

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) BG

(11) 102967 A

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ
ЗА
ИЗОБРЕТЕНИЕ

6(51) C 12 N 15/12
C 07 K 14/47
C 12 N 15/62
C 07 K 16/18
A 61 K 38/16
G 01 N 33/50
C 12 Q 1/68
C 12 N 1/21
C 12 N 5/10
C 12 N 5/12
A 61 K 48/00

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 102967
(22) Заявено на 30.11.98
(24) Начало на действие
на патента от:

Приоритетни данни

(31) 18228 (32) 24.05.96 (33) US
23442 23.08.96 US

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 5 на 31.05.2000
(45) Отпечатано на
(46) Публикувано в бюлетин №
на
(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(71) Заявител(и):
BIOGEN INC., CAMBRIDGE, MA (US)

(72) Изобретател(и):
Michele Sanicola-Nadel, Winchester, MA
Joseph V. Bonventre, Wayland, MA
Catherine A. Hession, Hingham, MA
Takaharu Ichimura, Cambridge, MA
Henry Wei
Richard L. Cate, Newton, MA (US)

(74) Представител по индустриална
собственост:
Румяна Стефанова Слабова,
1124 София, ул. "Леонардо да Винчи" 3

(86) № и дата на PCT заявка:
PCT/US97/09303, 23.05.97

(87) № и дата на PCT публикация:
WO97/44460, 27.11.97

(54) МОДУЛАТОРИ НА ТЪКАННА РЕГЕНЕРАЦИЯ

(57) Изобретението се отнася до протеини, които се използват за ир-регулиране при наранени или регенериращи тъкани, както и до ДНК, кодираща тези протеини. Изобретението се отнася и до терапевтични състави, включващи съединенията, както и до методи за лечение.

43 претенции

BG 102967 A

МОДУЛАТОРИ НА ТЪКАННА РЕГЕНЕРАЦИЯ

ОБЛАСТ НА ТЕХНИКАТА

Изобретението се отнася до протеини, които се използват за up-регулиране при наранени или регенериращи тъкани, както и до ДНК кодираща тези протеини. Изобретението се отнася, освен това, и до терапевтични състави и методи на лечение, включващи тези съединения.

ПРЕДШЕСТВАЩО СЪСТОЯНИЕ НА ТЕХНИКАТА

По време на развитието, както и по време на зарастването на тъканите при увреждане, се осъществява динамично преמודелиране на тъканната архитектура.

Бъбрекът е в състояние на поправи разрушенията в епитела на проксималното каналче, посредством сложни серии от събития, включващи смърт на клетките, пролиферация на преживелите епителни клетки на каналчето, образуване на слабо диференциран регенериращ епител над оголената базална мембрана, и диференциране на регенериращият епител до образуване на напълно функционални епителни клетки на каналчето (Wallin et al., *Lab. Invest.* 66:474-484, 1992; Witzgall et al., *Mol. Cell. Biol.* 13:1933-1942, 1994; Ichimura et al., *Am. J. Physiol.* 269:F653-662, 1995; Thadhani et al., *N. Engl. J. Med.* 334:1448-1460, 1996). В процеса на зарастване взимат участие и растежни фактори като IGF, EGF, и HGF, както и молекула ICAM-1 за ендотелна клетъчна адхезия. Въпреки това още не са разбрали механизмите по които се възстановяват епителните клетки на каналчето.

За да се идентифицират молекулите включени в процеса на увреждане и заздравяване на епитела на каналчето, бяха анализирани разликите в мРНК популациите между наранени/регенериращи и нормални бъбреци чрез използване на представителен анализ на разликите (RDA). RDA е анализ основаващ се на PCR метода за изваждане, който води до желаните тъкани или клетъчно специфични cДНК фрагменти, чрез повтарящо се изваждане и амплифициране (Hubank and Schutz, *Nucl. Acids Res.* 22:5640-5648, 1994).

ТЕХНИЧЕСКА СЪЩНОСТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Изобретението най-общо се отнася до Свързани с Увреждане на Бъбреците Молекули (всяка от които оттук

нататък се нарича "KIM" (Kidney Injury-related Molecules), които са ир-регулирани в бъбречната тъкан след увреждане на бъбрека. KIM протеините и пептидите на изобретението, така както тяхните агонисти и антагонисти, и тяхните съответни, са полезни при многобройни терапевтични интервенции.

Изобретението осигурява пречистена и изолирана ДНК молекула притежаваща нуклеотидна последователност посочена в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:6. Изобретението включва, също така, и комплементарните вериги на тези последователности, ДНК молекули, които хибридуват при строги реакционни условия към гореспоменатите ДНК молекули, които, поради разпада на генетичния код, биха хибридували към които и да са дефинирани по-горе ДНК молекули. ДНК молекулите могат да са рекомбинантни и могат да са операционно свързани към експресионна контролна последователност.

Изобретението предоставя, освен това, вектор включващ пречистена и изолирана ДНК молекула притежаваща нуклеотидна последователност посочена в SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:7, или друга от дефинираните по-горе ДНК молекули. Векторът може да е биологично функционален плазмид или вирусен ДНК-ов вектор. Един вариант за изпълнение на изобретението предоставя прокариотни или еукариотни клетки-гостоприемници, стабилно трансформирани или трансфектирани от вектор включващ ДНК молекула от SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:6. При един друг вариант за изпълнение на изобретението се предоставя метод за продуциране на KIM

полипептиден продукт, кодиран от ДНК молекула, както е описано по-горе; методът включва култивиране при подходящи културални условия, прокариотни или еукариотни клетки гостоприемници, трансформирани или трансфектирани с ДНК молекулата по начин позволяващ експресията на ДНК молекулата, и получаване на полипептидния продукт на посочената експресия.

Пречистен и изолиран човешки КИМ протеин по същество лишен от други човешки протеини, е същността на изобретението, както и метод за продуциране на полипептидния продукт, притежаващ част от първичната структурна конформация и биологична активност на КИМ протеин. КИМ протеините на изобретението могат да притежават аминокиселинна последователност включваща SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:7, или варианти на SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:7, или пречистен и изолиран протеин кодиран от ДНК със SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:6. Тези протеини могат да се предоставят по същество лишени от други човешки протеини. Изобретението се отнася, освен това, до варианти на тези протеини, като например разтворими варианти или сляти протеини. КИМ слятите протеини, съгласно изобретението, включват имуноглобулин, токсин, съединения, които могат да се изобразят или радиоактивни нуклеотиди.

Изобретението се отнася, освен това, до специфично моноклонално антитяло към описаните по-горе КИМ протеини. Анти-КИМ антитялото може да е прикрепено към токсин, съединение способно да бъде изобразено или радиоактивен

нуклеотид. Става въпрос и за хибридомна клетъчна линия, продуцираща такова специфично антитяло.

В обхвата на изобретението се включват и фармацевтични състави. Фармацевтичен състав, съгласно изобретението, може да включва терапевтично ефективно количество от КІМ протеина или анти-КІМ антитяло, съгласно изобретението, заедно с фармацевтично приемлив носител.

В обхвата на изобретението се включват, освен това и методи за диагностика, като например установяване присъствието или причините за липсата на разграничаване на бъбречното увреждане чрез измерване на концентрацията на КІМ в урината, серума или седиментите в урината на пациенти, които рискуват или са в рисковата група да развият бъбречни заболявания.

Методите за лечение, съгласно изобретението включват третиране на пациентите с ефективни количества от КІМ, варианти на КІМ, аналози на КІМ, КІМ сляти протеини, КІМ агонисти, и антитела към КІМ или към КІМ лиганди. Други терапевтични съединения, съгласно изобретението, включват КІМ лиганди, анти-КІМ антитела, и сляти протеини на КІМ лигандите. Тези съединения могат да са полезни при терапевтичните методи, които или стимулират или инхибират клетъчните отговори, които зависят от функционирането на КІМ.

Други методи, съгласно изобретението, се отнасят до инхибиране растежа на КІМ-експресиращи туморни клетки чрез привеждане на клетките в контакт със слят протеин на КІМ лиганд и било то токсин или радиоактивен нуклеотид,

било то с анти-КИМ антитяло, конюгирано към токсин или към радионуклеотид. Подобно, растежът на туморни клетки, които експресират КИМ лиганди, може да се инхибира чрез поставяне на клетките в контакт със слям протеин на КИМ и било то токсин или радионуклеотид, било то с анти-КИМ лиганд антитяло, конюгиран с токсин или с радионуклеотид.

Изобретението включва, също така, методи на генна терапия. Те включват метод за лечение на пациент с бъбречни нарушения, метод за спомагане растежа на нова тъкан при пациент, и метод за спомагане преживяването на засегнатите от увреждане тъкани при пациент, включващ прилагане върху пациента на вектор включващ ДНК, която съдържа нуклеотидна последователност от SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:6.

Съединенията на изобретението са полезни за изобразяване на тъкани, било то *in vitro* или *in vivo*. Един такъв метод включва насочване на едно съединение, което може да се изобрази, към клетка експресираща протеин от SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, или SEQ ID NO:7, включващ привеждане на клетката в контакт било то с моноклонално антитяло, съгласно изобретението, или слям протеин, съдържащ протеин както е описано по-горе, слям със способно да бъде изобразено съединение. При *in vivo* методите, клетката е в пациента, а протеинът или моноклоналното антитяло се прилага върху пациента.

Изобретението включва и методи за диагностика, като например метод за идентифициране на увредените или регенериращи бъбречни клетки в субекта, включващ сравняване на степента на експресия или на SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2,

SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:6 в бъбречните клетки на субекта към контролна степен на експресия на последователността в контролни бъбречни клетки. Друг метод на изобретението включва идентифициране на регулацията на SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:6 в клетки, включващ привеждане на клетките в контакт с антисенс проба и измерване на хибридизацията на РНК в клетките.

Друг вариант за изпълнение на методите за диагностика на изобретението, включва установяване присъствието или концентрацията на молекула, съгласно изобретението или в урина, серум или в други телесни течности, или в седименти на урината или тъканни проби. Измереното ниво на свързани с увреждането молекули може да се свърже с присъствието, обхвата или причините за патологичен процес. Корелацията може да се използва за определяне ефикасността на режима на лечение.

КРАТКО ОПИСАНИЕ НА ФИГУРИТЕ

Фигура 1 е нуклеотидна последователност на клонирана сДНК 3-2 от плъх, с рамка на разчитане от 615 до 1535 на предпологаем протешн.

Фигура 2 е списък е списък на ДНК последователностите на клон 1-7 от плъх, на рамка за разчитане от 145 до 1065 на предпологаем протешн.

Фигура 3 е списък е списък на ДНК последователностите на клон 4-7 от плъх, на рамка за разчитане от 107 до 1822 на предпологаем протешн.

Фигура 4 е списък на cДНК и изведените аминокиселинни последователности от човешки клон H13-10-85, с предполагаема рамка на разчитане от 1 до 1002. Най-горната линия от списъка е cДНК последователността (SEQ ID NO:6), а най-долната е изведената аминокиселинна последователност (SEQ ID NO:7).

Фигура 5 е BESTFIT сравнение на нуклеотидната последователност на човешки клон H13-10-85 с клон 3-2 от плъх.

ПОДРОБНО ОПИСАНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

KIM гените се идентифицираха чрез анализиране на различията в експресията на иРНК между регенериращите и нормалните бъбреци, при използване на анализ на представителните разлики (RDA). RDA е метод, основан на PCR за изваждане и амплификация. cДНК репрезентацията на РНК от бъбрек на 48 часов постизсхемичен възрастен плъх се изважда от пробабата на нормален (симулиращ обработка) бъбрек на възрастен плъх. При тази процедура, последователностите, които са общи за двете проби, от постизсхемичния и нормалния бъбрек се отстраняват, като се остават тези последователности, които са значително експресирани единствено в увредената бъбречна тъкан. Такива гени кодират протеини, които могат да бъдат терапевтично полезни при бъбречни нарушения или се включват в процеса на увреждане. Получени са няколко клона, секвенирани са и са охарактеризирани. След това клоновете се изследват за тяхния модел на експресия по време на възстановяването на бъбрека,

развитието и тъканното разпределение чрез Northern анализ и in situ РНК хибридизация.

ИДЕНТИФИКАЦИОННИ НОМЕРА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТИТЕ

Нуклеотидните и аминокиселинните последователности, които се посочват в описанието, са посочени под следните идентификационни номера :

SEQ ID NO:1 - нуклеотидна последователност на 3-2 сДНК
инсърт от плъх

SEQ ID NO:2 - нуклеотидна последователност на 1-7 сДНК
инсърт от плъх

SEQ ID NO:3 - аминокиселинна последователност на KIM-1,
кодирана от 3-2 и 1-7 сДНК

SEQ ID NO:4 - нуклеотидна последователност на 4-7 сДНК
инсърт от плъх

SEQ ID NO:5 - аминокиселинна последователност кодирана от
4-7 сДНК инсърт

SEQ ID NO:6 - нуклеотидна последователност на човешка
сДНК клон H13-10-854-7 сДНК

ДЕФИНИЦИИ НА ТЕРМИНИТЕ

"KIM протеин", използван в настоящото като синоним на KIM, представлява протеин кодиран от mРНК, която селективно се регулира след увреждане на бъбрека. Една група от KIM протеини, представляващи интерес, включва тези кодирани от mРНК, която селективно се регулира по всяко време през седмицата следваща какъвто и да е инсулт, който води до увреждане на бъбречната тъкан. Примери за периоди от време, когато могат да се регулират такива процеси на

регулация включват 10 часа, 24 часа, 48 часа или 96 часа след инсулт. Примери за видовете инсулт включват тези, при които се стига до изсхемично, токсично или друг вид увреждане.

"KIM агонист" представлява молекула, която специфично може да предизвика клетъчен отговор, нормално предизвикан от взаимодействието на KIM с KIM лиганда. KIM агонист може да е вариант на KIM, или специфично антитяло към KIM, или разтворима форма на KIM лиганда.

"KIM антагонист" представлява молекула, която може специфично да се асоциира с KIM лиганд или KIM, като по този начин блокира, или иначе казано инхибира свързването на KIM към KIM лиганда. Антагонистичното свързване блокира или инхибира клетъчните отговори, които иначе биха били предизвикани от свързването на KIM лиганда с KIM или с KIM агониста. Примери за KIM антагонисти включват някои варианти на KIM, KIM сляти протеини и специфични антитела към KIM лиганда или KIM.

"KIM" лиганд е коя да е молекула, която нековалентно и специфично се свързва към KIM протеина. Такъв лиганд може да е протеин, пептид, стероид, антитяло, производно на аминокиселина, или друг тип молекула, в каквато и да форма, включително срещащи се в природата, получени чрез рекомбинантни техники, или синтетично получени по друг начин. KIM лигандата може да е под каквато и да форма, включително разтворима, свързана с мембрана, или част от слята структура с имуноглобулин, мастна киселина, или други части. KIM лигандата може да е интегрин. Свързана с мембрана KIM лиганда може да действа като рецептор, който

когато е свързан с или асоцииран към КІМ, предизвиква клетъчен отговор. При някои взаимодействия, КІМ може да се асоциира с повече от един КІМ лиганд, или да се асоциира с КІМ лиганд като част от комплекс от една или повече други молекули или фактори. В ситуации, при които и двете, КІМ както и КІМ лиганда, са свързани към клетъчните стени, КІМ може да асоциира и да реагира с КІМ лиганда, която е свързана с втора клетка. Когато се стигне до КІМ лигиране между молекули свързани към различни клетки, двете клетки могат да са еднакви или различни, с оглед на клетъчния тип или произход, фенотипното или метаболитното състояние, или тип или степен на клетъчен отговор (например, растеж, диференциация или апоптоза) към дадения стимул. "КІМ лигиране" се отнася до контакта и свързването на КІМ с КІМ лиганд.

Под "подреждане на последователностите" се разбира позиционирането на една последователност, било то нуклеотидна или аминокиселинна, с това на друга последователност, за да стане възможно сравняването на последователността със съответните участъци на едната с тези на другата. Пример за един метод на тази процедура се посочва в Neederleman et al., (J. Mol. Biol. 48:443-453, 1970). Методът може подходящо да се осъществи посредством компютърна програма, като Align program (DNAster, Inc.). Както ще бъде ясно за специалистите в областта, хомоложни или функционално еквивалентни последователности включват еквивалентно подреждане на цистеиновите остатъци в запазения цистеинов скелет, включително аминокиселинните инсерти или делеции, които променят линейното подреждане

на тези цистеини, но не нарушават материалната връзка в нагънатата структура на протешна. Следователно, вътрешните гупки и аминокиселинните инсерти в кандигат последователността се игнорират, с цел да се пресметне хомоложността на аминокиселинната последователност или идентичността между кандигат и сравнителната последователност. Една характеристика, която често се използва при установяването на хомоложност между протешните е подобие то на броя и локализацията на цистеиновите остатъци между единия и другия участък.

"Антисенс ДНК" се отнася до последователността на хромозомална ДНК, която се транскрибира.

"Антисенс проба" представлява проба, която съдържа най-малкото една част от антисенс ДНК за интересуващата ни част от нуклеинова киселина.

Под "клонирание" се разбира използването на *in vitro* рекомбинантни техники за инсертиране на определен ген или друга ДНК последователност в молекулата на вектора. С цел успешно да се клонира желания ген, трябва да се ползват методи за генериране на ДНК фрагменти, за да се свържат фрагментите към векторните молекули, и за да се подбере клон притежаващ гена мишена измежду клетките гостоприемници на реципиента.

Под "сДНК" се разбира комплементарна или копие на ДНК, продуцирана от матрица РНК под действието на РНК-зависима ДНК полимераза (обратна транскриптаза). Следователно "сДНК клон" означава двойна ДНК последователност комплементарна на интересуваща ни РНК молекула, пренасяна от клониращ вектор.

Под "сДНК библиотека" се разбира колекция от рекомбинантни ДНК молекули, съдържащи сДНК инсерти които всички заедно са представителни за mRNA молекулата присъстваща в един цял организъм или тъкан, в зависимост от източника на РНК матриците. Една такава сДНК библиотека може да се изготви чрез методи, известни на специалистите в областта, и описани, например, от Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, виж по-горе. Обикновено, РНК се изолира първо от клетките на организъм от който геном желаем да клонираме определен ген. Предпочетени за целите на настоящото изобретение са клетъчни линии от бозайници, и по-специално от човек. Алтернативно, РНК може да се изолира от туморна клетка, произхождаща от животински тумор, и за предпочитане от човешки тумор. По този начин може да се изготви библиотека от, например, човешки надбъбречен тумор, но може да се използва който и да е тумор.

