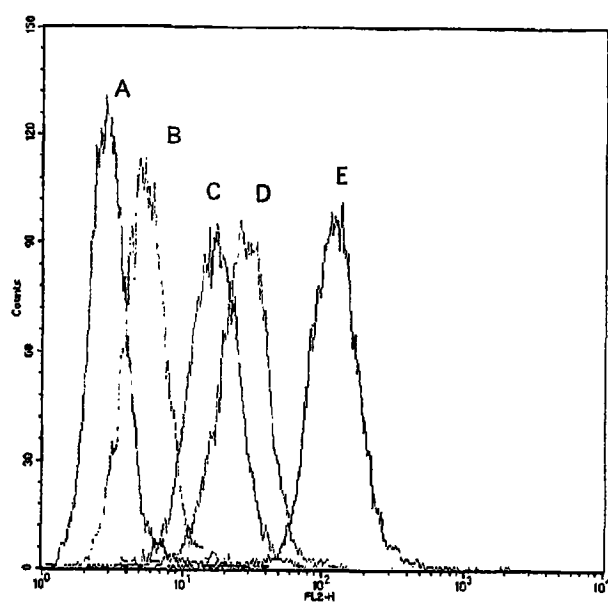


图 13A

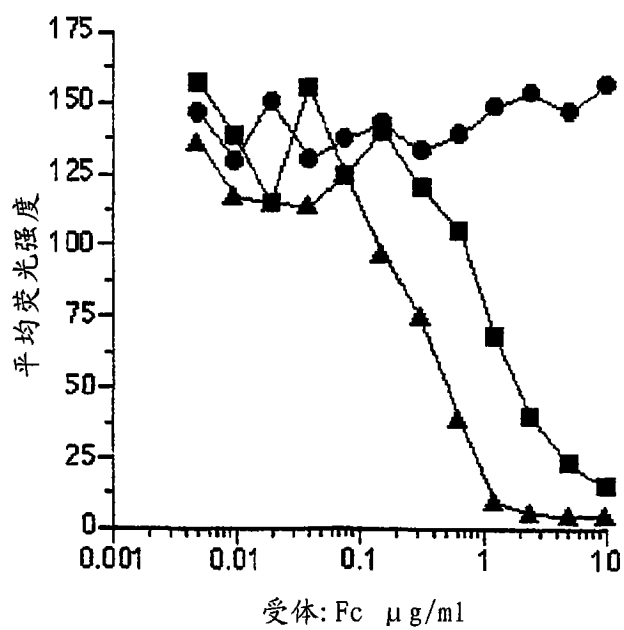


