(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202293249 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.09

(22) Дата подачи заявки
2021.05.07

(51) Int. Cl. ***C07K 14/705*** (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ БЕЛКИ, ИНГИБИРУЮЩИЕ APRIL И BAFF, С БЕЛКОМ, ИНГИБИРУЮЩИМ Т-КЛЕТКИ, И БЕЗ НЕГО И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

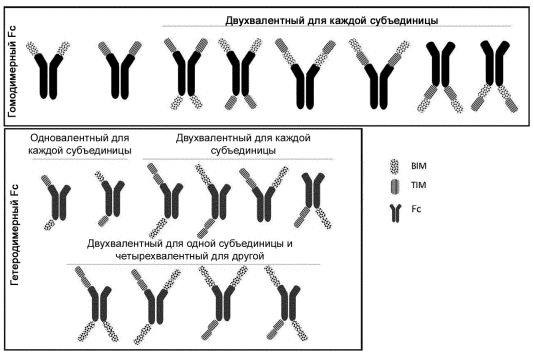
(31) **63/022,373; 63/034,361; 63/080,643**
(32) **2020.05.08; 2020.06.03; 2020.09.18**
(33) **US**
(86) **PCT/US2021/031432**
(87) **WO 2021/226553 2021.11.11**
(88) **2022.04.28**

(71) Заявитель:
ЭЛПАЙН ИММЬЮН САЙЕНСИЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Диллон Стейси, Риксон Марк, Эванс Лоуренс, Демонте Дэниэл Уильям, Кёйпер Джозеф Л., Пэнг Стэнфорд Л., Свенсон Райан (US)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) В настоящем изобретении представлены иммуномодулирующие белки, которые проявляют нейтрализующую активность в отношении BAFF и APRIL (или гетеротримеров BAFF/APRTL) отдельно или также в сочетании с ингибированием костимуляции Т-клеток. Представленные здесь иммуномодулирующие белки включают вариантные домены антигена созревания В-клеток (BCMA) отдельно, или мультидоменный иммуномодулирующий белок, который ингибирует ответы В-клеток, а также может ингибировать костимуляцию Т-клеток. Также предусмотрены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие иммуномодулирующие белки. Иммуномодулирующие белки обеспечивают терапевтическую пользу при различных иммунологических заболеваниях или состояниях. Также обеспечены композиции и способы получения и использования таких белков.



202293249 A1

202293249 A1

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ БЕЛКИ, ИНГИБИРУЮЩИЕ APRIL И BAFF, С БЕЛКОМ, ИНГИБИРУЮЩИМ Т-КЛЕТКИ, И БЕЗ НЕГО, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США 63/022373, озаглавленной «Иммуномодулирующие белки, ингибирующие APRIL и BAFF, с белком, ингибирующим Т-клетки, и без него, и способы их применения», поданной 8 мая 2020, к предварительной заявке на патент США 63/034361, озаглавленной «Иммуномодулирующие белки, ингибирующие APRIL и BAFF, с белком, ингибирующим Т-клетки, и без него, и способы их применения», поданной 3 июня 2020, и к предварительной заявке США 63/080643, озаглавленной «Иммуномодулирующие белки, ингибирующие APRIL и BAFF, с белком, ингибирующим Т-клетки, и без него, и способы их применения», поданной 18 сентября 2020, содержание каждой из которых включено посредством ссылки во всей полноте для всех целей.

Включение посредством ссылки списка последовательностей

Настоящая заявка подается вместе со списком последовательностей в электронном формате. Список последовательностей представлен в виде файла под названием 761612002340SeqList.TXT, созданного 4 мая 2021, размером 992 602 байта. Информация в электронном формате из Списка последовательностей включена посредством ссылки во всей полноте.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к иммуномодулирующим белкам, которые проявляют нейтрализующую активность в отношении BAFF и APRIL (или гетеротримеров BAFF/APRIL) отдельно или в сочетании с ингибированием костимуляции Т-клеток. Иммуномодулирующие белки включают вариантные домены антигена созревания В-клеток (BCMA) по отдельности и мультидоменные иммуномодулирующие белки, которые ингибируют ответы В-клеток, а также могут ингибировать костимуляцию Т-клеток. Настоящее изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие иммуномодулирующие белки. Иммуномодулирующие белки обеспечивают терапевтическое применение при различных иммунологических заболеваниях или состояниях. Предложены композиции и способы получения и применения таких белков.