Терминът "ДНК полиморфизъм", както се използва тук, се отнася до състоянието, при което две или повече различни нуклеотидни последователности могат да съществуват при един определен сайт в ДНК.

"Експресионен вектор" включва вектори, които са способни да експресират ДНК последователности, които са включени в тях, т.е. кодиращите последователности са операционно свързани към други последователности, способни да осъществят експресията. Подразбира се, въпреки че не винаги ясно се установява, че тези експресионни вектори трябва да са способни на репликация в организъма гостоприемник или чрез епизоми или като интегрална част от хромозомалната ДНК. Необходим, но не задължителен,

елемент на ефективната експресия на вектора е маркерна кодираща последователност, която е последователност, кодираща протешн, който води до фенотипни свойства (като например резистентност на тетрациклин) на клетките съдържащи протешна, който позволява тези клетки точно да бъдат идентифицирани. В обобщение, "експресионния вектор" дава функционална дефиниция, и която и да е ДНК последователност, която е в състояние да осъществи експресия на определен съдържащ се ДНК код се включва в този термин, както се прилага към определената последователност. Както е в настоящия случай, такива вектори често са под формата на плазмиди, така че "плазмидите" и "експресионните вектори" често се използват като взаимозаменяеми. Въпреки това, изобретението има претенциите да включва такива други форми на експресионни вектори, които имат еквивалентни функции, и които могат от време на време да са известни от предшестващото състояние на техниката.

Под "функционални производни" се разбира "фрагменти", "варианти", "аналози", или "химични производни" на молекула. Под "фрагмент" на молекула, като всеки антиген от настоящето изобретение, се разбира, че се отнася до всеки полипептиден комплект от молекули. Под "вариант" на такива молекули се разбира, че се отнася до естествено съществуващи в природата молекули, по същество подобни или на цялата молекула, или на неин фрагмент. Под "аналог" на молекула се разбира, че се отнася до несъществуващи естествено в природата молекули, по същество подобни или на цялата молекула, или на неин фрагмент.

Терминът "ген" се отнася до полинуклеотидна последователност, кодираща пептид.

Под "хомоложен" се разбира, когато се отнася до пептид или ДНК последователност, че първичната молекулярна структура (т.е. аминокиселинна или нуклеотидна последователност) на по същество всички молекули присъстващи във въпросния състав са идентични.

"Изолиран" се отнася до протеин от настоящето изобретение, или който и да е ген кодиращ такъв протеин, който по същество е лишен от други протеини или гени, съответно, или от други онечиствания, с които нормално може да се открие в природата, а като такъв съществува под форма, която не се открива в природата.

Терминът "маркер" се отнася до молекулярна част, която е в състояние да бъде открита, включително, като пример, без ограничения, радиоактивни изотопи, ензими, луминисцентни средства, и багрила.

Терминът "проба" се отнася до лиганд с известни качества, способен на селективно свързване към антилиганд мишена. Когато се прилага към нуклеинови киселини, терминът "проба" се отнася до верига на нуклеинова киселина притежаваща последователност от бази комплементарни на веригата мишена.

Под "рекомбинантни клетки мишени" се разбира клетки, които са трансформирани с вектори, конструирани чрез използване на техниките на рекомбинантната ДНК. Както е дефинирано тук, антиятлото или негова модификация, продуцирано от рекомбинантни клетки гостоприемници, е в следствие на трансформациите в толкова по-малки

количества, или по просто, с толкова по-малко от количествата, които могат да се определят, както биха били продуцирани от нетрансформиран гостоприемник.

Под "чист по същество" се разбира който и да е протеин от настоящето изобретение, или който и да е ген, кодиращ който и да е такъв протеин, който изцяло е лишен от други протеини или гени, съответно, или от други онечиствания с които нормално може да се открие в природата, и като такъв съществува под форма несрещаща се в природата.

Една молекула се нарича "подобна по същество" на друга молекула, когато аминокиселинната последователност и в двете молекули е изцяло същата, и когато и двете молекули притежават подобна биологична активност. Така, при положение, че две молекули притежават подобна активност, то те се считат като варианти, както се използва термина тук, даже когато едната молекула притежава допълнителни аминокиселинни остатъци, които не се откриват в другата, или когато аминокиселинната последователност не е идентична. Както се използва тук, за една молекула се казва, че е "химическо производно" на друга молекула, когато притежава допълнителни химически частици, които нормално не са част от молекулата. Такива частици могат да подобрят разтворимостта на молекулата, абсорбцията, биологичния полуживот, и т.н. Частиците могат, алтернативно, да намаляват токсичността на молекулата, да намалят силата или да елиминират някой нежелан ефект, т.н. Частици способни да медишират такива ефекти са описани, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16 th ed., Mack Publishing Co.

Под "вектор" се има предвид ДНК молекула, произлезла от плазмид или от бактериофаг, в която могат да се инсерират или клонират фрагменти от ДНК. Векторът съдържа един или повече уникални рестрикционни сайта и може да е способен на автономна репликация в определен гостоприемник или организъм носител, така че клонираната последователност да може да бъде репродуцирана.

СЪЕДИНЕНИЯ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Изобретението включва сДНК от SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 6, така както и последователности включващи последователността от SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 6, и производни на тези последователности. Изобретението включва, също така, вектори, липозоми и други носители, които включват тези последователности или тяхни производни. Изобретението включва освен това, протеини транскрибирани от SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 6, включително, но без да се ограничават до, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 7, както и тяхните производни и варианти.

Един вариант за осъществяване на изобретението включва разтворими варианти на КИМ протеин, който обикновено се синтезира като протеин асоцииран с мембраната, и който е up-регулиран след увреждане. При разтворимите варианти липсва най-малкото част от трансмембрания или интрамембрания участък от нативния КИМ протеин. При някои примери, при разтворимият вариант

липсва целия трансмембранен или интрамембранен участък от нативния КИМ протеин. Разтворимите варианти включват сляти протеини, особено тези, които включват производни на КИМ протеини, при които липсва поне една част от трансмембрания или интрамембрания участък от нативния КИМ протеин. Включват се всички типове сляти КИМ протеини, а особено тези, които инкорпорират his-tag, Ig-tag и тус-tag молекулярни форми. Тези сляти КИМ протеини могат да притежават характеристики, които имат терапевтични качества, като например увеличен полуживот, който се придава от Ig-tag. Включват се, също така, и сляти протеини, които инкорпорират участъци от избрани домени от КИМ протеина.

Вариантите могат да се различават от естествено съществуващия в природата КИМ протеин по аминокиселинната последователност или по начин, който не включва последователност, или по двете. Вариантите в аминокиселинната последователност се продуцират, когато една или повече аминокиселини от нормално срещания в природата КИМ протеин се заместят от друга нормално срещана в природата аминокиселина, производно на аминокиселина или ненативна аминокиселина. Предпочитаните варианти включват естествено срещан в природата КИМ протеин, или биологично активен фрагмент от естествено срещан в природата КИМ протеин, чиито последователности се различават от последователността на дивия тип по една или повече консервативни аминокиселинни замествания, които типично имат минимално влияние върху вторичната структура и хидрофобното естество на протеина или пептида.

Вариантите могат да притежават, също така, и последователности, които се различават по една или повече неконсервативни аминокиселини замествания, делеции или инсерции, които не разрушават биологичната активност на КИМ протеина. Консервативните замествания типично включват заместване на една аминокиселина с друга, притежаваща подобни характеристики, като например заместване в следните групи : валин, глицин; глицин, аланин; валин, изолевцин; аспарат, глутамат; аспаргин, глутамин; серин, треонин; лизин, аргини; и фенилаланин, тирозин. Неполярни (хидрофобни) аминокиселини включват аланин, левцин, изолевцин, валин, пролин, фенилаланин, триптофан и метионин. Полярните неутрални аминокиселини включват глицин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспаргин и глутамин. Положително заредените (основни) аминокиселини включват аргинин, лизин и хистидин. Отрицателно заредените (киселинни) аминокиселини включват аспарат и глутамат.

Други консервативни замествания могат да се вземат от голната таблица, като други са описани също от Dayhoff в Atlas of Protein Sequence and Structure (1988).

ТАБЛИЦА 1

КОНИРВАТИВНИ АМИНОКИСЕЛИННИ ЗАМЕСТВАНИЯ

за аминокиселина	код	заменена с коя да е от
аланин	A	D-Ala, Gly, beta-Ala, L-Cys, D-Cys
аргинин	R	D-Arg, Lys, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
аспарагин	N	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
аспартам	D	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
цистеин	C	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
глутамин	Q	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
глутамат	E	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
глицин	G	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Beta-Ala, Asp
изолевцин	I	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
левцин	L	D-Leu, Val, D-Val, Met, D-Met
лизин	K	D-Lys, Arg, D-Arg, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn

метионин	M	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val, Norleu
фенилаланин	F	D-Phe, Tyr, D-Thr, L- Dopa, His, D-His, Trp, D-Trp, Trans 3,4 или 5- фенилпролин, cis 3,4 или 5 фенилпролин
пролин	P	D-Pro, L-I- миоазолугин-4- карбоксилна киселина, D- или L-1- оксазолугин-4- карбоксилна киселина
серин	S	D-Ser, Thr, D-Thr, allo- Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), Val, D-Val
треонин	T	D-Thr, Ser, D-Ser, allo- Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), Val, D-Val
тирозин	Y	D-Tyr, Phe, D-Phe, L- Dopa, His, D-His
валин	V	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

Други варианти на изобретението са тези, с модификации които повишават стабилността на пептида. Такива варианти могат да съдържат, например, една или повече непептидни връзки (които заместват пептидните връзки) в пептидната последователност. Включват се, също така и : варианти, които включват варианти различни от естествено срещаните в природата L-аминокиселини, като D-аминокиселини или несрещани в природата или синтетични аминокиселини, като бета или гама аминокиселини и циклични варианти. Инкорпорирането на D- вместо L-аминокиселини в полипептида може да увеличи устойчивостта му към протеази. Виж например патент на САЩ 5 219 990.

Обикновено, заместванията, от които се очаква да индуцират промени във функционалните качества на КИМ полипептидите са тези, в които : (1) хидрофилен остатък, например серин или треонин, се замества с хидрофобен остатък, например левцин, изолевцин, фенилаланин, или аланин; (2) цистеинов остатък се замества с който и да е друг остатък; (3) остатък притежаващ електропозитивна странична верига, например лизин, аргинин или хистидин, се замества с остатък притежаващ електронегативен товар, например глутамат или аспартат; или (4) остатък притежаващ обемиста странична верига, например фенилаланин се замества с аминокиселина не притежаваща обемиста странична верига, например глицин.

Пептидът, съгласно изобретението, може също така да се модифицира чрез многообразни промени като инсерции, делеции и замествания, било то консервативни или неконсервативни, когато такива промени могат да осигурят

предимства при използването им. Варианти на снаждане специално се включват в изобретението.

При един друг вариант за изпълнение на изобретението, варианти с аминокиселинни замествания, които са по-малко консервативни, могат също да дават желаните производни, например чрез причиняване на промяна в заряда, конформационни и други биологически способности. Такива замествания включват, например, замесване на хидрофилен остатък с хидрофобен остатък, замесване на цистеина или пролина с друг остатък, замесване на остатък притежаващ къса странична верига с остатък притежаващ обемиста странична верига. Когато не могат предварително да се предвидят със сигурност резултатите от даденото замесване, производното може веднага да се изследва съгласно методите, описани в настоящето изобретение, за определяне наличието или отсъствието на желаните характеристики.

Варианти включени в обхвата на изобретението, включват протеини и пептиди с аминокиселинни последователности притежаващи най-малко осемдесет процента хомоложност с КІМ протеин. За предпочитане хомоложността на последователностите е най-малко деветдесет процента, или най-малко деветдесет и пет процента. С цел да се определи хомоложността, дължината на последователностите за сравнение обикновено трябва да е най-малко 8 аминокиселинни остатъка, обикновено най-малко 20 аминокиселинни остатъка. Варианти на съставите на изобретението включват, също така, който и да е протеин, който 1) притежава аминокиселинна последователност, която

поне в четиридесет процента е хомоложна на КІМ протеина от изобретението, и който 2) след като е приведен в оптимален вид на подреждане с последователността на КІМ (както е изобразено на фигура 5 за човешки и пълши КІМ-1) има поне 80% от цистеиновите си остатъци подредени срещу цистеините на КІМ протеина от изобретението.

Така както е възможно да се заместят заместители от скелета, възможно е също така да се заместят функционални групи, които са свързани със скелета с характеризиращи се с подобни качества. Първоначално заместването е консервативно, т.е. заместващата група е с приблизително същия размер, форма, хидрофобност и заряд, както изходната група. Модификации на последователностите, могат да включват, например, *in vivo* или *in vitro* създаване на химически производни на участъци от съществуващия в природата КІМ протеин, така както и промяна в ацетилирането, метилирането, фосфорилирането, карбоксилирането и гликолизата.

В изобретението се включват също така и агенти, които се свързват специфично към протеина (SEQ ID NO : 3 или 7). Тези агенти включват лиганди и антитела (включително моноклонални, едноверижни, двуверижни, Fab фрагменти, и други, било то нативни, човешки, хуманизирани, приматизирани, или химерни). Допълнителни описания на тези категории агенти могат да се намерят в РСТ заявка 95/16709, чието описание е включено тук за справка.

КОНКРЕТНИ ПРИМЕРИ ЗА ИЗПЪЛНЕНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

1. Генериране на РНК от изземични и нормални бърбrecи от възрастни плъх

Изземични увредени бърбrecи от плъх се получаваат както е описано от Witzgall et al., (J. Clin. Invest. 93:2175-2188, 1994). Накратко, бърбrecната артерия и вена от един бърбrec на възрастни Sprague-Dawley плъх се стягат за 40 минути и после отново се обливат. Взимат се наранените бърбrecи от плъховете на 24-ия час и на 48-ия час след обливането. Бърбrecи от наужким оперирани възрастни Sprague-Dawley плъхове също се взимат.

Общата РНК се приготвя от органи, на основата на протокол на Glisin et al., (Biochemistry 13:2633, 1974). Бързо, отделените органи се слагат веднага в GNC буфер (4 M гуанизин тиоцианат, 0,5% SDS, 25 mM натриев цитрат, 0,1% протимопенисел от Sigma) и се разрушаваат върху лед с политрон. Клетъчните отломки се отстраняват с нискооборотна клинична центрифуга и супернатантната течност се поставя върху възглавница от 5,7 M CsCl, 25 mM натриев цитрат, 1 mM EDTA. РНК се утаява през възглавницата в SW40Ti ротор при 22K за 15 часа. РНК отново се суспендира в стерилна третирана с DEPC вода, утаява се двукратно с 1/10 обем 3M натриев ацетат и 2,5 обема EtOH. Poly A+РНК се изолира чрез ползуване на комплект за mРНК пречистване (Pharmacia, catalog No. 27-9258-02).

2. Метод на анализ на представителна разлика (RDA) за изолиране на 1-7, 3-2 и 4-7 RDA фрагменти

Синтезира се двувърижна cДНК от научким оперирани бъбреци и от poly A+PHK от 48 часа след изземични бъбреци, при използване на BRL от Gibco "Superscript Choice™ System cDNA Synthesis Kit", каталожен номер No. 18090. Първата верига се синтезира чрез праймер от олиго dT и при използване на Superscript II™ обратна транскриптаза. Втората верига се генерира чрез използване на ДНК полимераза I от E. coli и РНаза H следвана от T4 ДНК полимераза при използване на препоръчаните от BRL условия.

RDA анализът се осъществява основно, както е описано от Hubank and Schatz (Nucleic Acid Research 22:5640-48, 1994). Бързо, cДНК от 48 часа след-изземичен бъбрек се смела с рестрикционен ензим Ddr II и се лигира към R-Bgl-12/24 олигонуклеотиди (виж справка за точната последователност). PCR амплификация (осъществена с Perkin-Elmer Taq полимераза и съответния PCR буфер) на cДНК лигирана към линкера се използва за генериране на първоначалното представяне. PCR продуктът се означава като "тестер ампликон". Същата процедура се използва за генериране на "грайвър ампликон" от cДНК от бъбрек на научким опериран плъх.

Хибридизацията на тестер и грайвър ампликоните, следвани от селективна амплификация се осъществява трикратно за генериране на Диференциален Продукт Едно (DP1), Две (DP2) и Три (DP3). Генерирането на DP1 продукта се осъществява както е описано от Hubank and Schatz (Nucleic Acid Research 22: 5640-48, 1994). DP2 и DP3 продуктите също се

генерират както е описано от Hubank and Schatz (виж по-горе), с изключение на това, че отношенията грайвър : тесстер се изменят до 5,333:1 за DP2 и до 40,000:1 за DP3.

RDA продуктите се клонират от DP3 във вектор за клониране pUC 18 : RDA продукт 1-7 (252 bp), когато се генерира при използване на отношение от 40,000:1, и продукт RDA 3-2 (445 bp) и 4-7 (483 bp), когато се генерира DP3 при използване на съотношение 4,000:1. Фрагментите от ДНК се субклонират чрез използване на Pharmacia Sureclone™ комплект (каталожен номер No. 27-9300-01) за ремонтване на краищата на PCR фрагментите с ензим на Klenow и за улесняване лигирането на тълните краища на фрагментите във вектор pUC18.

3. Northern анализ

Poly A+РНК (2,5 µg) от бъбрек на нормален възрастен плъх (привидно опериран), от бъбрек на възрастен 48 часа след изхемично увреждане, и от бъбрек на 18 дневен ембрион, се подлагат на електрофореза и Northern blotting (Cate, Cell 45-685, 1986) върху GeneScreen™ мембрана (Dupont).

Хибридизацията в PSB буфер (50 mM Tris 7,5, 1 M NaCl, 0,1% Na пирофосфат, 0,2% PVP, 0,2% Ficoll, 0,2% BSA, 1% SDS), съдържащ 10% декстран сулфат и 100 µg/ml tРНК, се осъществява при 65°C при използване на три различни проби : 1-7 RDA продукт, 3-2 RDA продукт и 4-7 RDA продукт. Всички те се бележат с радиоактивен изотоп, като се използва Pharmacia's "Ready to Go™" случаен комплект за маркуване на прајмер (каталожен номер No. 27-9251.01). RDA продукти 1-7,

3-2 и 4-7 хибридизира с mРНК-те присъстващи и в трите проби, но по-интензивно с mРНК-те в РНК пробите от 48 часа след изсхемичен бъбрек.