图 13B

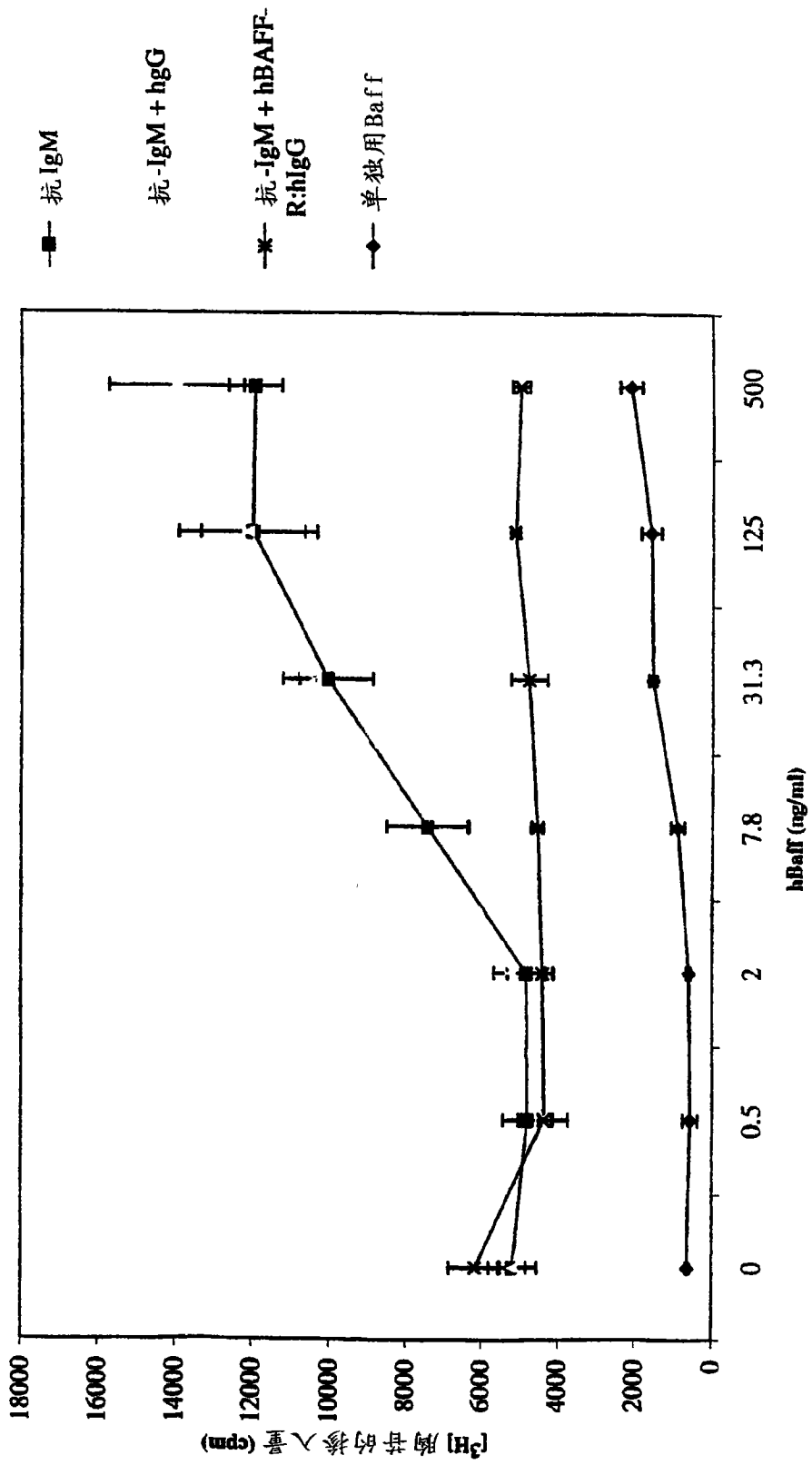
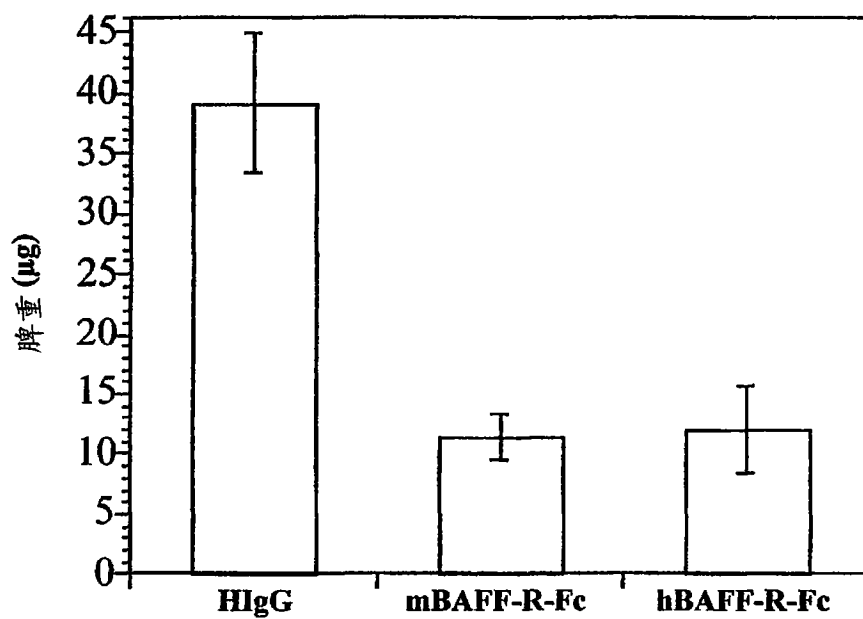