Предшествующий уровень техники

Модуляция иммунного ответа путем вмешательства в процессы, связанные с

взаимодействием между растворимыми лигандами и их рецептором, представляет все больший интерес для медицины. В настоящее время биологические препараты, используемые для усиления или подавления иммунных ответов, обычно ограничиваются антителами (например, антителами к PD-1) или растворимыми рецепторами против одной молекулы клеточной поверхности (например, Fc-CTLA-4). Необходимы улучшенные терапевтические агенты, которые могут модулировать иммунный ответ, и в частности иммунный ответ B-клеток, а в некоторых случаях также иммунный ответ T-клеток. Предложены варианты осуществления, которые удовлетворяют такие потребности.

Изложение сущности изобретения

В настоящей заявке предложен иммуномодулирующий белок, который содержит по меньшей мере одну молекулу, ингибирующую T-клетки (TIM), которая связывается с рецептором, стимулирующим T-клетки, или с лигандом рецептора, стимулирующего T-клетки; и который является антагонистом активности рецептора, стимулирующего T-клетки; и по меньшей мере одну молекулу, ингибирующую B-клетки (BIM), которая связывается с лигандом рецептора, стимулирующего B-клетки, и/или является антагонистом активности рецептора, стимулирующего B-клетки. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок содержит по меньшей мере одну молекулу, ингибирующую T-клетки (TIM), которая связывается с рецептором, стимулирующим T-клетки, или лигандом рецептора, стимулирующего T-клетки; или является антагонистом активности рецептора, стимулирующего T-клетки; и по меньшей мере одну молекулу, ингибирующую B-клетки (BIM), которая связывается с лигандом рецептора, стимулирующего B-клетки, и/или является антагонистом активности рецептора, стимулирующего B-клетки.

В некоторых вариантах осуществления TIM связывается с лигандом рецептора, стимулирующего T-клетки. В некоторых вариантах осуществления рецептор, стимулирующий T-клетки, представляет собой CD28; а лиганд рецептора, стимулирующего T-клетки, представляет собой CD80 или CD86. В некоторых вариантах осуществления рецептор, стимулирующий T-клетки, представляет собой CD28; или лиганд рецептора, стимулирующего T-клетки, представляет собой CD80 или CD86.

В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой внеклеточный домен CTLA-4 или его связывающую часть, которая связывается с CD80 или CD86. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен CTLA-4 или его связывающая часть состоит из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2, вариантной последовательности аминокислот CTLA-4, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2;

или ее части, содержащей домен IgV. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен CTLA-4 состоит из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен CTLA-4 состоит из аминокислотной последовательности варианта CTLA-4, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO:1, или ее части, содержащей домен IgV, где вариантная последовательность содержит одну или несколько аминокислотных замен в SEQ ID NO:1 или ее части, содержащей домен IgV.

В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта CTLA-4 содержит аминокислотную замену C122S. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен CTLA-4 или его связывающая часть указана в SEQ ID NO:668.

В некоторых вариантах осуществления вариантный CTLA-4 связывается с эктодоменом CD80 и CD86, где при необходимости аффинность связывания с одним или обоими из CD80 и CD86 повышена по сравнению с последовательностью, представленной в SEQ ID NO:1 или ее частью, содержащей домен IgV.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен в варианте полипептида CLTA-4 включают аминокислотные замены, выбранные из L12F, R16H, G29W, T53S, M56T, N58S, L63P, L98Q или Y105L, или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают G29W, L98Q и Y105L. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен представляют собой G29W/N58S/L63P/Q82R/L98Q/Y105L. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен представляют собой L12F/R16H/G29W/M56T/L98Q/Y105L. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен представляют собой G29W/L98Q/Y105L.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид CTLA-4 представляет собой полипептид, который имеет по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90% или по меньшей мере примерно 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:1, и содержит одну или несколько аминокислотных замен, как описано.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид CTLA-4 представляет собой полипептид, который имеет по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90% или по меньшей мере примерно 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:2, и содержит одну или несколько аминокислотных замен, как описано.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен CTLA-4 или его

связывающая часть представлены в любой из SEQ ID NO:92, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:165 или SEQ ID NO:186 или их части, содержащей домен IgV.