Northern блот анализ на тъкани от възрастен плъх показват, че 1-7 генът се експресира при много ниски нива в нормален бъбрек, тестиси, галак и бели дробове на възрастно животно. 3-2 генът се експресира в черния дроб, бъбреците, галака и мозъка. 4-7 генът се експресира в галака, бъбреците, белите дробове, тестисите, сърцето, мозъка, черния дроб и скелетната мускулатура. Присъствието на различни размери mРНК в някои тъкани в 1-7 и 3-2 блот означава, че първоначалният продукт на транскрипцията на 1-7 гена и на 3-2 гена може да претърпи променен сплайсинг и/или полиаденилация.

4. Изолиране на 3-2 и 4-7 cДНК клонове

Генерира се cДНК библиотека от 4 μg Poly A+РНК от 48 часа след-изсхемичен увреден бъбрек чрез използване на реагенти от BRL Superscript Choice™ System за cДНК синтез, и Stratagene™ Lambda ZapII комплект за клониране (каталожен номер No. 236201), съгласно протоколите препоръчани от производителя.

10^5 клона се скринират с 3-2 RDA продукт като проба (случайно маркиране на прајмера, както е описано по-горе). Подбират се осем позитивни клона, а четири се избират случайно за вторичен анализ за получаване на чисти фагови плаки. След третичен скрининг се изолират четири чисти фагови клона. Клонираните инсерти от фага се изолират чрез

процедурата на *in vivo* изрязване, съгласно Stratagene™ Lambda Zap II комплект. Най-големият инсерт, от приблизително 2,6 kb отбелязан като сДНК клон 3-2), се подлага на ДНК секвениране. Последователността на инсерта (SEQ ID No: 1) е показана на фигура 1. сДНК клон 3-2 (*E. coli* K-12, SOLR/p3-2#5-1) е депозирен като ATCC No. 98061. Последователността на сДНК клон 3-2 е идентична на тази на клон 1-7 сДНК (SEQ ID NO:2), с изключение на това, че нуклеотиди 136-605 от SEQ ID NO:1 представляват една инсерция. Следователно, SEQ ID NO:2 представлява слепен вариантна форма на SEQ ID NO:1. Клона от 1-7 (*E. coli* K-12, SOLR/p1-7#3-1) е депозирен като ATCC No. 98060.

10^5 клонове се скринират с 1-7 RDA продукт като проба (случайно радиомаркиране на праймера, както е описано по-горе). Подбират се осем позитивни клона, а четири се избират случайно за вторичен анализ за получаване на чисти фагови плаки. След третичен скрининг се изолират четири чисти фагови клона. Клонираните инсерти от фага се изолират чрез процедурата на *in vivo* изрязване, съгласно Stratagene™ Lambda Zap II комплект. Най-големият инсерт, от приблизително 2,0 kb (отбелязан като сДНК клон 1-7), се подлага на ДНК секвениране; последователността на инсерта (SEQ ID No: 2) е показана на фигура 2.

10^5 клона се скринират с 4-7 RDA продукт като проба (случайно маркиране на праймера, както е описано по-горе и се хибридуват в PBS при 65°C). Подбират се осем позитивни клона, а четири се избират случайно за вторичен анализ за получаване на чисти фагови плаки. След вторичния скрининг се изолират два чисти фагови клона. Клонираните инсерти от

фаза се изолират чрез процедурата на *in vivo* изрязване, съгласно Stratagene™ Lambda Zap II комплект. Най-големият инсерт, от приблизително 2,4 kb (отбелязан като сДНК клон 4-7), се подлага на ДНК секвениране. Последователността на инсерта, SEQ ID No: 4 е показана на фигура 3. сДНК клон 4-7 (*E. coli* K-12, SOLR/p4-7#1-1) е депозирен като ATCC No. 98062

5. Охарактеризиране на 1-7, 3-2 и 4-7 сДНК клоновете

А) Последователности на ДНК на протешна

Последователността на 3-2 сДНК (фигура 1; SEQ ID NO:1) съдържа отворена рамка на разчитане от 307 аминокиселини (фигура 1; SEQ ID NO:3). Сигнална последователност от 2 SEQ ID NO:1 се подсказва от анализа на Von Heijne (Von Heijne et al., *Nucleic Res.* 14:14683 (1986)), и трансмембранна област обхващаща приблизително aa 235-257 означава, че 3-2 продуктът е повърхностен клетъчен протеш.

Последователност 1-7 сДНК (фигура 2; SEQ ID NO:2) съдържа отворена рамка на разчитане от 307 аминокиселини, която е идентична с отворената рамка на разчитане в 3-2 сДНК (SEQ ID NO:3). Последователност 4-7 сДНК (фигура 3; SEQ ID NO:4) съдържа отворена рамка на разчитане от 572 аминокиселини (SEQ ID NO:5). Трансмембранната област е локализирана приблизително при аминокиселини 501-521.

В) *In situ* анализ на 1-7, 3-2 и 4-7 мРНК в контралатерален и пост-изсехемични бърбrecи от възрастен плъх :

In situ хибридизация се осъществява съгласно метода описан от Finch et al., *Dev. Dynamics* 203:223-240, 1995. Бързо, и

двата, изхемичния и контралатералния бъбрек се фиксират с 4% параформалдехид в PBS. След това бъбреците се фиксират през ноща при 4°C. Парафинови срезове се депарафинизират и се хидратират отново, фиксират се с 4% параформалдехид в PBS, смилат се с протеиназа Н, отново се фиксират, след което се ацетилиран оцетен анхидрид в триетаноламин буфер. След това срезовете се дехидратират и се хибридизират с ³²P-маркирани рибопроби при 55°C за цяла нощ, с ³²P-маркирани проби, генерирани от 3-2 RDA или 1-7 RDA продукти субклонирани в BamHI сайт на pGEM-11Z. След хибридизация, срезовете се промиват при строги условия (2 x SSC, 50% формамид при 65°C). Срезове се дехидратират накрая, покриват се с емулсия (NBT-2) за автордиография и се експонират поне за една седмица. Сребърни зрънца се проявяват и срезовете се оцветяват за преброяване с толуидин блу и се микрофотографират.

Анализът на 1-7 и 3-2 mPНК експресията чрез *in situ* хибридизация показват, че тези гени са силно ир-регулирани в повредените бъбречни клетки, в сравнение с тяхната експресия в нормалните бъбречни срезове. Показаната експресия е в регенеративни клетки от кортекса и външната медула, повечето от които изглеждат са проксимални тубулни клетки.

Анализът *in situ* на 1-7 PНК модела на експресия също разкрива силна експресия на този ген в увредения изхемичен бъбрек в сравнение с нормален бъбрек от възрастно животно. Изглежда сайт на експресия са филтриращите клетки.

б) Изолиране на клон от човешка cДНК, който хибридизира кръстосано с 3-2 cДНК от плъх

Получават се ^{32}P -маркирани ДНК проби, съдържащи нуклеотиди 546-969 от инсерта на клон 3-2, показан на фигура 1 и се използват за скриниране на човешки ембрионален черен гроб ламбда gt10 cДНК библиотека (Clontech Catalog#HL5003a). 1×10^6 плаки се подлагат на скриниране с повторение, чрез използване на стандартни условия, както е описано по-горе, но температурата при скринирането е 55°C . За промиването при строги условия, филтрите се промиват с $2 \times \text{SSC}$ при 55°C . Идентифицирани са петдесет позитивни фага и плаките се пречистват. ДНК от фагите се подлагат на Southern анализ, при използване на същите проби както по-горе. Southern блот филтърът се подлага на крайното промиване с $0,5 \times \text{SSC}$ при 55°C . Два клона се идентифицират като позитивни. Инсерта на клон H13-10-85 се подлага на секвениране и е открита област, която кодира за протеин с висока степен на идентичност с 3-2 протеина, показан на фигура 3.

Нуклеотидна последователност (SEQ ID NO:6) и предсказаните аминокиселинни последователности (SEQ ID NO:7) на човешки 3-2 свързан протеин, са показани на фигура 4. Както се вижда от bestfit анализа, посочен на фигура 5, човешки 3-2 свързан протеин е 43,8% идентичен и 59,1% подобен на 3-2 протеина от плъх. И двата съдържат IgG, муцин, транс-мембранни и цитоплазмични домени. Шесте цистеина в IgG домените на двата протеина са консервативни.

7) Продуциране на KIM-1 Ig слят протеин

Слят протеин на извънклетъчният домен на KIM и Fc областта на имуноглобулин (Ig) е полезно средство за изучаване на молекулярната и клетъчна биология на увреден/регенериран бъбрек и като терапевтична молекула. За продуциране на KIM Ig слят протеин с извънклетъчен домен от KIM-1, cДНК се амплифицира чрез PCR и се клонира в Biogen експресионен вектор pCA125, за временна експресия в COS клетки. Експресионният вектор pCA12 продуцира слят протеин, който притежава структура от ген, клониран при N-края и човешка Ig Fc област при C-края. COS клетките се трансфектират с плазмид SJR 103 или 104; тези плаزمиди експресират слят протеин, който съдържа човешки KIM последователности 263-1147 (SEQ ID NO:6; SJR 103) или KIM последователности 599-1319 (SEQ ID NO:1; SJR 104) на извънклетъчния домен слят към човешка Ig Fc област. Клетките се култивират в 10% BS в DMEM в лаборатория за клетки (Nunc, Naperville, IL). Два до три дни след трансфектирането се събира средата, концентрира се чрез Amicon концентратор и слятият протеин се пречиства чрез използване на Protein-A Sepharose колона. След пречистването чистотата на слятия протеин се измерва чрез SDS-PAGE.

ДИАГНОСТИЧНА УПОТРЕБА НА СЪЕДИНЕНИЯТА ОТ ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Анти-KIM антитела, съгласно изобретението, които специфично се свързват към протеина на SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:7 или техни фрагменти, са полезни при

някои диагностични методи. Тези агенти могат да се бележат с маркери, които могат да се установят, като например флуороскопично или радиографично непрозрачни вещества, и да се приложат върху пациент за да позволят онагледяването на тъканите, които експресират КИМ протеин. Агентите могат, също така, да бъдат свързани към вещества, като пероксидаза от хрян, която може да се използва като имуноцитохимични багрила, което да позволява визуализирането на площите на клетките с положителен КИМ протеин върху хистологични срезове. По този начин може самостоятелно да се използва специфично антитяло, и местата в които то се свързва се визуализират чрез сандвич-метода, чрез използване на антиимуноглобулин антитяло, което самото то е свързано към маркер, който може да се отчете.

Специфичните антитела към КИМ протеина са полезни, също така, в имуноизследванията за измерване на присъствието на КИМ или концентрацията в пробите от телесни тъкани и течности. Такива концентрации могат да се свържат с различни стадии на заболяване. Като вариант за изпълнение на изобретението от изключителен интерес, изобретението включва метод за диагностициране на бъбречно увреждане, или онагледяване на процес на бъбречно възстановяване, чрез измерване на концентрацията на КИМ или фрагменти на КИМ в урина, плазма или серум на пациент. Подобно, КИМ може да се измери в утайката на урината, а по-точно в клетъчните отломки на утайката на урината. Изхвърлените бъбречни тубулни клетки, които могат да присъстват в утайката на урината на пациенти с протичащи

бъбречни заболявания, могат да съдържат завишени нива на KIM протеин и mPNC.

Специфични антитела за KIM протеина могат да се свържат, също така, към твърда повърхност, като перли или съдове, и да се използват за отстраняване на лиганда от разтвора, било то за измерване, или за пречистване и охарактеризиране на протеина или неговите характерни качества (като посттранслационни модификации). Такова охарактеризиране на KIM протеина на пациента може да се окаже полезно при идентифициране на вредни мутанти или дефекти, които се застъпват с функциите на KIM и се свързват с ненормалните фенотипове на пациентите. Всяка една от тези техники е добре позната на специалистите в областта от имунологичната литература.

Допълнителни методи за онагледяване използват KIM или фрагменти на KIM, слят с части, които могат да се изобразят, за диагностично изобразяване на тъкани, които експресират KIM лиганди, а по-специално тумори.

Други диагностични техники се основават на иррегулирането на KIM mPNC в тъканите, като показател за свързани с увреждане процеси. Тази техника е тествана и приложима за работа в модел на изземично нараняване в плъхове, както следва.

За да се определи дали се е покачило нивото на KIM-1 протеина след увреждане, се разлагат хомогенати от бъбрек на контралатерални и постизсхемични бъбреци 24 и 48 часа след 40 минутно стягане на бъбречната артерия и вена на единия бъбрек за всеки плъх. Бъбречният хомогенат се изследва за присъствие на KIM-1 протеин. Western блот анализът

идентифицира три протеина определени чрез две различни антитела след изземично нараняване, които не могат да се установят в хомогенатите от контралатералните бъбреци, които не са изложени на изземично нараняване. Явните молекулни тегла на ивиците са приблизително 40 kDa, 50 kDa и 70-80 kDa. Установените три вида протеини чрез western blotting биха могли да представляват потенциални N или O свързани сайтове на гликозиране. Фактът, че всеки от тези протеини реагира с два различни комплекта поликлонални антитела поддържа идеята, че те са свързани към KIM-1 и не са кръстосано реагиращи ивици. Потвърждението на това предсказание дойде от резултатите от частично CNBr разцепване на трите протеина, които разкриха, че те делят общи CNBr фрагменти на разцепване. Тъй като не е предсказано, че цитоплазматичният домен на KIM-1 съдържа каквато и да е голяма пост-транслационна модификация, двата най-малки продукта от смилането (4,7 kDa и 7,4 kDa) определени с антитела срещу цитоплазматичния домен на KIM-1, би трябвало да са със същия размер за трите различни ивици на KIM-1 протеина, ако те произлизат от един и същ протеин. Наблюдаваме, че KIM-1 40 kDa и 70-80 kDa протеините носят фрагменти, които мигрират като предсказания размер. Смилането на ивицата на 50 kDa протеина дава също ивица на същия C-краен пептид.

KIM-1 последователността представя два предполагаеми сайта за N-гликозиране и муцинов домен, където O-гликозирането може да покрие полипептидната верига. Установените три KIM-1 ивици в пост-изземичен бъбрек, могат да съответстват на гликозирани варианти на същия

протеин на сърцевината. De-N-гликозилиране на PNG-аза F води до преместване на всичките три ивици към по-ниско молекулно тегло, което съответства на загуба на около 3 kDa, което означава, че всичките три протеина са N-гликозилирани. Разликите при O-гликозилирането може да обясни разликите в размера на тези три ивици.

ТЕРАПЕВТИЧНА УПОТРЕБА НА СЪЕДИНЕНИЯТА ОТ ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Терапевтичните методи от изобретението включват селективно спомагане или инхибиране на клетъчните отговори, които зависят от KIM лигирането. Когато KIM и KIM лиганда са свързани мембранно и двата, и се експресират от различни клетки, трансдукцията на сигнала може да се прояви в експресираща KIM клетка в KIM лиганд-експресираща клетка, или и двете.

KIM лигиране-бързо реагиращ отговор в KIM лиганд-експресиращи клетки може да се генерира при влизането на клетките в контакт с екзогенни KIM, KIM сляти протеини или чрез активизиране на антитела срещу KIM лиганд, било то *in vitro* или *in vivo*. По-нататък, отговорите на KIM лиганд-експресираща клетка, която иначе щеше бързо да бъде задействана от ендогенен KIM, би могла да се блокира чрез влизането в контакт на KIM лиганд-експресираща клетка с KIM лиганд антагонист (например, антитяло антагонист, което се свързва с KIM лиганд), или чрез влизането в контакт на ендогенния KIM с анти-KIM антитяло или друга свързваща

KIM молекула, която предпазва действителното лигиране на KIM с KIM лиганда.

Подобно, отговорите, които се задействат от KIM лигиране в KIM експресираща клетка могат да се спомогнат или да се инхибират от екзогенни съединения. KIM лигиране-задействащият отговор в KIM експресиращата клетка, може да се генерира чрез поставянето на клетката в контакт с разтворим KIM лиганд, или някои анти-KIM активиращи антитела. По-нататък, отговорите на KIM експресираща клетка, която иначе щеше бързо да бъде задействана от взаимодействието с ендегенен KIM лиганд, би могла да се блокира чрез влизането в контакт на KIM експресиращата клетка с един антагонист на KIM (например, блокиращо антитяло, което се свързва с KIM по начин предотвратяващ действителното генериращо-сигнал KIM лигиране), или чрез влизането в контакт на ендегенния KIM лиганд с анти-KIM лиганд антитяло или друга свързваща KIM лиганд молекула, която предпазва действителното лигиране на KIM с KIM лиганда.

Изборът на горе-описаните начини на действие, който да е полезен за определено терапевтична употреба, зависи от проявеният етиологичен механизъм или на патологичния процес, който трябва да бъде инхибиран, или от желания медицински процес, който трябва да бъде спомогнат, както става ясно на специалистите в областта на медицината. Например, когато KIM лигирането води до желан клетъчен растеж, поддържане на диференциран фенотип, устойчивост на апоптозис, индуциран от различни инсулти, или други полезни от медицинска гледна точка отговори, може да се

използува един от горе-описаните начини на действие, спомагащ лигиране-задействие отговор. Алтернативно, един от инхибиращите начини на действие може да е полезен, когато КИМ лигиране се придружава от нежелани последствия, като неопластичен растеж, вредна загуба на клетъчните функции, предразположение към апоптозис, или спомагане на възпалителни състояния.