图 14

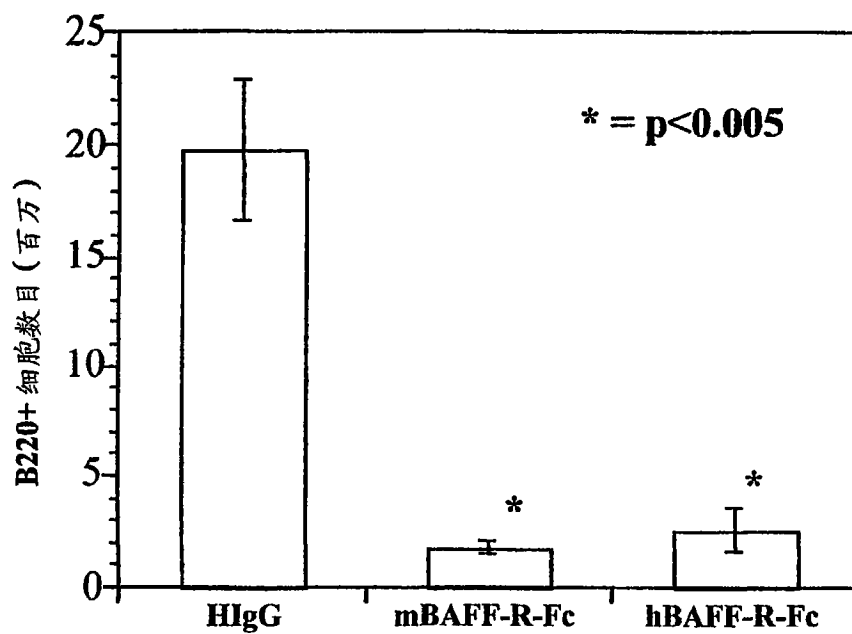
BAFF-R-Fc处理导致脾重减轻



在第1、4、8、11、15、18、22和25天时，小鼠接受
200 μg HIgG、mBAFF-R-Fc或hBAFF-R-Fc。
在第28天用安乐死方法处死小鼠取脾记录脾重。

图 15

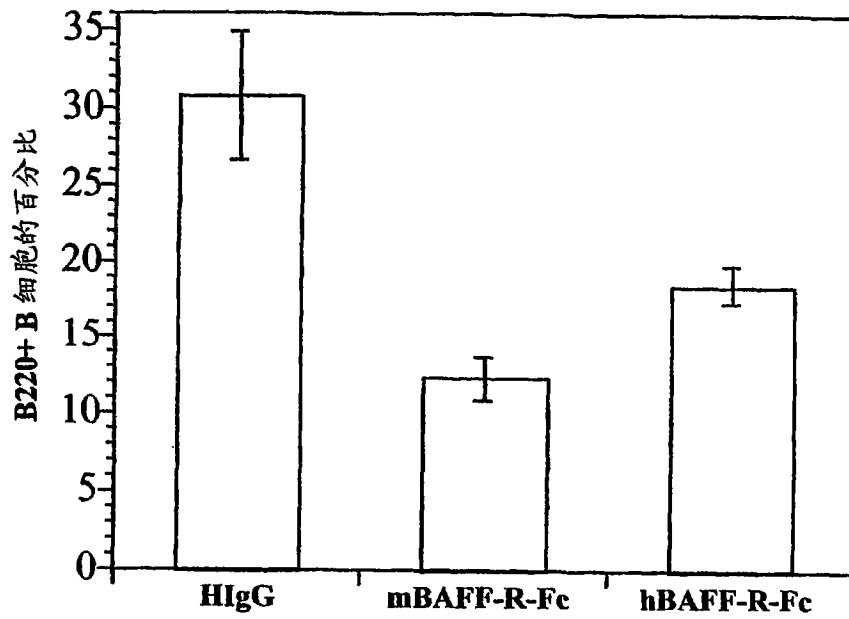
人和小鼠BAFF-R-Fc处理导致脾B220+B细胞数目减少



在第1、4、8、11、15、18、22和25天时，小鼠接受
200 μ g HIgG、mBAFF-R-Fc或hBAFF-R-Fc。
在第28天用安乐死方法处死小鼠，取脾分析B细胞数目