В некоторых вариантах осуществления вариантный CTLA-4 состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:92, или ее части, содержащей домен IgV. В некоторых вариантах осуществления вариантный CTLA-4 состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:113, или ее части, содержащей домен IgV. В некоторых вариантах осуществления вариантный CTLA-4 состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:165, или ее части, содержащей домен IgV. В некоторых вариантах осуществления вариантный CTLA-4 состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:186, или ее части, содержащей домен IgV.

В некоторых вариантах осуществления лиганд рецептора, стимулирующего B-клетки, представляет собой APRIL или BAFF; а рецептором, стимулирующим B-клетки, является TACI, BCMA или BAFF-рецептор. В некоторых вариантах осуществления лиганд рецептора, стимулирующего B-клетки, представляет собой APRIL или BAFF; или рецептор, стимулирующий B-клетки, представляет собой TACI, BCMA или BAFF-рецептор.

В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой полипептид TACI, который состоит из внеклеточного домена TACI или его связывающей части, которая связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером BAFF/APRIL. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой внеклеточный домен TACI или его связывающую часть, которая имеет последовательность внеклеточного домена, указанную как (i) последовательность аминокислот, указанная в SEQ ID NO:709, (ii) последовательность аминокислот, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:709; или (iii) часть (i) или (ii), содержащую один или оба из домена CRD1 и домена CRD2, которые связываются с APRIL, BAFF или гетеротримером BAFF/APRIL. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой внеклеточный домен TACI или его связывающую часть, которая содержит домен CRD1 и домен CRD2.

В некоторых вариантах осуществления BIM, представляющая собой полипептид TACI, является такой, где полипептид TACI представляет собой укороченный внеклеточный домен TACI дикого типа, состоящий из последовательности, представленной в SEQ ID NO:516.

В некоторых вариантах осуществления BIM, представляющая собой полипептид TACI, является укороченным внеклеточным доменом TACI дикого типа или его вариантом, где укороченный внеклеточный домен TACI дикого типа содержит богатый цистеином домен 2 (CRD2), но не содержит всего богатого цистеином домена 1 (CRD1),

и/или где вариантный полипептид TACI содержит одну или несколько аминокислотных замен в укороченном внеклеточном домене TACI дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления BIM, представляющая собой полипептид TACI, является укороченным внеклеточным доменом TACI дикого типа или его вариантом, где укороченный внеклеточный домен TACI дикого типа состоит из непрерывной последовательности, содержащейся в аминокислотных остатках 67-118, которая включает аминокислотные остатки 71-104, со ссылкой на положения, указанные в SEQ ID NO:709, где вариантный полипептид TACI содержит одну или несколько аминокислотных замен в укороченном внеклеточном домене TACI дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления BIM, представляющая собой полипептид TACI, является полипептидом, в котором укороченный внеклеточный домен TACI дикого типа имеет длину 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 59, 50 или 51 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления укороченный внеклеточный домен TACI дикого типа состоит из аминокислотных остатков 68-110, представленных в SEQ ID NO:709. В некоторых вариантах осуществления полипептид TACI состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:528, или представляет собой ее вариант, содержащий одну или несколько аминокислотных замен в последовательности, представленной в SEQ ID NO:528.

В некоторых вариантах осуществления BIM, представляющая собой полипептид TACI, является полипептидом, где полипептид TACI является укороченным внеклеточным доменом TACI дикого типа, состоящим из последовательности, представленной в SEQ ID NO:528.

В некоторых вариантах осуществления BIM, представляющая собой полипептид TACI, является такой, где укороченный полипептид TACI или его вариант связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером BAFF/APRIL.

В некоторых вариантах осуществления BIM, представляющая собой полипептид TACI, является такой, что полипептид TACI, являющийся вариантным полипептидом TACI, имеет повышенную аффинность связывания с одним или обоими из APRIL и BAFF по сравнению с укороченным полипептидом TACI.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI содержит одну или несколько аминокислотных замен во внеклеточном домене (ECD) эталонного полипептида TACI или его фрагмента специфического связывания в положениях, выбранных из 74, 75, 76, 77, 78, 79, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 92, 95, 97, 98, 99, 101, 102 и 103, соответствующих нумерации, указанной в SEQ ID NO:709. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен выбраны из E74V, Q75E,