Следват примери за описаните вече терапевтични методи на изобретението. Едно терапевтично приложение на свързаните с КИМ съединения, съгласно изобретението, е за лечение на субект с бъбречно заболяване, спомагане растежа на нови тъкани в субекта, или спомагане преживяването на наранената тъкан в субекта, и включва етапа на прилагане върху субекта на терапевтично ефективно количество от КИМ протеин, съгласно изобретението, или на фармацевтичен състав, който включва протеин, съгласно изобретението. Използуваният в тези методи протеин може да бъде фрагмент от КИМ протеин в пълен размер, разтворим КИМ лиганд протеин или слят фрагмент, или КИМ агонист. Тези методи могат, също така, да се практикуват чрез прилагане върху субекта на терапевтично ефективно количество антиляло агонист, съгласно изобретението. КИМ протеинът може да се прилага конкурентно с терапевтично ефективно количество второ съединение, което проявява терапевтично желан помощен ефект. Тъй като интересуващите ни тъкани за тези методи могат да включват каквато и да е тъкан, предпочитаните тъкани включват бъбречна тъкан, чернодробна, невръвна тъкан, сърце, стомах, тънките черва, гръбначния мозък, или бял дроб. Особени бъбречни състояния,

които могат благоприятно да се лекуват със съединенията на изобретението, включват остра бъбречна недостатъчност, остър нефрит, хронична бъбречна недостатъчност, нефротичен синдром, дефекти на бъбречните тубули, бъбречни трансплантанти, токсични наранявания, хипоксично (с намалено съдържание на кислород) нараняване, и травми. Дефектите на бъбречните тубули включват, тези с наследствена или придобита същност, като например полицистично бъбречно заболяване, медуларно цистично заболяване, и медуларен гъбест бъбрек. Този списък не е ограничен и може да включва още много други бъбречни нарушения (виж например, Harrison's Principles of Internal Medicine, 13th ed., 1994, което се включва тук за справка). Субект на методите може да бъде човек.

Терапевтична интервенция за инхибиране растежа на нежелана КІМ лиганд-експресираща тъкан в пациент включва етапа на прилагане върху субекта на терапевтично ефективно количество КІМ антагонист (например, анти-тяло антагонист, което може да се свържи към КІМ лиганда), или чрез прилагане на терапевтично ефективно количество анти-КІМ анти-тяло или друга КІМ-свързваща молекула, която блокира свързването на КІМ към КІМ лиганд-експресиращата тъкан. В един вариант за изпълнение на изобретението, представляващ интерес, КІМ антагониста или анти-КІМ анти-тялото може да се използва терапевтично за инхибиране или блокиране растежа на туморите, чийто растеж зависи от КІМ протеина.

Други методи на изобретението включват убиване на КІМ лиганд-експресиращи туморни клетки, или инхибиране на

растежа им, чрез поставянето на клетките в контакт със слят протеин на КІМ и токсин или радионуклеид, или анти-КІМ лиганд антитяло конюгирано с токсин или радионуклеотид. Клетката може да е в пациента, а протеинът или конюгираното антитяло се прилага върху пациента.

В изобретението се включва също метод за насочване на токсин или радионуклеотид в клетка експресираща КІМ, който метод включва привеждане на клетката в контакт със слят протеин, съдържащ КІМ лиганд и токсин или радионуклеотид, или едно анти-КІМ антитяло конюгирано с токсин или с радионуклеотид. Друг вариант за изпълнение на изобретението включва премахване растежа на туморната клетка, която експресира КІМ, включващ привеждане на клетката в контакт със слят протеин на КІМ лиганд и токсин или радионуклеотид или с анти-КІМ антитяло, конюгирано с токсин или радионуклеотид; клетката може да е в субекта, и протеинът се прилага върху субекта.

Терминът "субект", както се използва в описанието, се отнася до кой да е бозайник, на който може да се приложи КІМ. Субектите, изключително подходящи за третиране по метода на изобретението, включват хора, така както и нечовешки примати, овце, коне, рогат добитък, кози, прасета, кучета, котки, зайци, морски свинчета, хамстери, плъхове и мишки, както и органи, тумори, и клетки произлизащи от тези гостоприемници.

ИЗПОЛЗУВАНЕ НА СЪЕДИНЕНИЯТА НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО ПРИ ГЕННАТА ТЕРАПИЯ

KIM гените, съгласно изобретението, се въвеждат в увредената тъкан или в тъкан, където е желан стимулация на растеж. Такава генна терапия стимулира продуцирането на KIM протеин от трансфектираните клетки, спомагайки клетъчния растеж и/или преживяването на клетките, които експресират KIM протеин.

В един специфичен вариант за изпълнение на метода на генна терапия, ген кодиращ за KIM протеин може да се въведе в бъбречната тъкан мишена. KIM протеина ще се експресира стабилно и ще стимулира тъканния растеж, деленето, или диференциацията, или би подсилва клетъчната преживяемост. KIM генът може, освен това, да се въведе в клетка мишена чрез използване на голям брой добре известни методи, при които се използва вирусна или не-вирусна основана стратегия.

Не-вирусните методи включват електропорация, мембранно сливане с липозоми, бомбардиране с висока скорост с микроснаряди покрити с ДНК, инкубиране с калциево-фосфатна ДНК утайка, DEAE-декстран медирана трансфекция, и директно микро-инжектиране в единични клетки. KIM ген може, например, да бъде въведен в клетка чрез калциево фосфатно ко-утаяване (Pillicer et al., *Science*, 209:1414-1422 (1980)); механично микроинжектиране и/или ускоряване на частици (Anderson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5399-54-3 (1980)); основаващ се на липозоми ДНК трансфер (например, LIPOFECTIN-медирано трансфектиране- Fefgner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 471-477, 1987; Gao and Huang, *Biophys.*

Res. Comm., 179: 280-285, 1991; DEAE Dextran-медирана трансфекция; електропорация (патент на САЩ 4 956 288); или методи основаващи се на полилизина, при които ДНК се конюгира, така че ДНК за предпочитане да бъде доставена в чернодробните хепатоцити (Wolff et al., Science, 247: 465-468, 1990; Curiel et al., Human Gene Therapy 3: 147-154, 1992).

Клетки мишени могат да бъдат трансфектирани с гените на изобретението чрез директен генен трансфер. Виж например Wolff et al., "Direct Gene Transfer Into Moose Muscle in vivo", Science 247:1465-68, 1990. В много случаи, вектор-медираните трансфекции са желани. Може да се използва който и да е метод известен от състоянието на техниката за инсерране на полинуклеотидни последователности във вектор (виж например Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989; и Ausbel et al., Current Protocols in Molecular Biology, J. Wiley & Sons, NY, 1992, като и двата източника се включват тук за справка). Активирането на промотора може да бъде тъканно специфично или индуцируемо от метаболитен продукт или приложено съединение. Такива промотори/енхансери включват, на без да се ограничават до, нативен c-ret лиганд протеин промотор, цитомегаловирус непосредствен-бърз промотор/енхансер (Karasuyama et al., J. Exp. Med., 169: 13, 1989); бета-актинов промотор (Gunning et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 84:4831, 1987; глококортикоид-индуцируем промотор присъстващ в дългия краен повтор на миши туморен вирус на млечната жлеза (MMTV LTR) (Klessig et al., Mol. Cell. Biol., 4: 1354, 1984); последователности на дълги крайни повтори на вируса на Moloney миша левкемия (MuLV LTR) (Weiss et al.,

RNA Tumor Viruses, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1985); SV40 ранен промотор на областа (Bernoist and Chambon, Nature, 290:304, 1981); промотор на вируса на Rous саркома (RSV) (Yamamoto et al., Cell, 22:787, 1980); тимицин киназен промотор на вируса на херпес симплекс (HSV) (Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3567, 1985).

KIM гените могат, също така, да бъдат въведени чрез специфични вирусни вектори за използване при системи на генен трансфер, които вече са добре утвърдени. Виж например: Medzak et al., J. Gen. Virol., 73: 1533-36, 1992 (паповавирус SV40); Berkner et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158: 39-61, 1992 (агеновирус); Hofman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 10099-10103, 1995 (бакуловир); Moss et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158:25-38, 1992 (вакциния вирус); Muzyczka, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158: 97-123 (агено-асоциран вирус); Margulskes, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158: 67-93, 1992 (херпес симплекс вирус (HSV) и Epstein-Barr virus (EBV)); Miller, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158: 1-24, 1992 (реповир); Brandyopadhyay et al., Mol. Cell. Biol. 4: 749-754, 1984 (реповир); Miller et al., Nature, 357: 455-450, 1992 (реповир); Anderson, Science, 256: 808-813, 1992 (реповир); Current Protocols in Molecular Biology: Sections 9.10-9.14 (Ausubel et al., Eds.), Green Publishing Associates, 1989, всички които са включени тук за справка.

Предпочитани вектори са ДНК-овите вируси, които включват агеновируси (за предпочитане вектор основаващ се на вируса на херпес симплекс и паповавирус (за предпочитане "дефектен" или не-автономен паповавирус, но-предпочитано вектори на основата на агено-асоциран вирус, още по-предпочитано вектори базирани на AVV-2). Виж например, Ali

et al., Gene Therapy 1: 365-384, 1994; патент на САЩ 4 797 368 и 5 399 346, както и следващите разисквания.

Изборът на определена векторна система за трансфер, например, КІМ последователност, ще зависи от голям брой фактори. Един важен фактор е естеството на популацията от клетки мишени. Въпреки че ретровирусните вектори нашироко са били изследвани и използвани в голем брой генно терапевтични приложения, те не са подходящи за инфектиране на клетки, които не се делят, но могат да са използвани в противо-раковата терапия, тъй като те само интегрират и експресират тяхните гени в реплициращите се клетки. Те са полезни при *in vivo* подход и са примамливи, в това отношение, поради факта на тяхното интегриране в генома на клетката мишена.

Аденовирусите са ДНК-ови вируси, които могат да бъдат модифицирани, така че ефективно да доставят терапевтичен или репортер трансген на голямо разнообразие от типове клетки. Обикновените аденовируси тип 2 и 5 (Ad2 и Ad5, съответно), които причиняват дихателни заболявания при хората, са разработени най-общо за генна терапия на Duchenne Мускулна Атрофия (DMA) и Цистична Фиброза (CF). Ad2 както и Ad5 принадлежат на подклас аденовируси, които не са асоциирани към злокачествени заболявания при хора.

Аденовирусните вектори са способни да доставят изключително високи нива на трансгени до практически всички видове клетки, без значение от миотичното състояние. Лесно могат да се генерират високи титри (10^3 плака образувача единица/ml) на рекомбинантен вирус в 293 клетки (аденовирус-трансформирана, комплементарна ембрионална бъбречна

клетъчна линия : ATCC CRL1573) и могат да се съхраняват замразени за продължителни периоди без значителни загоби. Ефикасността на тази система при доставянето на терапевтичен трансген *in vivo*, който допълва генетичния дисбаланс е демонстрирана при животински модели с различни разстройства. Виж Watanabe, *Atherosclerosis*, 36: 261-268, 1986; Tanzawa et al., *FEBS Letters* 118(1):81-84, 1980; Golasten et al., *New Engl. J. Med.* 309: 288-296, 1983; Ishibashi et al., *J. Clin. Invest.* 92: 883-893, 1993; и Ishibashi et al., *J. Clin. Invest.* 93: 1889-1893, 1994, като всичките източници са включени тук за справка. Действително, рекомбинантни с дефектна репликация аденовируси кодиращи сДНК за трансмембрания регулатор на цистична фиброза (CFTR) са били удобени за използване при поне две човешки CF клинични изпитания. Виж например, Wilson, *Nature*, 365: 691-692, 1993. Друг факт в поддръжка на безопасността на рекомбинантните аденовируси за генна терапия е широкият опит да се поддържа жива аденовирусна ваксина в човешки популации.

Първото поколение рекомбинантни, с дефект в репликацията аденовируси, които са разработени за генна терапия на DMD и други наследствени нарушения, съдържат делеция на цялата E1a и част от E1b областите. Този вирус с дефект в репликацията се култивира в 293 клетки съдържащи функционален аденовирусен E1a ген, който дава възможност за прехвърляне на E1a протеза. Вируси с делеция на E1a са способни да се реплицират и да продуцират инфекциозни вируси в 293 клетки, които предоставят генни продукти от E1a и E1b областите *in trans*. Полученият вирус е способен да инфектира много типове клетки и може да експресира интродуцирания ген

(при положение, че той носи собствен промотор), но не може да се реплицира в клетка, която не носи E1 областа на ДНК, освен ако клетката не е инфектирана с много висока мултипленост на инфекцията. Аденовирусите имат предимството че притежават широк кръг гостоприемници, че могат да инфектират неподвижни или терминално диференцирани клетки, като например неврони, и че ся явяват неонкогенни по същество. Аденовирусите изглежда не се интегрират в генома на гостоприемника. Рискът от инсерционен мутагенез е силно намален поради факта, че те съществуват извънхромозомно. Ali et al., 373 (виж по-горе). Рекомбинантните аденовируси (rAdV) продуцират много високи титри, вирусните частици са сравнително стабилни, нивата на експресия са високи, и могат да се инфектират широк кръг клетки. Тяхния естествен гостоприемник е въздухообменния епител, така че те са полезни за терапия на рак на белите дробове.

Бакуловирис-медицираният трансфер притежава някои предимства. Бакуловирисният генен трансфер може да се осъществи в реплициращи и нереплициращи клетки, както също и в бъбречни клетки, така както и в хепатоцити, нервни клетки, клетки на галака, на кожата и мускулите. Бакуловирис не се реплицира и не е патогенен в клетки на бозайници. При хората липсват прадварително съществуващи антитела за рекомбинантни бакуловириси, които биха могли да блокират инфекцията. Бакуловирис е в състояние, освен това, да инкорпорира и да трансдуцира много големи ДНК инсерти.

Адено-асоцираните вируси (AVV) също се използват като вектори за соматична генна терапия. AVV е малък,

едноверижен (ss) ДНК-ов вирус с проста геномна организация (4-7 kb), което го прави идеален субстрат за генно инженерство. Две отворени рамки на разчитане кодират серии от гер и сар полипептиди. Гер полипептидите (гер78, гер68, и гер40) са въввлечени в репликацията, запазването и интегрирането на AVV генома. сар протеините (VP1, VP2 и VP3) образуват капсула на вируона. Заграждайки гер и сар отворените рамки на разчитане при 5' и 3' краищата, се намират 145bp обратни повтори (ITRs), първият 125 bp, от които е способен да образува Y- или T-образни съвоени конструкции. За развитието на AVV векторите е от значение целите гер и сар домени да могат да бъдат изрязани и заменени с терапевтичен или репортер трансген. Виж В. J. Carter, in Handbook of Parvoviruses, ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155-168 (1990). Показано е, че ITRs представлява минималната последователност необходима за репликация, запазване, обвиване, и интегриране на AVV генома.

Адено-асоцираните вируси (AVV) притежават значителен потенциал при генната терапия. Вирусните частици са много стабилни и рекомбинантните AVVs (rAAV) притежават "лекарствено-подобни" характеристики по това, че rAAV могат да се пречистят чрез утаяване или чрез свързване в градиент на CsCl. Те са термостабилни и мога да се лиофилизират до прахообразно състояние и да се рехидратират до пълна активност. Тяхната ДНК стабилно се интегрира в хромозомата на гостоприемника, така че експресията е дълготрайна. Те имат широк обхват от гостоприемници и AVV не пречистват познати заболявания, така че рекомбинантните вектори не са токсични.

След като веднъж са въведени в клетката мишена, интересуващите ни последователности могат да се идентифицират чрез конвенционални методи, като например хибридизация на нуклеинови киселини чрез използване на проби съдържащи последователности, които са хомоложни/комплементарни на инсерираната генна последователност на вектора. Съгласно друг подход, последователностите могат да се идентифицират според присъствието или отсъствието на "маркерен" ген функция (например, тимидин киназна активност, устойчивост на антибиотик, и други подобни), причинена от въвеждането на експресионния вектор в клетката мишена.

ЛЕКАРСТВЕНИ ФОРМИ И ПРИЛОЖЕНИЕ

Съединенията, съгласно изобретението, се привеждат във вид на лекарствани форми, съгласно стандартната практика, така както се приготвят и за носител vehiculum. Терминът "фармакологично приемлив носител" означава една или повече органични или неорганични съставки, естествени или синтетични, с които мутантният протоонкоген или мутантен онкопротеин се комбинира за да се улесни неговото прилагане. Подходящи носители включват стерилен физиологичен разтвор, въпреки че на специалистите в областта са известни други водни или неводни изоточни стерилни разтвори и стерилни суспензии, за които е известно, че са фармацевтично приемливи носители. В този смисъл терминът "носител" включва липозоми и HIV-1 tat протеин (виж Chen et

al., Anal. Biochem. 227: 168-175, 1995), така както и който и да е плазмид и вирусни експресионни вектори.

Всеки от новите полипептиди от настоящото изобретение може да се използва под формата на фармацевтично приемлива сол. Подходящи киселини и бази, които са способни да образуват соли с полипептида от настоящото изобретение, са добре известни на специалистите в областта, и включват неорганични и органични киселини и основи.

Съединение, съгласно изобретението, се прилага върху субект в терапевтично-ефективно количество, което означава такова количество от съединението, което причинява желан медицински резултат или упражнява влияние върху определеното състояние, което се третира. Ефективно количество от съединението на изобретението е способно да подобри или да забави развитието на болестното, дегенеративно или увредено състояние. Ефективното количество може да се определи индивидуална основа и ще се основава, отчасти, върху наблюденията на лекуващия лекар на субекта, симптомите, които трябва да се третират и постигнатите резултати. Ефективното количество може да се определи от всеки специалист в областта, чрез прилагане на такива фактори и при използване не повече рутинни експерименти.

Липозомната система за доставка на съединение от изобретението, може да е който и да е от голямото разнообразие еднослойни везикули, стабилни многослойни везикули, и може да се приготви и да се прилага съгласно методи, добре известни на специалистите в областта,

например, съгласно посоченото в патенти на САЩ No 5 169 637, 4 762 915, 5 000 958 или 5 185 154. Освен това може да се окаже желателно да се експресира новия пептид на изобретението, така както и други избрани полипептиди, като липопротеини, с цел да се засили тяхното прикрепяне към липозомите. Като пример може да се осъществи *in vivo* третиране на остра бъбречна недостатъчност с капсулиран в липозом КИМ протеин, в клетки, които се нуждаят от такова лечение чрез липозоми. Липозомите могат да се доставят до бъбречната артерия чрез катетър. Рекombинантният КИМ протеин се пречиства, например, от CHO клетки чрез имуноафинитентна хроматография или който и да друг подходящ метод, след което се смесва с липозомите и се инкорпорира в тях при висока ефикасност. Инкапсулираният протеин може да се тества *in vivo* за какъвто и да ефект на стимулиране на клетъчния растеж.