图 16

BAFF-R-Fc处理导致淋巴结B220+B细胞百分比下降

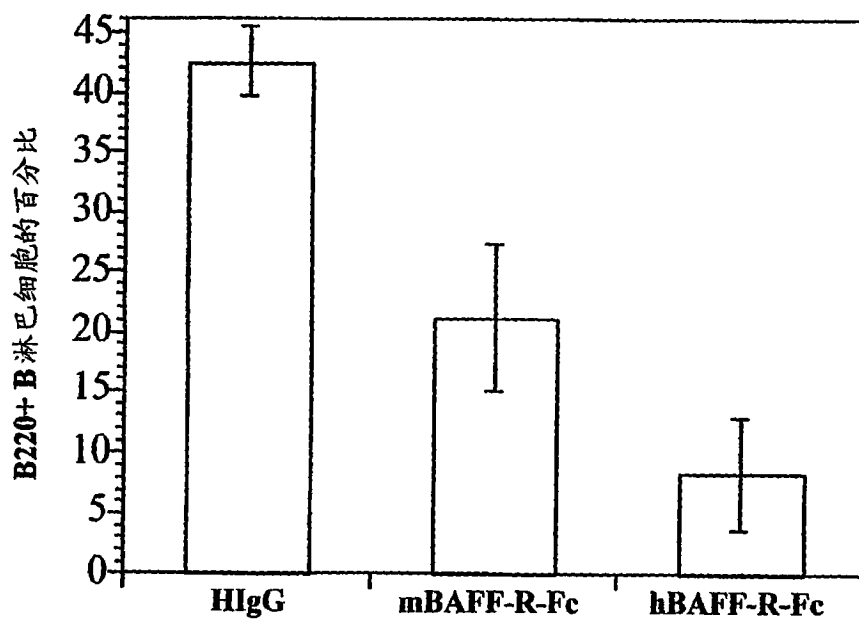


在第1、4、8、11、15、18、22和25天时，小鼠接受200 μ g HIgG、mBAFF-R-Fc或hBAFF-R-Fc。

在第28天用安乐死方法处死小鼠，收取淋巴结，分析B220+B细胞数目。

图 17

BAFF-R-Fc处理导致外周血B220+B淋巴细胞减少



在第1、4、8、11、15、18、22和25天时，小鼠接受
200 μ g HIgG、mBAFF-R-Fc或hBAFF-R-Fc。
在第28天宰杀前收集外周血，测定B220+淋巴细胞的百分比。