Q75R, G76S, K77E, F78Y, Y79F, L82H, L82P, L83S, R84G, R84L, R84Q, D85E, D85V, C86Y, I87L, I87M, S88N, I92V, Q95R, P97S, K98T, Q99E, A101D, Y102D, F103S, F103V, F103Y или их консервативных аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере одну из E74V, K77E, Y79F, L82H, L82P, R84G, R84L, R84Q, D85V или C86Y. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен представляют собой D85E/K98T, I87L/K98T, L82P/I87L, G76S/P97S, K77E/R84L/F103Y, Y79F/Q99E, L83S/F103S, K77E/R84Q, K77E/A101D, K77E/F78Y/Y102D, Q75E/R84Q, Q75R/R84G/I92V, K77E/A101D/Y102D, R84Q/S88N/A101D, R84Q/F103V, K77E/Q95R/A101D или I87M/A101D. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен представляют собой K77E/F78Y/Y102D. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен представляют собой Q75E/R84Q. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая представляет собой полипептид TACI, представляет собой вариантный полипептид TACI, представленный в SEQ ID NO:541. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая представляет собой полипептид TACI, представляет собой вариантный полипептид TACI, представленный в SEQ ID NO:542.

В некоторых вариантах осуществления BIM, представляющая собой полипептид TACI, является такой, где полипептид TACI является вариантным полипептидом TACI, содержащим одну или несколько аминокислотных замен во внеклеточном домене (ECD) эталонного полипептида TACI или его фрагмента специфического связывания в положениях, выбранных из 40, 59, 60, 61, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 92, 95, 97, 98, 99, 101, 102 и 103, что соответствует нумерации положений, указанной в SEQ ID NO:709. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен выбраны из W40R, Q59R, R60G, T61P, E74V, Q75E, Q75R, G76S, K77E, F78Y, Y79F, L82H, L82P, L83S, R84G, R84L, R84Q, D85E, D85V, C86Y, I87L, I87M, S88N, I92V, Q95R, P97S, K98T, Q99E, A101D, Y102D, F103S, F103V, F103Y или их консервативных аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере одну из E74V, K77E, Y79F, L82H, L82P, R84G, R84L, R84Q, D85V или C86Y. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере аминокислотную замену K77E. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере аминокислотную замену R84G. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере аминокислотную замену R84Q.

В некоторых вариантах осуществления эталонный полипептид TACI представляет собой укороченный полипептид, состоящий из внеклеточного домена TACI или его части специфического связывания, которая связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером BAFF/APRIL.

В некоторых вариантах осуществления эталонный полипептид TACI содержит (i) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:709, (ii) аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:709; или (iii) часть (i) или (ii), содержащую один или оба из домена CRD1 и домена CRD2, которые связываются с APRIL, BAFF или гетеротримером BAFF/APRIL. В некоторых вариантах осуществления в эталонном полипептиде TACI отсутствует N-концевой метионин. В некоторых вариантах осуществления эталонный полипептид TACI содержит домен CRD1 и домен CRD2. В некоторых вариантах осуществления эталонный полипептид TACI содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:516. В некоторых вариантах осуществления эталонный полипептид TACI состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:516. В некоторых вариантах осуществления эталонный полипептид TACI состоит по существу из домена CRD2. В некоторых вариантах осуществления эталонный полипептид TACI содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:528. В некоторых вариантах осуществления эталонный полипептид TACI состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:528.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен представляют собой D85E/K98T, I87L/K98T, R60G/Q75E/L82P, R60G/C86Y, W40R/L82P/F103Y, W40R/Q59R/T61P/K98T, L82P. /I87L, G76S/P97S, K77E/R84L/F103Y, Y79F/Q99E, L83S/F103S, K77E/R84Q, K77E/A101D, K77E/F78Y/Y102D, Q75E/R84Q, Q75R/R84G/I92V, K77E/A101D/Y102D, R84Q/S88N/A101D, R84Q/F103V, K77E/Q95R/A101D или I87M/A101D. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен представляют собой K77E/F78Y/Y102D. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен представляют собой Q75E/R84Q.

В некоторых вариантах осуществления BIM, представляющая собой полипептид TACI, является полипептидом, где вариантный полипептид TACI имеет по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90% или по меньшей мере примерно 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:709, и содержит одну или несколько аминокислотных замен, как описано.

В некоторых вариантах осуществления BIM, представляющая собой полипептид

TACI, является полипептидом, где вариантный полипептид TACI имеет по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90% или по меньшей мере примерно 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:719, и содержит одну или несколько аминокислотных замен, как описано.