Съединенията, съгласно изобретението, могат да се прилагат по какъвто и да е, медицинско приемлив, начин. Това може да включва инжектиране, по парантерален път, като интравенозно, интраваскуларно, интрапарентерално, подкожно, мускулно, интратуморно, интраперитонеално, интравентрикуларно, интраепидурално, или друго, така както и орално, назално, офталмично, ректално, или локално. Прилагането със забавено действие също се включва специфично в изобретението, по такива начини като инжекции с дено действие, или ерозивни импланти. Локализираното доставяне е изключително подходящо, чрез такива начини за доставяне чрез катетър до една или две артерии, като

например бъбречната артерия или мехур, подпомагащ локализацията на тумора.

Въпреки, че горното изобретение е описано в детайли за да илюстрира и като пример с цел по-ясно разбиране, на специалистите в областта ще бъде ясно, че могат да се наложат промени и модификации в обхвата на изобретението, който единствено се ограничава от обхвата на прилежащите патентни претенции.

СПИСЪК НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТИТЕ

(1) Обща информация :

(i) заявител : Michele Sanicola-Nadel

Joseph V. Bonventura

Catherine A. Hession

Takaharu Ichimura

Henry Wei

Richard L. Cate

(ii) заглавие на изобретението :

МОДУЛАТОРИ НА ТЪКАННА РЕГЕНЕРАЦИЯ

(iii) брой на последователностите : 7

(iv) адрес за кореспонденция :

(A) адрес : Biogen, Inc.

(B) улица : 14 Cambridge Center

(C) град : Cambridge

(D) щат : MA

(E) страна : USA

(F) код ZIP : 02142

(v) компютърна форма за разчитане :

(A) тип на средата : floppy disk

(B) компютър : IBM PC съвместим

(C) операционно система : PC-DPS/MS-DOS

(D) програмен продукт : PatentIn Release #1.0,

Версия #1.30

(vi) данни за настоящата заявка :

- (A) номер на заявката :
- (B) датата на заявяване : 23.05.1997
- (C) класификация

(vii) данни за предшестващи заявки :

- (A) номер на заявката : US 60/018 228
- (B) датата на заявяване : 24.05.1996

(viii) данни за патентния представител :

- (A) име : Levine, Leslie M.
- (B) регистрационен номер : 35 245
- (C) справка : A010 PCT CIP

(ix) телекомуникационна информация :

- (A) телефон : (617) 679-2810
- (B) факс : (617) 679-2838

(2) информация за SEQ ID NO : 1 :

(i) характеристики на последователността :

- (A) дължина : 2566 базови двойки
- (B) тип : нуклеинова киселина
- (C) верижност : еденична
- (D) топология : линейна

(ii) тип на молекулата : cДНК

(ix) характеристики :

(A) име/ключ : CDS

(B) локализация : 615..1535

(xi) описание на последователността : SEQ ID NO : 1 :

(2) информация за SEQ ID NO : 2 :

(i) характеристики на последователността :

(A) дължина : 2084 базови двойки

(B) тип : нуклеинова киселина

(C) верижност : еденична

(D) топология : линейна

(ii) тип на молекулата : cДНК

(ix) характеристики :

(A) име/ключ : CDS

(B) локализация : 145..1065

(xi) описание на последователността : SEQ ID NO : 2 :

(2) информация за SEQ ID NO : 3 :

(i) характеристики на последователността :

(A) дължина : 307 базови двойки

(B) тип : аминокиселина

- (C) верижност : еденична
- (D) топология : линейна

(ii) тип на молекулата : протени

(xi) описание на последователността : SEQ ID NO : 3 :

(2) информация за SEQ ID NO : 4 :

(i) характеристики на последователността :

- (A) дължина : 2303 базови двойки
- (B) тип : нуклеинова киселина
- (C) верижност : еденична
- (D) топология : линейна

(ii) тип на молекулата : сДНК

(ix) характеристики :

- (A) име/ключ : CDS
- (B) локализация : 107..1822

(xi) описание на последователността : SEQ ID NO : 4 :

(2) информация за SEQ ID NO : 5 :

(i) характеристики на последователността :

- (A) дължина : 572 аминокиселини

(B) тип : аминокиселина

(D) топология : линейна

(ii) тип на молекулата : протеин

(xi) описание на последователността : SEQ ID NO : 5 :

(2) информация за SEQ ID NO : 6 :

(i) характеристики на последователността :

(A) дължина : 1795 базови двойки

(B) тип : нуклеинова киселина

(C) верижност : еденична

(D) топология : линейна

(ii) тип на молекулата : cДНК

(ix) характеристики :

(A) име/ключ : CDS

(B) локализация : 278..1279

(xi) описание на последователността : SEQ ID NO : 6 :

(2) информация за SEQ ID NO : 7 :

(i) характеристики на последователността :

(A) дължина : 334 аминокиселини

(B) тип : аминокиселина

(D) топология : линейна

(ii) тип на молекулата : протеин

(xi) описание на последователността : SEQ ID NO : 7 :

TTG ACA ATA GAG AAC TCT GTT GAT AGT GAT AGT GGT CTG TAT TGT TGC	938
Leu Thr Ile Glu Asn Ser Val Asp Ser Asp Ser Gly Leu Tyr Cys Cys	
95 100 105	
CGA GTG GAG ATT CCT GGA TGG TTC AAC GAT CAG AAA ATG ACC TTT TCA	986
Arg Val Glu Ile Pro Gly Trp Phe Asn Asp Gln Lys Met Thr Phe Ser	
110 115 120	
TTG GAA GTT AAA CCA GAA ATT CCC ACA AGT CCT CCA ACA AGA CCC ACA	1034
Leu Glu Val Lys Pro Glu Ile Pro Thr Ser Pro Pro Thr Arg Pro Thr	
125 130 135 140	
ACT ACA AGA CCC ACA ACC ACA AGG CCC ACA ACT ATT TCA ACA AGA TCC	1082
Thr Thr Arg Pro Thr Thr Thr Arg Pro Thr Thr Ile Ser Thr Arg Ser	
145 150 155	
ACA CAT GTA CCA ACA TCA ACC AGA GTC TCC ACC TCT ACT CCA ACA CCA	1130
Thr His Val Pro Thr Ser Thr Arg Val Ser Thr Ser Thr Pro Thr Pro	
160 165 170	
GAA CAA ACA CAG ACT CAC AAA CCA GAA ATC ACT ACA TTT TAT GCC CAT	1178
Glu Gln Thr Gln Thr His Lys Pro Glu Ile Thr Thr Phe Tyr Ala His	
175 180 185	
GAG ACA ACT GCT GAG GTG ACA GAA ACT CCA TCA TAT ACT CCT GCA GAC	1226
Glu Thr Thr Ala Glu Val Thr Glu Thr Pro Ser Tyr Thr Pro Ala Asp	
190 195 200	
TGG AAT GGC ACT GTG ACA TCC TCA GAG GAG GCC TGG AAT AAT CAC ACT	1274
Trp Asn Gly Thr Val Thr Ser Ser Glu Glu Ala Trp Asn Asn His Thr	
205 210 215 220	
GTA AGA ATC CCT TTG AGG AAG CCG CAG AGA AAC CCG ACT AAG GGC TTC	1322
Val Arg Ile Pro Leu Arg Lys Pro Gln Arg Asn Pro Thr Lys Gly Phe	
225 230 235	
TAT GTT GGC ATG TCC GTT GCA GCC CTG CTG CTG CTG CTG CTT GCG AGC	1370
Tyr Val Gly Met Ser Val Ala Ala Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ser	
240 245 250	
ACC GTG GTT GTC ACC AGG TAC ATC ATT ATA AGA AAG AAG ATG GGC TCT	1418
Thr Val Val Val Thr Arg Tyr Ile Ile Ile Arg Lys Lys Met Gly Ser	
255 260 265	
CTG AGC TTT GTT GCC TTC CAT GTC TCT AAG AGT AGA GCT TTG CAG AAC	1466
Leu Ser Phe Val Ala Phe His Val Ser Lys Ser Arg Ala Leu Gln Asn	
270 275 280	
GCA GCG ATT GTG CAT CCC CGA GCT GAA GAC AAC ATC TAC ATT ATT GAA	1514
Ala Ala Ile Val His Pro Arg Ala Glu Asp Asn Ile Tyr Ile Ile Glu	
285 290 295 300	
GAT AGA TCT CGA GGT GCA GAA TGAGTCCCAG AGGCCTTCTG TGGGGCCTTC	1565
Asp Arg Ser Arg Gly Ala Glu	
305	

TGCCTGGGAT TACAGAGATC GTGACTGATT TCACAGAGTA AAATACCCAT TCCAGCTCCT 1625
 GGGAGATTTT GTGTTTTGGT TCTCCAGCT GCAGTGGAGA GGGTAACCCT CTACCCTGTA 1685
 TATGCAAAC TCGAGGTTAA CATCATCCTA ATTCTTGTAT CAGCAACACC TCAGTGTCTC 1745
 CACTCACTGC AGCGATTCTC TCAAATGTGA ACATTTTAGA AGTTTGTGTT TCCTTTTGTC 1805
 CATGTAATCA TTGGTAATAC AAGAATTTTA TCTTGTTTAT TAAAACCATT AATGAGAGGG 1865
 GAATAGGAAT TAAAAGCTGG TGGGAAGGGC CTCCTGAATT TAGAAGCACT TCATGATTGT 1925
 GTTTATCTCT TTTATTGTAA TTTGAAATGT TACTTCTATC CTTCCCAAGG GGCAAATCA 1985
 TGGGAGCATG GAGGTTTTAA TTGCCCTCAT AGATAAGTAG AAGAAGAGAG TCTAATGCCA 2045
 CCAATAGAGG TGGTTATGCT TTCTCACAGC TCTGGAAATA TGATCATTTA TTATGCAGTT 2105
 GATCTTAGGA TGAGGATGGG TTTCTTAGGA GGAGAGGTTA CCATGGTGAG TGGACCAGGC 2165
 ACACATCAGG GGAAGAAAAC AATGGATCAA GGGATTGAGT TCATTAGAGC CAITTCCTACT 2225
 CCACTTCTGT CTTGATGCTC AGTGTTCTTA AACTCACCCA CTGAGCTCTG AATTAGGTGC 2285
 AGGAGAGAGA CGTGCGAGAA CGAAAGAGGA AAGAAAGGAG AGAGAGCAGG ACACAGGCTT 2345
 TCTGCTGAGA GAAGTCCTAT TGCAGGTGTG ACAGTGTTTG GGACTIONCAC GGGTTTCCTT 2405
 CAGACTTCTA AGTTTCTAAA TCACTATCAT GTGATCATAT TTATTTTAA AATTATTCA 2465
 GAAAGACACC ACATTTTCAA TAATAAATCA GTTGTGCACA ATTAATAAAA TATTTTGTTC 2525
 GCTAAGAAGT AAAAAAAAAA AAAAAAAGTC GACGCGGCCG C 2566

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 2084 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: 145..1065

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

GCGGCCGCGT CGACGGTGCC TGTGAGTAAA TAGATCAGGG TCTCCTTCAC AGCACATTCT

CCAGGAAGCC GAGCAAACAT TAGTGCTATT TTACCCAGGA GGAAATCTAG GTGTAGAGAG	120
CTCTACGGAT CTAAGGTCAA CACC ATG GTT CAA CTT CAA GTC TTC ATT TCA	171
Met Val Gln Leu Gln Val Phe Ile Ser	
1 5	
GGC CTC CTG CTG CTT CTT CCA GGC TCT GTA GAT TCT TAT GAA GTA GTG	219
Gly Leu Leu Leu Leu Leu Pro Gly Ser Val Asp Ser Tyr Glu Val Val	
10 15 20 25	
AAG GGG GTG GTG GGT CAC CCT GTC ACA ATT CCA TGT ACT TAC TCA ACA	267
Lys Gly Val Val Gly His Pro Val Thr Ile Pro Cys Thr Tyr Ser Thr	
30 35 40	
CGT GGA GGA ATC ACA ACG ACA TGT TGG GGC CGG GGG CAA TGC CCA TAT	315
Arg Gly Gly Ile Thr Thr Thr Cys Trp Gly Arg Gly Gln Cys Pro Tyr	
45 50 55	
TCT AGT TGT CAA AAT ATA CTT ATT TGG ACC AAT GGA TAC CAA GTC ACC	363
Ser Ser Cys Gln Asn Ile Leu Ile Trp Thr Asn Gly Tyr Gln Val Thr	
60 65 70	
TAT CGG AGC AGC GGT CGA TAC AAC ATA AAG GGG CGT ATT TCA GAA GGA	411
Tyr Arg Ser Ser Gly Arg Tyr Asn Ile Lys Gly Arg Ile Ser Glu Gly	
75 80 85	
GAC GTA TCC TTG ACA ATA GAG AAC TCT GTT GAT AGT GAT AGT GGT CTG	459
Asp Val Ser Leu Thr Ile Glu Asn Ser Val Asp Ser Asp Ser Gly Leu	
90 95 100 105	
TAT TGT TGC CGA GTG GAG ATT CCT GGA TGG TTC AAC GAT CAG AAA ATG	507
Tyr Cys Cys Arg Val Glu Ile Pro Gly Trp Phe Asn Asp Gln Lys Met	
110 115 120	
ACC TTT TCA TTG GAA GTT AAA CCA GAA ATT CCC ACA AGT CCT CCA ACA	555
Thr Phe Ser Leu Glu Val Lys Pro Glu Ile Pro Thr Ser Pro Pro Thr	
125 130 135	
AGA CCC ACA ACT ACA AGA CCC ACA ACC ACA AGG CCC ACA ACT ATT TCA	603
Arg Pro Thr Thr Thr Arg Pro Thr Thr Thr Arg Pro Thr Thr Ile Ser	
140 145 150	
ACA AGA TCC ACA CAT GTA CCA ACA TCA ACC AGA GTC TCC ACC TCT ACT	651
Thr Arg Ser Thr His Val Pro Thr Ser Thr Arg Val Ser Thr Ser Thr	
155 160 165	
CCA ACA CCA GAA CAA ACA CAG ACT CAC AAA CCA GAA ATC ACT ACA TTT	699
Pro Thr Pro Glu Gln Thr Gln Thr His Lys Pro Glu Ile Thr Thr Phe	
170 175 180 185	
TAT GCC CAT GAG ACA ACT GCT GAG GTG ACA GAA ACT CCA TCA TAT ACT	747
Tyr Ala His Glu Thr Thr Ala Glu Val Thr Glu Thr Pro Ser Tyr Thr	
190 195 200	

CCT GCA GAC TGG AAT GGC ACT GTG ACA TCC TCA GAG GAG GCC TGG AAT Pro Ala Asp Trp Asn Gly Thr Val Thr Ser Ser Glu Glu Ala Trp Asn 205 210 215	795
AAT CAC ACT GTA AGA ATC CCT TTG AGG AAG CCG CAG AGA AAC CCG ACT Asn His Thr Val Arg Ile Pro Leu Arg Lys Pro Gln Arg Asn Pro Thr 220 225 230	843
AAG GGC TTC TAT GTT GGC ATG TCC GTT GCA GCC CTG CTG CTG CTG CTG Lys Gly Phe Tyr Val Gly Met Ser Val Ala Ala Leu Leu Leu Leu Leu 235 240 245	891
CTT GCG AGC ACC GTG GTT GTC ACC AGG TAC ATC ATT ATA AGA AAG AAG Leu Ala Ser Thr Val Val Val Thr Arg Tyr Ile Ile Ile Arg Lys Lys 250 255 260 265	939
ATG GGC TCT CTG AGC TTT GTT GCC TTC CAT GTC TCT AAG AGT AGA GCT Met Gly Ser Leu Ser Phe Val Ala Phe His Val Ser Lys Ser Arg Ala 270 275 280	987
TTG CAG AAC GCA GCG ATT GTG CAT CCC CGA GCT GAA GAC AAC ATC TAC Leu Gln Asn Ala Ala Ile Val His Pro Arg Ala Glu Asp Asn Ile Tyr 285 290 295	1035
ATT ATT GAA GAT AGA TCT CGA GGT GCA GAA TGAGTCCCAG AGGCCTTCTG Ile Ile Glu Asp Arg Ser Arg Gly Ala Glu 300 305	1085
TGGGGCCTTC TGCCTGGGAT TACAGAGATC GTGACTGATT TCACAGAGTA AAATACCCAT	1145
TCCAGCTCCT GGGAGATTTT GTGTTTTGGT TCTTCCAGCT GCAGTGGAGA GGGTAACCCT	1205
CTACCCTGTA TATGCAAAAC TCGAGGTAA CATCATCCTA ATTCTTGAT CAGCAACACC	1265
TCAGTGTCTC CACTCACTGC AGCGATTCTC TCAAATGTGA ACATTTTAGA AGTTTGTGTT	1325
TCCTTTGTC CATGTAATCA TTGGTAATAC AAGAATTTTA TCTTGTTTAT TAAAACCATT	1385
AATGAGAGGG GAATAGGAAT TAAAAGCTGG TGGGAAGGGC CTCCTGAATT TAGAAGCACT	1445
TCATGATTGT GTTTATCTCT TTTATTGTAA TTTGAAATGT TACTTCTATC CTTCCCAAGG	1505
GGCAAAATCA TGGGAGCATG GAGGTTTTAA TTGCCCTCAT AGATAAGTAG AAGAAGAGAG	1565
TCTAATGCCA CCAATAGAGG TGGTTATGCT TTCTCACAGC TCTGGAAATA TGATCATTTA	1625
TTATGCAGTT GATCTTAGGA TGAGGATGGG TTTCTTAGGA GGAGAGGTTA CCATGGTGAG	1685
TGGACCAGGC ACACATCAGG GGAAGAAAAC AATGGATCAA GGGATTGAGT TCATTAGAGC	1745
CATTTCCACT CCACTTCTGT CTTGATGCTC AGTGTTCTA AACTCACCCA CTGAGCTCTG	1805
AATTAGGTGC AGGGAGGAGA CGTGCAGAAA CGAAAGAGGA AAGAAAGGAG AGAGAGCAGG	1865
ACACAGGCTT TCTGCTGAGA GAAGTCTAT TGCAGGTGTG ACAGTGTGTTG GGACTIONCAC	1925

GGGTTTCCTT CAGACTTCTA AGTTTCTAAA TCACTATCAT GTGATCATAT TTATTTTAA 1985
 AATTATTTC A GAAAGACACC ACATTTTCAA TAATAAATCA GTTTGT CACA ATTAATAAAA 2045
 TATTTTGT TTT GCTAAGAAGT AAAAAGTCGA CGCGGCCGC 2084