图 18

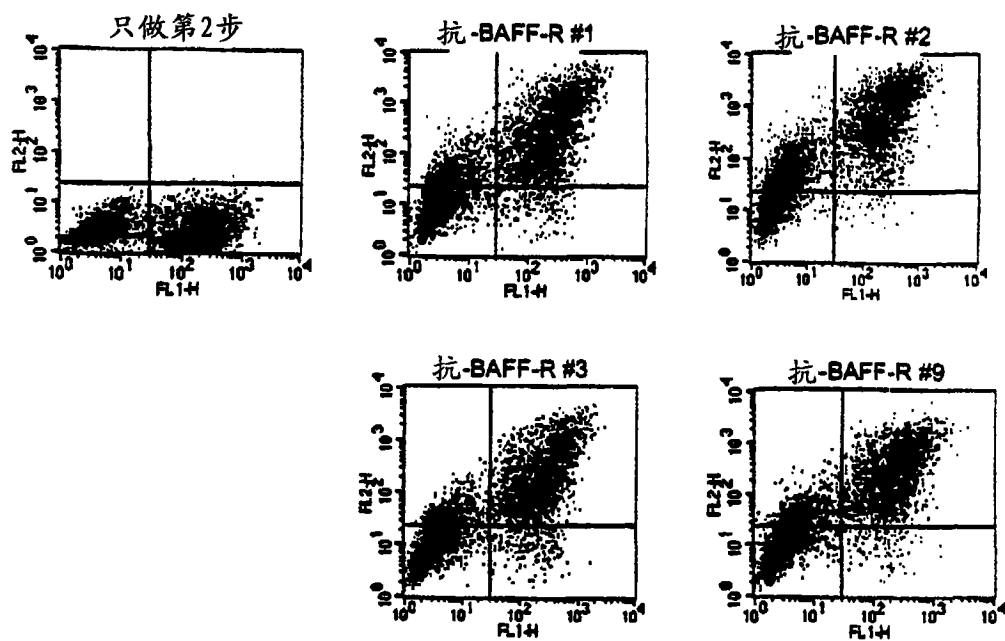


图 19A

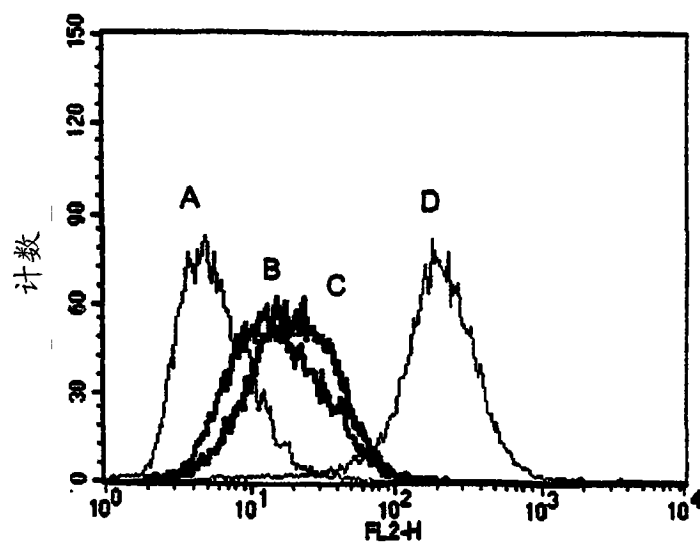


图 19B

[illegible]

20

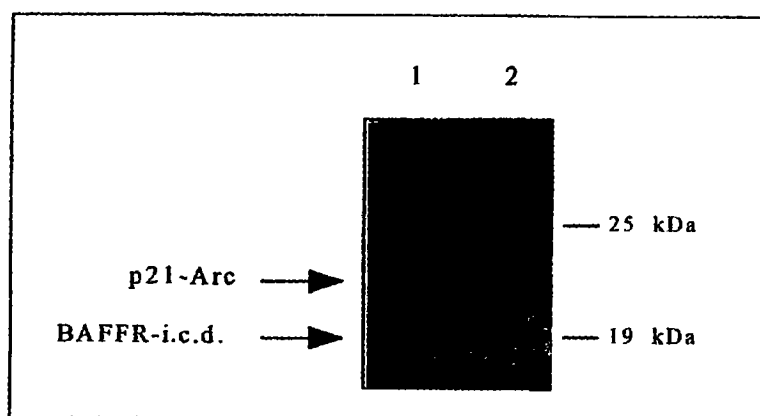


图 21

专利名称(译)	新的受体核酸及多肽		
公开(公告)号	CN1622995B	公开(公告)日	2013-09-04
申请号	CN01819084.7	申请日	2001-09-06
[标]申请(专利权)人(译)	拜奥根有限公司		
申请(专利权)人(译)	比奥根公司		
当前申请(专利权)人(译)	比奥根艾迪克MA公司		
[标]发明人	克里斯廷M安布罗斯 杰弗里S汤普森		
发明人	克里斯廷·M·安布罗斯 杰弗里·S·汤普森		
IPC分类号	C12N15/12 C12N15/62 C12N15/10 C07K14/715 C07K16/28 C07H21/04 C12Q1/68 A61K38/17 A61K48/00 G01N33/53 G01N33/68 G01N33/50 A61K A61K38/00 A61P7/06 A61P13/12 A61P19/02 A61P21/04 A61P25/28 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 C07H C07K C07K14/705 C07K16/18 C07K19/00 C12N C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12Q G01N G01N33/15		
CPC分类号	A61K38/00 C07K14/70578 C07K2319/02 C07K2319/30 G01N33/68 G01N2333/70578 A61K48/00 A61P13/12 A61P19/02 A61P21/04 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 C07H21/04 C07K14/7151 C07K16/2866 C07K16/2878 C07K2319/00 Y02A50/414 C07K14/715 C07K16/28 C12N15/1138 C12N15/63 G01N33/53		
审查员(译)	王启扬		
优先权	60/233152 2000-09-18 US 60/234140 2000-09-21 US 60/268499 2001-02-13 US 60/312185 2001-08-14 US		
其他公开文献	CN1622995A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了编码BAFF-R多肽的核酸，还公开了抗BAFF-R多肽的抗体，以及含这些物质的药物组合物。另外，本发明还提供了用本发明所述核酸、多肽、抗体以及药物组合物治疗致瘤性疾病及自身免疫疾病的方法。