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 307 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

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

Glu Val Thr Glu Thr Pro Ser Tyr Thr Pro Ala Asp Trp Asn Gly Thr
 195 200 205
 Val Thr Ser Ser Glu Glu Ala Trp Asn Asn His Thr Val Arg Ile Pro
 210 215 220
 Leu Arg Lys Pro Gln Arg Asn Pro Thr Lys Gly Phe Tyr Val Gly Met
 225 230 235 240
 Ser Val Ala Ala Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Val Val Val
 245 250 255
 Thr Arg Tyr Ile Ile Ile Arg Lys Lys Met Gly Ser Leu Ser Phe Val
 260 265 270
 Ala Phe His Val Ser Lys Ser Arg Ala Leu Gln Asn Ala Ala Ile Val
 275 280 285
 His Pro Arg Ala Glu Asp Asn Ile Tyr Ile Ile Glu Asp Arg Ser Arg
 290 295 300
 Gly Ala Glu
 305

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 2303 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: 107..1822

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

GCGGCCGCGT CGACTCGCAG GAGGCCGGCA CTCTGACTCC TGGTGGATGG GACTAGGGAG 60
 TCAGAGTCAA GCCCTGACTG GCTGAGGGCG GCGCTCCGA GTCAGC ATG GAA AGT 115
 Met Glu Ser
 1
 CTC TGC GGG GTC CTG GTA TTT CTG CTG CTG GCT GCA GGA CTG CCG CTC 163
 Leu Cys Gly Val Leu Val Phe Leu Leu Leu Ala Ala Gly Leu Pro Leu
 5 10 15
 CAG GCG GCC AAG CGG TTC CGT GAT GTG CTG GGC CAT GAG CAG TAT CCG 211
 Gln Ala Ala Lys Arg Phe Arg Asp Val Leu Gly His Glu Gln Tyr Pro
 20 25 30 35

GAT CAC ATG AGG GAG AAC AAC CAA TTA CGT GGC TGG TCT TCA GAT GAA 259
Asp His Met Arg Glu Asn Asn Gln Leu Arg Gly Trp Ser Ser Asp Glu
40 45 50

AAT GAA TGG GAT GAA CAG CTG TAT CCA GTG TGG AGG AGG GGA GAG GGC 307
Asn Glu Trp Asp Glu Gln Leu Tyr Pro Val Trp Arg Arg Gly Glu Gly
55 60 65

AGA TGG AAG GAC TCC TGG GAA GGA GGC CGT GTG CAG GCA GCC CTA ACC 355
Arg Trp Lys Asp Ser Trp Glu Gly Gly Arg Val Gln Ala Ala Leu Thr
70 75 80

AGT GAT TCA CCG GCC TTG GTG GGT TCC AAT ATC ACC TTC GTA GTG AAC 403
Ser Asp Ser Pro Ala Leu Val Gly Ser Asn Ile Thr Phe Val Val Asn
85 90 95

CTG GTG TTC CCC AGA TGC CAG AAG GAA GAT GCC AAC GGC AAT ATC GTC 451
Leu Val Phe Pro Arg Cys Gln Lys Glu Asp Ala Asn Gly Asn Ile Val
100 105 110 115

TAT GAG AGG AAC TGC AGA AGT GAT TTG GAG CTG GCT TCT GAC CCG TAT 499
Tyr Glu Arg Asn Cys Arg Ser Asp Leu Glu Leu Ala Ser Asp Pro Tyr
120 125 130

GTC TAC AAC TGG ACC ACA GGG GCA GAC GAT GAG GAC TGG GAA GAC AGC 547
Val Tyr Asn Trp Thr Thr Gly Ala Asp Asp Glu Asp Trp Glu Asp Ser
135 140 145

ACC AGC CAA GGC CAG CAC CTC AGG TTC CCC GAC GGG AAG CCC TTC CCT 595
Thr Ser Gln Gly Gln His Leu Arg Phe Pro Asp Gly Lys Pro Phe Pro
150 155 160

CGC CCC CAC GGA CGG AAG AAA TGG AAC TTC GTC TAC GTC TTC CAC ACA 643
Arg Pro His Gly Arg Lys Lys Trp Asn Phe Val Tyr Val Phe His Thr
165 170 175

CTT GGT CAG TAT TTT CAA AAG CTG GGT CGG TGT TCA GCA CGA GTT TCT 691
Leu Gly Gln Tyr Phe Gln Lys Leu Gly Arg Cys Ser Ala Arg Val Ser
180 185 190 195

ATA AAC ACA GTC AAC TTG ACA GTT GGC CCT CAG GTC ATG GAA GTG ATT 739
Ile Asn Thr Val Asn Leu Thr Val Gly Pro Gln Val Met Glu Val Ile
200 205 210

GTC TTT CGA AGA CAC GGC CGG GCA TAC ATT CCC ATC TCC AAA GTG AAA 787
Val Phe Arg Arg His Gly Arg Ala Tyr Ile Pro Ile Ser Lys Val Lys
215 220 225

GAC GTG TAT GTG ATA ACA GAT CAG ATC CCT ATA TTC GTG ACC ATG TAC 835
Asp Val Tyr Val Ile Thr Asp Gln Ile Pro Ile Phe Val Thr Met Tyr
230 235 240

CAG AAG AAT GAC CGG AAC TCG TCT GAT GAA ACC TTC CTC AGA GAC CTC 883
Gln Lys Asn Asp Arg Asn Ser Ser Asp Glu Thr Phe Leu Arg Asp Leu
245 250 255

CTG ATC TCT ATC CCT GGC AAA GAC CTA GGC TCC CCT CTG AGA ACA GTG Leu Ile Ser Ile Pro Gly Lys Asp Leu Gly Ser Pro Leu Arg Thr Val 485 490 495	1603
AAT GGT GTC CTG ATC TCC ATT GGC TGC CTG GCC ATG TTT GTC ACC ATG Asn Gly Val Leu Ile Ser Ile Gly Cys Leu Ala Met Phe Val Thr Met 500 505 510 515	1651
GTT ACC ATC TTG CTG TAC AAA AAA CAC AAG ACG TAC AAG CCA ATA GGA Val Thr Ile Leu Leu Tyr Lys Lys His Lys Thr Tyr Lys Pro Ile Gly 520 525 530	1699
AAC TGC ACC AGG AAC GTG GTC AAG GGC AAA GGC CTG AGT GTT TTT CTC Asn Cys Thr Arg Asn Val Val Lys Gly Lys Gly Leu Ser Val Phe Leu 535 540 545	1747
AGC CAT GCA AAA GCC CCG TTC TCC CGA GGA GAC CGG GAG AAG GAT CCA Ser His Ala Lys Ala Pro Phe Ser Arg Gly Asp Arg Glu Lys Asp Pro 550 555 560	1795
CTG CTC CAG GAC AAG CCA TGG ATG CTC TAAGTCTTCA CTCTCACTTC Leu Leu Gln Asp Lys Pro Trp Met Leu 565 570	1842
TGACTGGGAA CCCACTCTTC TGTGCATGTA TGTGAGCTGT GCAGAAGTAC ATGACTGGTA	1902
GCTGTTGTTT TCTACGGATT ATTGTAAAAT GTATATCATG GTTTAGGGAG CGTAGTTAAT	1962
TGGCATTTTA GTGAAGGGAT GGAAGACAG TATTTCTTCA CATCTGTATT GTGGTTTTTA	2022
TACTGTTAAT AGGGTGGGCA CATTGTGTCT GAAGGGGGAG GGGGAGGTCA CTGCTACTTA	2082
AGGTCCTAGG TTAAGTGGGA GAGGATGCCC CAGGCTCCTT AGATTTCTAC ACAAGATGTG	2142
CCTGAACCCA GCTAGTCTCG ACCTAAAGGC CATGCTTCAT CAACTCTATC TCAGCTCATT	2202
GAACATACCT GAGCACCTGA TGAATTATA ATGGAACCAA GCTTGTTGTA TGGTGTGTGT	2262
GTGTACATAA GATACTCATT AAAAAGACAG TCTATTAAAA A	2303

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 572 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: protein
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

Met Glu Ser Leu Cys Gly Val Leu Val Phe Leu Leu Leu Ala Ala Gly
1 5 10 15

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

Leu Asn Gly Thr Phe Asn Phe Asn Leu Thr Val Gln Thr Ala Val Pro
 305 310 315 320

Gly Pro Cys Pro Ser Pro Thr Pro Ser Pro Ser Ser Ser Thr Ser Pro
 325 330 335

Ser Pro Ala Ser Ser Pro Ser Pro Thr Leu Ser Thr Pro Ser Pro Ser
 340 345 350

Leu Met Pro Thr Gly His Lys Ser Met Glu Leu Ser Asp Ile Ser Asn
 355 360 365

Glu Asn Cys Arg Ile Asn Arg Tyr Gly Tyr Phe Arg Ala Thr Ile Thr
 370 375 380

Ile Val Asp Gly Ile Leu Glu Val Asn Ile Ile Gln Val Ala Asp Val
 385 390 395 400

Pro Ile Pro Thr Pro Gln Pro Asp Asn Ser Leu Met Asp Phe Ile Val
 405 410 415

Thr Cys Lys Gly Ala Thr Pro Thr Glu Ala Cys Thr Ile Ile Ser Asp
 420 425 430

Pro Thr Cys Gln Ile Ala Gln Asn Arg Val Cys Ser Pro Val Ala Val
 435 440 445

Asp Glu Leu Cys Leu Leu Ser Val Arg Arg Ala Phe Asn Gly Ser Gly
 450 455 460

Thr Tyr Cys Val Asn Phe Thr Leu Gly Asp Asp Ala Ser Leu Ala Leu
 465 470 475 480

Thr Ser Ala Leu Ile Ser Ile Pro Gly Lys Asp Leu Gly Ser Pro Leu
 485 490 495

Arg Thr Val Asn Gly Val Leu Ile Ser Ile Gly Cys Leu Ala Met Phe
 500 505 510

Val Thr Met Val Thr Ile Leu Leu Tyr Lys Lys His Lys Thr Tyr Lys
 515 520 525

Pro Ile Gly Asn Cys Thr Arg Asn Val Val Lys Gly Lys Gly Leu Ser
 530 535 540

Val Phe Leu Ser His Ala Lys Ala Pro Phe Ser Arg Gly Asp Arg Glu
 545 550 555 560

Lys Asp Pro Leu Leu Gln Asp Lys Pro Trp Met Leu
 565 570

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 1795 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: CDS
 (B) LOCATION: 278..1279

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

GCGGCCGCGT CGACGAAGCT GGAAGTCAG GGGCTGTTTC TGTGGGCAGC TTCCTGTC	60
CTTTGGAAGG CACAGAGCTC TCAGCTGCAG GGAACCTAACA GAGCTCTGAA GCCGTTATAT	120
GTGGTCTTCT CTCATTCCA GCAGAGCAGG CTCATATGAA TCAACCAACT GGGTGAAAAG	180
ATAAGTTGCA ATCTGAGATT TAAGACTTGA TCAGATACCA TCTGGTGGAG GGTACCAACC	240
AGCCTGTCTG CTCATTTTCC TTCAGGCTGA TCCCATA ATG CAT CCT CAA GTG GTC	295
Met His Pro Gln Val Val	
1 5	
ATC TTA AGC CTC ATC CTA CAT CTG GCA GAT TCT GTA GCT GGT TCT GTA	343
Ile Leu Ser Leu Ile Leu His Leu Ala Asp Ser Val Ala Gly Ser Val	
10 15 20	
AAG GTT GGT GGA GAG GCA GGT CCA TCT GTC ACA CTA CCC TGC CAC TAC	391
Lys Val Gly Gly Glu Ala Gly Pro Ser Val Thr Leu Pro Cys His Tyr	
25 30 35	
AGT GGA GCT GTC ACA TCA ATG TGC TGG AAT AGA GGC TCA TGT TCT CTA	439
Ser Gly Ala Val Thr Ser Met Cys Trp Asn Arg Gly Ser Cys Ser Leu	
40 45 50	
TTC ACA TGC CAA AAT GGC ATT GTC TGG ACC AAT GGA ACC CAC GTC ACC	487
Phe Thr Cys Gln Asn Gly Ile Val Trp Thr Asn Gly Thr His Val Thr	
55 60 65 70	
TAT CGG AAG GAC ACA CGC TAT AAG CTA TTG GGG GAC CTT TCA AGA AGG	535
Tyr Arg Lys Asp Thr Arg Tyr Lys Leu Leu Gly Asp Leu Ser Arg Arg	
75 80 85	
GAT GTC TCT TTG ACC ATA GAA AAT ACA GCT GTG TCT GAC AGT GGC GTA	583
Asp Val Ser Leu Thr Ile Glu Asn Thr Ala Val Ser Asp Ser Gly Val	
90 95 100	
TAT TGT TGC CGT GTT GAG CAC CGT GGG TGG TTC AAT GAC ATG AAA ATC	631
Tyr Cys Cys Arg Val Glu His Arg Gly Trp Phe Asn Asp Met Lys Ile	
105 110 115	

ACC GTA TCA TTG GAG ATT GTG CCA CCC AAG GTC ACG ACT ACT CCA ATT 679
 Thr Val Ser Leu Glu Ile Val Pro Pro Lys Val Thr Thr Thr Pro Ile
 120 125 130

GTC ACA ACT GTT CCA ACC GTC ACG ACT GTT CGA ACG AGC ACC ACT GTT 727
 Val Thr Thr Val Pro Thr Val Thr Thr Val Arg Thr Ser Thr Thr Val
 135 140 145 150

CCA ACG ACA ACG ACT GTT CCA ACG ACA ACT GTT CCA ACA ACA ATG AGC 775
 Pro Thr Thr Thr Thr Val Pro Thr Thr Thr Val Pro Thr Thr Met Ser
 155 160 165

ATT CCA ACG ACA ACG ACT GTT CCG ACG ACA ATG ACT GTT TCA ACG ACA 823
 Ile Pro Thr Thr Thr Thr Val Pro Thr Thr Met Thr Val Ser Thr Thr
 170 175 180

ACG AGC GTT CCA ACG ACA ACG AGC ATT CCA ACA ACA ACA AGT GTT CCA 871
 Thr Ser Val Pro Thr Thr Thr Ser Ile Pro Thr Thr Thr Ser Val Pro
 185 190 195

GTG ACA ACA ACG GTC TCT ACC TTT GTT CCT CCA ATG CCT TTG CCC AGG 919
 Val Thr Thr Thr Val Ser Thr Phe Val Pro Pro Met Pro Leu Pro Arg
 200 205 210

CAG AAC CAT GAA CCA GTA GCC ACT TCA CCA TCT TCA CCT CAG CCA GCA 967
 Gln Asn His Glu Pro Val Ala Thr Ser Pro Ser Ser Pro Gln Pro Ala
 215 220 225 230

GAA ACC CAC CCT ACG ACA CTG CAG GGA GCA ATA AGG AGA GAA CCC ACC 1015
 Glu Thr His Pro Thr Thr Leu Gln Gly Ala Ile Arg Arg Glu Pro Thr
 235 240 245

AGC TCA CCA TTG TAC TCT TAC ACA ACA GAT GGG AAT GAC ACC GTG ACA 1063
 Ser Ser Pro Leu Tyr Ser Tyr Thr Thr Asp Gly Asn Asp Thr Val Thr
 250 255 260

GAG TCT TCA GAT GGC CTT TGG AAT AAC AAT CAA ACT CAA CTG TTC CTA 1111
 Glu Ser Ser Asp Gly Leu Trp Asn Asn Asn Gln Thr Gln Leu Phe Leu
 265 270 275

GAA CAT AGT CTA CTG ACG GCC AAT ACC ACT AAA GGA ATC TAT GCT GGA 1159
 Glu His Ser Leu Leu Thr Ala Asn Thr Thr Lys Gly Ile Tyr Ala Gly
 280 285 290

GTC TGT ATT TCT GTC TTG GTG CTT CTT GCT CTT TTG GGT GTC ATC ATT 1207
 Val Cys Ile Ser Val Leu Val Leu Leu Ala Leu Leu Gly Val Ile Ile
 295 300 305 310

GCC AAA AAG TAT TTC TTC AAA AAG GAG GTT CAA CAA CTA AGA CCC CAT 1255
 Ala Lys Lys Tyr Phe Phe Lys Lys Glu Val Gln Gln Leu Arg Pro His
 315 320 325

AAA TCC TGT ATA CAT CAA AGA GAA TAGTCCCTGG AAACATAGCA AATGAACTTC 1309
 Lys Ser Cys Ile His Gln Arg Glu
 330

TATCTTGGCC ATCACAGCTG TCCAGAAGAG GGAATCTGT CTTAAAAACC AGCAAATCCA 1369
 ACGTGAGACT TCATTTGGAA GCATTGTATG ATTATCTCTT GTTTCTATGT TATACTTCCA 1429
 AATGTTGCAT TTCCTATGTT TTCCAAAGGT TTCAAATCGT GGGTTTTTAT TTCCTCCGTG 1489
 GGGAAACAAA GTGAGTCTAA CTCACAGGTT TAGCTGTTTT CTCATAACTC TGGAATGTG 1549
 ATGCATTAAG TACTGGATCT CTGAATTGGG GTAGCTGTTT TACCAGTTAA AGAGCCTACA 1609
 ATAGTATGGA ACACATAGAC ACCAGGGGAA GAAAATCATT TGCCAGGTGA TTTAACATAT 1669
 TTATGCAATT TTTTTTTTTT TTTTGTAGAT GGAGCTTTC TCTTGTTGCC CAGGCTGGAG 1729
 TGGGATGGTG AAATCTCGGC TCACTGTAAC CTCCACCTTC CGGTTCAAG CAATTCTCCC 1789
 GTCGAC 1795

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 334 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

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

Val Thr Thr Thr Pro Ile Val Thr Thr Val Pro Thr Val Thr Thr Val
 130 135 140

Arg Thr Ser Thr Thr Val Pro Thr Thr Thr Thr Val Pro Thr Thr Thr
 145 150 155 160

Val Pro Thr Thr Met Ser Ile Pro Thr Thr Thr Thr Val Pro Thr Thr
 165 170 175

Met Thr Val Ser Thr Thr Thr Ser Val Pro Thr Thr Thr Ser Ile Pro
 180 185 190

Thr Thr Thr Ser Val Pro Val Thr Thr Thr Val Ser Thr Phe Val Pro
 195 200 205

Pro Met Pro Leu Pro Arg Gln Asn His Glu Pro Val Ala Thr Ser Pro
 210 215 220

Ser Ser Pro Gln Pro Ala Glu Thr His Pro Thr Thr Leu Gln Gly Ala
 225 230 235 240

Ile Arg Arg Glu Pro Thr Ser Ser Pro Leu Tyr Ser Tyr Thr Thr Asp
 245 250 255

Gly Asn Asp Thr Val Thr Glu Ser Ser Asp Gly Leu Trp Asn Asn Asn
 260 265 270

Gln Thr Gln Leu Phe Leu Glu His Ser Leu Leu Thr Ala Asn Thr Thr
 275 280 285

Lys Gly Ile Tyr Ala Gly Val Cys Ile Ser Val Leu Val Leu Leu Ala
 290 295 300

Leu Leu Gly Val Ile Ile Ala Lys Lys Tyr Phe Phe Lys Lys Glu Val
 305 310 315 320

Gln Gln Leu Arg Pro His Lys Ser Cys Ile His Gln Arg Glu
 325 330

ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Пречистена и изолирана ДНК кодираща молекула от наранен бъбрек (KIM), като тази KIM е клетъчно повърхностен антиген селективно експресиран в пост-изсхемична бъбречна тъкан на бозайници, като ДНК кодира :

а) KIM (KIM-1) полипептид от 307 аминокиселини, притежаващ един IgG домен, муцинов домен, трансмембранен домен и цитоплазматичен домен, като IgG домена включва шест консервативни цистеина; или

б) KIM полипептид от 572 аминокиселини, притежаващ трансмембранен домен.

2. ДНК, съгласно претенция 1(а), характеризираща се с това, че кодира полипептид кодиран от инсерта на клон 3-2 (ATCC No. 98061), инсерта на клон 1-7 (ATCC No. 98060), или инсерта на клон H13-10-85.

3. ДНК, съгласно претенция 1(б), характеризираща се с това, че кодира полипептид кодиран от инсерта на клон 4-7 (ATCC No. 98062).

4. ДНК, съгласно претенция 1(а), характеризираща се с това, че притежава нуклеотидна последователност избрана измежду :

а) SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 6; или

б) слепени варианти на SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 6; или

В) разпадни варианти на SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 6.

5. ДНК, притежаваща последователност комплементарна на SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 6.

6. ДНК съгласно претенция 1 (б), характеризираща се с това, че притежава нуклеотидна последователност избрана измежду :

- а) SEQ ID NO: 4; или
- б) слепен вариант на SEQ ID NO: 4; или
- в) разпаден вариант на SEQ ID NO: 4.

7. ДНК притежаваща последователност комплементарна на SEQ ID NO: 4.

8. Пречистена и изолирана ДНК кодираща KIM-1 полипептид от 307 аминокиселини, притежаващ IgG домен, муцинов домен, трансмембранен домен и цитоплазматичен домен, като последователността на полипептида се избира измежду SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 7; или измежду аминокиселинно заместени варианти притежаващи най-малко 40% хомоложност с, и делящи най-малко 80% от цистеиновите остатъци на SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 7.

9. Пречистена и изолирана ДНК кодираща разтворим вариант на KIM-1 полипептид от 307 аминокиселини, притежаващ IgG домен, муцинов домен, трансмембранен домен и цитоплазматичен домен, като последователността на

полипептида се избира измежду SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 7; или измежду аминокиселинно заместени варианти притежаващи най-малко 40% хомоложност с, и делящи най-малко 80% от цистеиновите остатъци на SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 7.

10. Пречистена и изолирана ДНК кодираща слят протеин съдържащ :

а) KIM-1 полипептид от 307 аминокиселини, притежаващ един IgG домен, муцинов домен, трансмембранен домен и цитоплазматичен домен, като последователността на посочения полипептид се избира измежду SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 7; или измежду аминокиселинно заместени варианти притежаващи най-малко 40% хомоложност с, и делящи най-малко 80% от цистеиновите остатъци на SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 7; и

б) имуноглобулин, токсин или изобразимо съединение.

11. Пречистена и изолирана ДНК кодираща KIM полипептид от 572 аминокиселини, притежаваща трансмембранен домен, като последователността на посочения полипептид се избира измежду SEQ ID NO: 5 и измежду аминокиселинно заместени варианти притежаващи най-малко 40% хомоложност с, и делящи най-малко 80% от цистеиновите остатъци на SEQ ID NO: 5.

12. Пречистена и изолирана ДНК кодираща разтворим вариант на KIM полипептид от 572 аминокиселини, притежаваща трансмембранен домен, като

последователността на посочения полипептид се избира измежду SEQ ID NO: 5 и аминокиселинно заместени варианти притежаващи най-малко 40% хомоложност с, и делящи най-малко 80% от цистеиновите остатъци на SEQ ID NO: 5.

13. Пречистена и изолирана ДНК кодираща слят протейн съдържаща :

а) K1M полипептид от 572 аминокиселини, притежаващ трансмембранен домен като последователността на посочения полипептид се избира измежду SEQ ID NO: 5 и аминокиселинно заместени варианти притежаващи най-малко 40% хомоложност с, и делящи най-малко 80% от цистеиновите остатъци на SEQ ID NO: 5; и

б) имуноглобулин, токсин или изобразимо съединение.

14. Вектор, притежаващ нуклеотидна последователност съгласно претенции 8, 9, 10, 11, 12 или 13, присъстващ като инсерт, като векторът при необходимост може да включва контролна експресионна последователност операционно свързана с посочения инсерт.

15. Клетка гостоприемник включваща вектора, съгласно претенция 14.

16. Метод за продуциране на полипептид характеризиращ се с това, че включва етапите на култивиране на клетка гостоприемник, съгласно претенция 15, в среда за тъканни

култури и получаване на KIM полипептид експресирани от векторния инсерти в посочената клетка гостоприемник.

17. Пречистен и изолиран KIM протеин съдържащ :

а) KIM-1 полипептид от 307 аминокиселини, притежаващ един IgG домен, муцинов домен, трансмембранен домен и цитоплазматичен домен, като последователността на посочения полипептид се избира измежду SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 7; или

б) KIM-1 полипептид от 307 аминокиселини, притежаващ един IgG домен, муцинов домен, трансмембранен домен и цитоплазматичен домен, като последователността на посочения полипептид се избира измежду аминокиселинно заместени варианти притежаващи най-малко 40% хомоложност с, и делящи най-малко 80% от цистеиновите остатъци на SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 7; или,

в) KIM полипептид от 572 аминокиселини, притежаващ трансмембранен домен като последователността на посочения полипептид е SEQ ID NO: 5; или,

г) KIM полипептид от 572 аминокиселини, притежаващ трансмембранен домен като последователността на посочения полипептид се избира измежду аминокиселинно заместени варианти притежаващи най-малко 40% хомоложност с, и делящи най-малко 80% от цистеиновите остатъци на SEQ ID NO: 5.

18. Разтворим вариант на KIM протеин съгласно претенция 17.

19. Слят протеин включващ КІМ протеин от претенция 17; и имуноглобулин, токсин или изобразимо съединение.

20. КІМ протеин съгласно претенция 17, характеризиращ се с това, че е конюгиран с имуноглобулин, токсин, изобразимо съединение, или радионуклеотид.

21. Антитяло, което специфично се свързва към КІМ протеина от претенция 17.

22. Антитяло, съгласно претенция 21, характеризиращо се с това, че е конюгирано с токсин, изобразимо съединение или радионуклеотид.

23. Хибридома продуцираща антитялото от претенция 21.

24. Използуване на вектора от претенция 14 в терапията.

25. Използуване на КІМ протеина от претенция 17 в терапията.

26. Използуване на разтворим вариант на КІМ протеина от претенция 18 в терапията.

27. Използуване на КІМ слят протеин от претенция 19 в терапията.

28. Използуване на КИМ конюгат от претенция 20 в терапията.

29. Използуване на антитяло от претенция 21 в терапията.

30. Използуване на конюгирано антитяло от претенция 22 в терапията.

31. Фармацевтичен състав, характеризиращ се с това, че включва физиологично приемлив носител, в който е диспергиран вектор съгласно претенция 14, при терапевтично ефективна канценрация.

32. Фармацевтичен състав, характеризиращ се с това, че включва физиологично приемлив носител, в който е диспергиран при терапевтично ефективна канценрация, КИМ протеин от претенция 17, разтворим вариант на КИМ протеин от претенция 18, КИМ слят протеин от претенция 19, или КИМ конюгат от претенция 20.

33. Фармацевтичен състав, характеризиращ се с това, че включва физиологично приемлив носител, в който е диспергирано при терапевтично ефективна канценрация, антитяло от претенция 21 или конюгат на антитялото от претенция 22.

34. Метод за оценяване присъствието или причината за разлагането на бъбречното увреждане характеризиращ се с това, че включва етапите на измерване канценрацията на

KIM нуклеиновата киселина от претенция 8 или 11, или на KIM полипептида от претенция 17, в урината, серума, или в утайката на урината на субект страдащ от, или рискуващ бъбречно увреждане или заболяване.

35. Метод за изобразяване на клетки или тъкани продуциращи KIM полипептид от претенция 17.

36. Метод, съгласно претенция 35, характеризиращ се с това, че клетките или тъканите се поставят в субекта *in vivo* и изобразимият конюгат се прилага върху субекта.

37. Метод за насочване на токсин, радионуклеотид или изобразимо съединение към клетки, продуциращи KIM полипептид от претенция 17, характеризиращ се с това, че включва етапа на довеждането на клетките в контакт с KIM конюгираното анти тяло от претенция 22.

38. Метод, съгласно претенция 37, характеризиращ се с това, че клетките са KIM-експресиращи туморни клетки, които се поставят *in vivo* в субекта, и конюгатът се прилага върху субекта.

39. Метод за третиране на субект страдащ от или рискуващ развитие на бъбречно заболяване, характеризиращ се с това, че включва етапа на прилагане върху субект на фармацевтичен състав от претенция 31, 32 или 33.

40. Метод за спомагане на тъканния растеж в субект, характеризиращ се с това, че включва етапа на прилагане на върху субект на фармацевтичен състав съгласно претенция 31, 32 или 33.

41. Метод за спомагане преживяването на пострадалата тъкан на субект, характеризиращ се с това, че включва етапа на прилагане върху субект на фармацевтичен състав от претенция 31, 32 или 33.

42. Метод, съгласно претенция 40 или 41, характеризиращ се с това, че тъканта е бъбречна тъкан.

43. Метод, съгласно претенция 34, 36, 38, 39, 40 или 41, характеризиращ се с това, че субектът е човек.

1	CGGCGCGTCGACGGTGCCTGTGAGTAAATAGATCAGGGTCTCCTTCAC	50
51	AGCACATTCTCCAGGAAGCCGAGCAAACATTAGTGCTATTTTACCCAGGA	100
101	GGAAATCTAGGTGTAGAGAGCTCTACGGATCTAAGGTTTGGATCTGTACC	150
151	CAGTGCTTTTTTAGGTGTCTTTAGACATTTCTCAGGAAGATGTAGTCTCT	200
201	GTCACCATGTGTGGCTGAATTCTAGCTCAGTCCATCTTATTGTGTTAAG	250
251	GTAGTTGAAGTTTAGGAACCAACCAGTATGTCTCTGAGCAGAAGAGTACA	300
301	GTGTCCATCTTGAGGACAAGCTCATCTTTACCATTAGAGGGCTGGCCTTG	350
351	GCTTAGATTCTACCGAGAACATACTCTCTAATGGCTGCCCTCAGTTTTCT	400
401	CTGTTTGCTGTCTTATTTGTGTGTCATGGCCAGAAGTCATATGGATGGCTCT	450
451	ATGTGAGCAAGGACCCAGATAGAAGAGTGTATTTGGGGGAACAGGTTGCC	500
501	CTAACAGAGAGTCCTGTGGGATTCATGCAGTCAGGATGAAGACCTGATCA	550
551	GACAGAGTGTGCTGAGTGCCACGGCTAACCCAGAGTGACTTGTCACTGTCC	600
601	TTCAGGTCAACACCATGGTTCAACTTCAAGTCTTCATTTCAGGCCTCCTG	650
	M V Q L Q V F I S G L L	
651	CTGCTTCTTCCAGGCTCTGTAGATTCTTATGAAGTAGTGAAGGGGGTGGT	700
	L L L P G S V D S Y E V V K G V V	
701	GGGTCACCCTGTCACAATTCCATGTACTTACTCAACACGTGGAGGAATCA	750
	G H P V T I P C T Y S T R G G I T	
751	CAACGACATGTTGGGGCCGGGGCAATGCCCATATTCTAGTTGTCAAAT	800
	T T C W G R G Q C P Y S S C Q N	
801	ATACTTATTTGGACCAATGGATACCAAGTCACCTATCGGAGCAGCGGTG	850
	I L I W T N G Y Q V T Y R S S G R	
851	ATACAACATAAAGGGGCGTATTTCAGAAGGAGACGTATCCTTGACAATAG	900
	Y N I K G R I S E G D V S L T I E	
901	AGAACTCTGTTGATAGTGATAGTGGTCTGTATTGTTGCCGAGTGGAGATT	950
	N S V D S D S G L Y C C R V E I	
951	CCTGGATGGTTCAACGATCAGAAAATGACCTTTTCATTGGAAGTTAAACC	1000
	P G W F N D Q K M T F S L E V K P	
1001	AGAAATCCCACAAGTCCTCCAACAAGACCCACAACACTACAAGACCCACAA	1050
	E I P T S P P T R P T T T R P T T	
1051	CCACAAGGCCCAACTATTTCAACAAGATCCACACATGTACCAACATCA	1100
	T R P T T I S T R S T H V P T S	

FIG. 1a

1101	ACCAGAGTCTCCACCTCTACTCCAACACCAGAACAAACACAGACTCACAA T R V S T S T P T P E Q T Q T H K	1150
1151	ACCAGAAATCACTACATTTTATGCCCATGAGACAACTGCTGAGGTGACAG P E I T T F Y A H E T T A E V T E	1200
1201	AAACTCCATCATATACTCCTGCAGACTGGAATGGCACTGTGACATCCTCA T P S Y T P A D W N G T V T S S	1250
1251	GAGGAGGCCTGGAATAATCACACTGTAAGAATCCCTTTGAGGAAGCCGCA E E A W N N H T V R I P L R K P Q	1300
1301	GAGAAACCCGACTAAGGGCTTCTATGTTGGCATGTCCGTTGCAGCCCTGC R N P T K G F Y V G M S V A A L L	1350
1351	TGCTGCTGCTGCTTGCAGACACCGTGGTTGTCACCAGGTACATCATTATA L L L L A S T V V V T R Y I I I	1400
1401	AGAAAGAAGATGGGCTCTCTGAGCTTTGTTGCCTTCCATGTCTCTAAGAG R K K M G S L S F V A F H V S K S	1450
1451	TAGAGCTTTGCAGAACGCAGCGATTGTGCATCCCCGAGCTGAAGACAACA R A L Q N A A I V H P R A E D N I	1500
1501	TCTACATTATTGAAGATAGATCTCGAGGTGCAGAATGAGTCCCAGAGGCC Y I I E D R S R G A E	1550
1551	TTCTGTGGGGCCTTCTGCCTGGGATTACAGAGATCGTGACTGATTTACA A	1600
1601	GAGTAAAATACCCATTCCAGCTCCTGGGAGATTTTGTGTTTTGGTTCTTC A	1650
1651	CAGCTGCAGTGGAGAGGGTAACCCTCTACCCTGTATATGCAAACTCGAG A	1700
1701	GTTAACATCATCCTAATTCTTGTATCAGCAACACCTCAGTGTCTCCACTC A	1750
1751	ACTGCAGCGATTCTCTCAAATGTGAACATTTTAGAAGTTTGTGTTTCCTT A	1800
1801	TTGTCCATGTAATCATTGGTAATACAAGAATTTTATCTTGTATTATAAAA A	1850
1851	CCATTAATGAGAGGGGAATAGGAAT'AAAAGCTGCTGGGAAGGGCCTCCT A	1900
1901	GAATTTAGAAGCACTTCATGATTGTGTTTATCTCTTTTATTGTAATTTGA A	1950
1951	AATGTTACTTCTATCCTTCCCAAGGGGCAAATCATGGGAGCATGGAGGT A	2000
2001	TTTAATTGCCCTCATAGATAAGTAGAAGAAGAGAGTCTAATGCCACCAAT A	2050
2051	AGAGGTGGTTATGCTTTCTCACAGCTCTGGAAATATGATCATTATTATG A	2100
2101	CAGTTGATCTTAGGATGAGGATGGGTTTCTTAGGAGGAGAGGTTACCATG A	2150
2151	GTGAGTGGACCAGGCACACATCAGGGGAAGAAAACAATGGATCAAGGGAT A	2200
2201	TGAGTTCATTAGAGCCATTTCCACTCCACTTCTGTCTTGATGCTCAGTGT A	2250
2251	TCCTAAACTCACCCACTGAGCTCTGAATTAGGTGCAGGGAGGAGACGTGC A	2300

FIG. 1b

2301 AGAAACGAAAGAGGAAAGAAAGGAGAGAGAGCAGGACACAGGCTTTCTGC 2350
2351 TGAGAGAAGTCCTATTGCAGGTGTGACAGTGTTTGGGACTACCACGGGTT 2400
2401 TCCTTCAGACTTCTAAGTTTCTAAATCACTATCATGTGATCATATTTATT 2450
2451 TTTAAAATTATTTTCAGAAAGACACCACATTTTCAATAATAAATCAGTTTG 2500
2501 TCACAATTAATAAAATATTTTGTTTGCTAAGAAGTAAAAAAAAAAAAAAAA 2550
2551 AAGTCGACGCGGCCGC 2566

FIG. 1c

1 GCGGCCGCGTCGACGGTGCCTGTGAGTAAATAGATCAGGGTCTCCTTCAC 50
51 AGCACATTCTCCAGGAAGCCGAGCAAACATTAGTGCTATTTTACCCAGGA 100
101 GGAAATCTAGGTGTAGAGAGCTCTACGGATCTAAGGTCAACACCATGGTT 150
M V
151 CAACTTCAAGTCTTCATTTTCAGGCCTCCTGCTGCTTCTTCCAGGCTCTGT 200
Q L Q V F I S G L L L L L P G S V
201 AGATTCTTATGAAGTAGTGAAGGGGGTGGTGGGTACCCTGTCAACAATTC 250
D S Y E V V K G V V G H P V T I P
251 CATGTACTTACTCAACACGTGGAGGAATCACAACGACATGTTGGGGCCGG 300
C T Y S T R G G I T T T C W G R
301 GGGCAATGCCCATATTCTAGTTGTCAAAATATACTTATTTGGACCAATGG 350
G Q C P Y S S C Q N I L I W T N G
351 ATACCAAGTCACTATCGGAGCAGCGGTGCATACAACATAAAGGGGCGTA 400
Y Q V T Y R S S G R Y N I K G R I
401 TTTCAGAAGGAGACGTATCCTTGACAATAGAGAACTCTGTTGATAGTGAT 450
S E G D V S L T I E N S V D S D
451 AGTGGTCTGTATTGTTGCCGAGTGGAGATTCCTGGATGGTTCAACGATCA 500
S G L Y C C R V E I P G W F N D Q
501 GAAAATGACCTTTTCATTGGAAGTTAAACCAGAAATCCCACAAGTCCTC 550
K M T F S L E V K P E I P T S P P
551 CAACAAGACCCACAACACTACAAGACCCACAACCACAAGGCCCAACTATT 600
T R P T T T R P T T T R P T T I
601 TCAACAAGATCCACACATGTACCAACATCAACCAGAGTCTCCACCTCTAC 650
S T R S T H V P T S T R V S T S T
651 TCCAACACCAGAACAACACAGACTCACAACCAGAAATCACTACATTTT 700
P T P E Q T Q T H K P E I T T F Y
701 ATGCCCATGAGACAACTGCTGAGGTGACAGAAACTCCATCATATACTCCT 750
A H E T T A E V T E T P S Y T P
751 GCAGACTGGAATGGCACTGTGACATCCTCAGAGGAGGCCTGGAATAATCA 800
A D W N G T V T S S E E A W N N H
801 CACTGTAAGAATCCCTTTGAGGAAGCCGCAGAGAAACCCGACTAAGGGCT 850
T V R I P L R K P Q R N P T K G F
851 TCTATGTTGGCATGTCCGTTGCAGCCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCGAGC 900
Y V G M S V A A L L L L L L A S
901 ACCGTGGTTGTCACCAGGTACATCATTATAAGAAAGAAGATGGGCTCTCT 950
T V V V T R Y I I I R K K M G S L

FIG. 2a

951	GAGCTTTGTTGCCTTCCATGTCTCTAAGAGTAGAGCTTTGCAGAACGCAG S F V A F H V S K S R A L Q N A A	1000
1001	CGATTGTGCATCCCCGAGCTGAAGACAACATCTACATTATTGAAGATAGA I V H P R A E D N I Y I I E D R	1050
1051	TCTCGAGGTGCAGAATGAGTCCCAGAGGCCTTCTGTGGGGCCTTCTGCCT S R G A E	1100
1101	GGGATTACAGAGATCGTGACTGATTTACAGAGTAAAATACCCATTCCAG	1150
1151	CTCCTGGGAGATTTTGTGTTTTGGTTCTTCCAGCTGCAGTGGAGAGGGTA	1200
1201	ACCCTCTACCCTGTATATGCAAACTCGAGGTTAACATCATCCTAATTCT	1250
1251	TGTATCAGCAACACCTCAGTGTCTCCACTCACTGCAGCGATTCTCTCAA	1300
1301	TGTGAACATTTTAGAAGTTTGTGTTTCTTTTGTCCATGTAATCATTGGT	1350
1351	AATACAAGAATTTTATCTTGTATTATAAAACCATTAATGAGAGGGGAATA	1400
1401	GGAATTAAGCTGGTGGGAAGGGCCTCCTGAATTTAGAAGCACTTCATG	1450
1451	ATTGTGTTTATCTCTTTTATTGTAATTTGAAATGTTACTTCTATCCTTCC	1500
1501	CAAGGGGCAAATCATGGGAGCATGGAGTTTTAATTGCCCTCATAGATA	1550
1551	AGTAGAAGAAGAGAGTCTAATGCCACCAATAGAGGTGGTTATGCTTTCTC	1600
1601	ACAGCTCTGGAAATATGATCATTATTATGCAGTTGATCTTAGGATGAGG	1650
1651	ATGGGTTTCTTAGGAGGAGAGGTTACCATGGTGAGTGGACCAGGCACACA	1700
1701	TCAGGGGAAGAAAACAATGGATCAAGGGATTGAGTTCATTAGAGCCATTT	1750
1751	CCACTCCACTTCTGTCTTGATGCTCAGTGTTCTTAACTCACCCACTGAG	1800
1801	CTCTGAATTAGGTGCAGGGAGGAGACGTGCAGAAACGAAAGAGGAAAGAA	1850
1851	AGGAGAGAGAGCAGGACACAGGCTTTCTGCTGAGAGAAGTCCTATTGCAG	1900
1901	GTGTGACAGTGTGGGACTACCACGGGTTTCTTCAGACTTCTAAGTTT	1950
1951	CTAAATCACTATCATGTGATCATATTTATTTTTAAAATTATTTTCAGAAAG	2000
2001	ACACCACATTTTCAATAATAAATCAGTTTGTCAACAATTAATAAAATATTT	2050
2051	TGTTTGCTAAGAAGTAAAAGTCGACGCGGCCGC	2084

FIG. 2b

1 GCGGCCGCGTCTCGACTCGCAGGAGGCCGCGCACTCTGACTCCTGGTGGATGG 50
 51 GACTAGGGAGTCAGAGTCAAGCCCTGACTGGCTGAGGGCGGGCGCTCCGA 100
 101 GTCAGCATGGAAAGTCTCTGCGGGGTCTGGTATTTCTGCTGCTGGCTGC 150
 M E S L C G V L V F L L L A A
 151 AGGACTGCCGCTCCAGGCGGCCAAGCGGTTCCGTGATGTGCTGGGCCATG 200
 G L P L Q A A K R F R D V L G H E
 201 AGCAGTATCCGGATCACATGAGGGAGAACAACCAATTACGTGGCTGGTCT 250
 Q Y P D H M R E N N Q L R G W S
 251 TCAGATGAAAATGAATGGGATGAACAGCTGTATCCAGTGTGGAGGAGGGG 300
 S D E N E W D E Q L Y P V W R R G
 301 AGAGGGCAGATGGAAGGACTCCTGGGAAGGAGGCCGTGTGCAGGCAGCCC 350
 E G R W K D S W E G G R V Q A A L
 351 TAACCAGTGATTACCGGCCTTGGTGGGTTCCAATATCACCTTCGTAGTG 400
 T S D S P A L V G S N I T F V V
 401 AACCTGGTGTTCGCCAGATGCCAGAAGGAAGATGCCAACGGCAATATCGT 450
 N L V F P R C Q K E D A N G N I V
 451 CTATGAGAGGAACTGCAGAAGTGATTGGAGCTGGCTTCTGACCCGTATG 500
 Y E R N C R S D L E L A S D P Y V
 501 TCTACAACCTGGACCACAGGGGCAGACGATGAGGACTGGGAAGACAGCACC 550
 Y N W T T G A D D E D W E D S T
 551 AGCCAAGGCCAGCACCTCAGGTTCCCCGACGGGAAGCCCTTCCCTCGCCC 600
 S Q G Q H L R F P D G K P F P R P
 601 CCACGGACGGAAGAAATGGAACCTTCGTCTACGTCTTCCACACACTTGTC 650
 H G R K K W N F V Y V F H T L G Q
 651 AGTATTTTCAAAGCTGGGTGCGGTGTTTCAGCACGAGTTTCTATAAACACA 700
 Y F Q K L G R C S A R V S I N T
 701 GTCAACTTGACAGTTGGCCCTCAGGTATGGAAGTGATTGTCTTTTGAAG 750
 V N L T V G P Q V M E V I V F R R
 751 ACACGGCCGGGCATACATTCCCATCTCCAAAGTGAAGACGTGTATGTGA 800
 H G R A Y I P I S K V K D V Y V I
 801 TAACAGATCAGATCCCTATATTTCGTGACCATGTACCAGAAGAATGACCGG 850
 T D Q I P I F V T M Y Q K N D R
 851 AACTCGTCTGATGAAACCTTCCCTCAGAGACCTCCCCATTTTCTTCGATGT 900
 N S S D E T F L R D L P I F F D V
 901 CCTCATTACAGATCCCAGTCATTTCCCTCAACTACTCTGCCATTTCTACA 950
 L I H D P S H F L N Y S A I S Y K

FIG. 3a

951 AGTGGAAC TTTGGGGACAACACTGGCCTGTTTGTCTCCAACAATCACACT 1000
 W N F G D N T G L F V S N N H T
 1001 TTGAATCACACGTATGTGCTCAATGGAACCTTCAACTTTAACCTCACCGT 1050
 L N H T Y V L N G T F N F N L T V
 1051 GCAAAC TGCAGTGCCGGGACCATGCCCTCACCCACACCTTCGCCTTCTT 1100
 Q T A V P G P C P S P T P S P S S
 1101 CTTGACTTCTCCTTCGCCTGCATCTTCGCCTTCACCCACATTATCAACA 1150
 S T S P S P A S S P S P T L S T
 1151 CCTAGTCCCTCTTTAATGCCTACTGGCCACAAATCCATGGAGCTGAGTGA 1200
 P S P S L M P T G H K S M E L S D
 1201 CATTTC AATGAAAAC TGCCGAATAAACAGATATGGT TACTTCAGAGCCA 1250
 I S N E N C R I N R Y G Y F R A T
 1251 CCATCACA ATTGTAGATGGAATCCTAGAAGTCAACATCATCCAGGTAGCA 1300
 I T I V D G I L E V N I I Q V A
 1301 GATGTCCCAATCCCCACACCGCAGCCTGACAACTCACTGATGGACTTCAT 1350
 D V P I P T P Q P D N S L M D F I
 1351 TGTGACCTGCAAAGGGGGCCACTCCCACGGAAGCCTGTACGATCATCTCTG 1400
 V T C K G A T P T E A C T I I S D
 1401 ACCCCACCTGCCAGATCGCCCAGAACAGGGTGTGCAGCCCGGTGGCTGTG 1450
 P T C Q I A Q N R V C S P V A V
 1451 GATGAGCTGTGCCTCCTGTCCGTGAGGAGAGCCTTCAATGGGTCCGGCAC 1500
 D E L C L L S V R R A F N G S G T
 1501 GTACTGTGTGAATTTCACTCTGGGAGACGATGCAAGCCTGGCCCTCACCA 1550
 Y C V N F T L G D D A S L A L T S
 1551 GCGCCCTGATCTCTATCCCTGGCAAAGACCTAGGCTCCCCTCTGAGAACA 1600
 A L I S I P G K D L G S P L R T
 1601 GTGAATGGTGTCTGATCTCCATTGGCTGCCTGGCCATGTTTGTACCAT 1650
 V N G V L I S I G C L A M F V T M
 1651 GGT TACCATCTTGCTGTACAAAAACACAAGACGTACAAGCCAATAGGAA 1700
 V T I L L Y K K H K T Y K P I G N
 1701 ACTGCACCAGGAACGTGGTCAAGGGCAAAGGCCTGAGTGT TTTTCTCAGC 1750
 C T R N V V K G K G L S V F L S
 1751 CATGCAAAAAGCCCCGTTCTCCCGAGGAGACCGGGAGAAGGATCCACTGCT 1800
 H A K A P F S R G D R E K D P L L
 1801 CCAGGACAAGCCATGGATGCTCTAAGTCTTCACTCTCACTTCTGACTGGG 1850
 Q D K P W M L
 1851 AACCCACTCTTCTGTGCATGTATGTGAGCTGTGCAGAAGTACATGACTGG 1900

FIG. 3b

1901 TAGCTGTTGTTTTCTACGGATTATTGTAAAATGTATATCATGGTTTAGGG 1950
1951 AGCGTAGTTAATTGGCATTTTAGTGAAGGGATGGGAAGACAGTATTTCTT 2000
2001 CACATCTGTATTGTGGTTTTTATACTGTTAATAGGGTGGGCACATTGTGT 2050
2051 CTGAAGGGGGAGGGGGAGGTCACTGCTACTTAAGGTCCTAGGTAACTGG 2100
2101 GAGAGGATGCCCCAGGCTCCTTAGATTTCTACACAAGATGTGCCTGAACC 2150
2151 CAGCTAGTCCTGACCTAAAGGCCATGCTTCATCAACTCTATCTCAGCTCA 2200
2201 TTGAACATACCTGAGCACCTGATGGAATTATAATGGAACCAAGCTTGTTG 2250
2251 TATGGTGTGTGTGTGTACATAAGATACTCATTAAAAAGACAGTCTATTAA 2300
2301 AAA 2303

FIG. 3c

1	ATGCATCCTCAAGTGGTCATCTTAAGCCTCATCCTACATCTGGCAGATTC	50
	M H P Q V V I L S L I L H L A D S	
51	TGTAGCTGGTTCTGTAAAGTTGGTGGAGAGGCAGGTCCATCTGTCCACAC	100
	V A G S V K V G G E A G P S V T L	
101	TACCCTGCCACTACAGTGGAGCTGTACATCAATGTGCTGGAATAGAGGC	150
	P C H Y S G A V T S M C W N R G	
151	TCATGTTCTCTATTACATGCCAAAATGGCATTGTCTGGACCAATGGAAC	200
	S C S L F T C Q N G I V W T N G T	
201	CCACGTACCTATCGGAAGGACACACGCTATAAGCTATTGGGGGACCTTT	250
	H V T Y R K D T R Y K L L G D L S	
251	CAAGAAGGGATGTCTCTTTGACCATAGAAAATACAGCTGTGTCTGACAGT	300
	R R D V S L T I E N T A V S D S	
301	GGCGTATATTGTTGCCGTGTTGAGCACCGTGGGTGGTTCAATGACATGAA	350
	G V Y C C R V E H R G W F N D M K	
351	AATCACCGTATCATTGGAGATTGTGCCACCCAAGGTCACGACTACTCCAA	400
	I T V S L E I V P P K V T T T P I	
401	TTGTCACAACCTGTTCCAACCGTCACGACTGTTCGAACGAGCACCCTGTT	450
	V T T V P T V T T V R T S T T V	
451	CCAACGACAACGACTGTTCCAACGACAACCTGTTCCAACAACAATGAGCAT	500
	P T T T T V P T T T V P T T M S I	
501	TCCAACGACAACGACTGTTCCGACGACAATGACTGTTTCAACGACAACGA	550
	P T T T T V P T T M T V S T T T S	
551	GCGTTCGAACGACAACGAGCATTCCAACAACAACAAGTGTTCAGTGACA	600
	V P T T T S I P T T T S V P V T	
601	ACAACGGTCTCTACCTTTGTTCCCTCCAATGCCTTTGCCAGGCAGAACCA	650
	T T V S T F V P P M P L P R Q N H	
651	TGAACAGTAGCCACTTCACCATCTTCACCTCAGCCAGCAGAAACCCACC	700
	E P V A T S P S S P Q P A E T H P	
701	CTACGACACTGCAGGGAGCAATAAGGAGAGAACCCACCAGCTCACCATTG	750
	T T L Q G A I R R E P T S S P L	
751	TACTCTTACACAACAGATGGGAATGACACCGTGACAGAGTCTTCAGATGG	800
	Y S Y T T D G N D T V T E S S D G	
801	CCTTTGGAATAACAATCAAACCTCAACTGTTCCCTAGAACATAGTCTACTGA	850
	L W N N N Q T Q L F L E H S L L T	
851	CGGCCAATACCACTAAAGGAATCTATGCTGGAGTCTGTATTTCTGTCTTG	900
	A N T T K G I Y A G V C I S V L	

FIG. 4a

10/11

901 GTGCTTCTTGCTCTTTTGGGTGTCATCATTGCCAAAAGTATTTCTTCAA 950
V L L A L L G V I I A K K Y F F K
951 AAAGGAGGTTCAACAACATAAGACCCCATAAATCCTGTATACATCAAAGAG 1000
K E V Q Q L R P H K S C I H Q R E
1001 AA 1002

FIG. 4b

```

1 MHPQVVILSLILHLADSVAGSVKVGGEAGPSVTLPCHYS..GAVTSMCWN 48
  :: |||. | :||:| |::||.: | | .|..||:| | | | | | |:|:|. ||.
2 VQLQVFISGLLLLLLPGSVDSYEVVKGVVGHVPTIPCTYSTRGGITTCWG 51

49 RGSCSLFTCQNGI VWTNGTHV TYRKDTRYKLLGDLR RDVSLTI ENTAVS 98
  || |. . ||| :||| :| | | . . . | . : | | | | | | | | : . |
52 RGQCPYSSQN ILIWTNGYQV TYRSSGRYNIKGR ISEGDVSLTI ENSVDS 101

99 DSGVYCCRVEHRGW FNDMKITVSLE IVPKVTTTPIVTTVPTVTTVRTST 148
  |||:| | | | . ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
102 DSGLYCCRVEIPGW FNDQKMTFSLEV KP.....EIPTSP 135

149 TVPTTTTVPTTTVPTTMS IPTTTTVPTTMTVSTTTSVP TTTSIPTTTSP 198
  . . . | | | | | | | | | : | | | . . . | | | | | | | | | |
136 PTRPTTTTRPTTTTRPTT IS.....TRSHVPTSTRVSTSTPTPEQTQTHKP 180

199 VTTTVSTFVPPMPLPRQNHEPVATSPSSPQPAETHPTTLQGAIRREPTSS 248
  . || | . | . | | | . | . . . |
181 EITTFYA.....HETTAEVTETP..... 198

249 PLYSYTTDGN DTVTESSDGLWNNNQTQLFLEHSLLTANTTKGIYAGVCIS 298
  | | | . : . : . | | : | | | : . : | . . | . | | | : | . | : : .
199 ...SYTPADWNGTVTSS EAWNHTVRIPLRKP..QRNPTKGFYVGMSVA 243

299 VLVLLALLGVIIAKKY.FFKKEVQQLR.....PHKSCIHQRE 334
  . | : | | | : : : : : | : : | : : . |
244 ALLLLLLLASTVVVTRYIIIRKKGSLSFVAFHVS KSRALQNA AIVHPRA 292
    
```

FIG. 5