В некоторых вариантах осуществления BIM, представляющая собой полипептид TACI, является полипептидом, где вариантный полипептид TACI имеет по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90% или по меньшей мере примерно 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:718, и содержит одну или несколько аминокислотных замен, как описано.

В некоторых вариантах осуществления BIM, представляющая собой полипептид TACI, является полипептидом, где вариантный полипептид TACI имеет по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90% или по меньшей мере примерно 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:516, и содержит одну или несколько аминокислотных замен, как описано.

В некоторых вариантах осуществления BIM, представляющая собой полипептид TACI, является полипептидом, где вариантный полипептид TACI имеет по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90% или по меньшей мере примерно 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:528, и содержит одну или несколько аминокислотных замен, как описано.

В некоторых вариантах осуществления BIM, представляющая собой полипептид TACI, является полипептидом, где вариантный полипептид TACI имеет повышенную аффинность связывания с одним или обоими из APRIL и BAFF по сравнению с эталонным полипептидом TACI. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI обладает повышенной аффинностью связывания с APRIL. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI обладает повышенной аффинностью связывания с BAFF. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI обладает повышенной аффинностью связывания с APRIL и BAFF. В некоторых вариантах осуществления повышенная аффинность связывания с BAFF или APRIL независимо увеличивается более чем в 1,2 раза, в 1,5 раза, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 6 раз, в 7 раз, в 8 раз, в 9 раз, в 10 раз, в 20 раз, в 30 раз, в 40 раз, в 50 раз или в 60 раз.

В некоторых вариантах осуществления BIM, которая представляет собой полипептид TACI, является полипептидом, где вариантный полипептид TACI содержит последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO:517-527, 536, 537, 682-701. В некоторых вариантах осуществления BIM, представляющая собой полипептид TACI, является полипептидом, где вариантный полипептид TACI содержит последовательность,

указанную в любой из SEQ ID NO:529-535, 538-550 или 673-681. В некоторых вариантах осуществления BIM, представляющая собой полипептид TACI, является полипептидом, где вариантный полипептид TACI состоит по существу или состоит из последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO:517-527, 536, 537, 682-701. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая представляет собой полипептид TACI, является полипептидом, где вариантный полипептид TACI состоит по существу или состоит из последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO:529-535, 538-550, 673-681.

В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой полипептид TACI, где вариантный полипептид TACI представлен в любой из SEQ ID NO:535, SEQ ID NO:541, SEQ ID NO:542 или SEQ ID NO:688.

В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой полипептид TACI, где вариантный полипептид TACI состоит по существу или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:535. В некоторых вариантах осуществления BIM, представляющая собой полипептид TACI, является такой, где вариантный полипептид TACI состоит по существу или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:541. В некоторых вариантах осуществления BIM, представляющая собой полипептид TACI, является полипептидом, где вариантный полипептид TACI состоит по существу или состоит из последовательности, приведенной в SEQ ID NO:542. В некоторых вариантах осуществления BIM, представляющая собой полипептид TACI, является полипептидом, где вариантный полипептид TACI состоит по существу или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:688. В некоторых вариантах осуществления BIM, представляющая собой полипептид TACI, является полипептидом, где вариантный полипептид TACI состоит по существу или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:535.

В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой полипептид BCMA, который состоит из внеклеточного домена BCMA или его связывающей части, которая связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером BAFF/APRIL. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен BCMA или его связывающая часть представляет собой последовательность внеклеточного домена, указанную как (i) последовательность аминокислот, указанная в SEQ ID NO:356, (ii) последовательность аминокислот, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:356; или (iii) часть (i) или (ii), содержащая домен CRD.

В некоторых вариантах осуществления полипептид BCMA состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:356. В некоторых вариантах

осуществления полипептид BCMA представляет собой вариантный полипептид BCMA, содержащий одну или несколько аминокислотных замен во внеклеточном домене (ECD) эталонного полипептида BCMA или фрагмента специфического связывания в положениях, выбранных из 9, 10, 11, 14, 16, 19, 20, 22, 25, 27, 29, 30, 31, 32, 35, 36, 39, 43, 45, 46, 47 и 48, что соответствует нумерации, указанной в SEQ ID NO:710.

В настоящей заявке предложен иммуномодулирующий белок, содержащий вариантный полипептид BCMA, который включает одну или несколько аминокислотных замен во внеклеточном домене (ECD) эталонного полипептида BCMA или его фрагмента специфического связывания в положениях, выбранных из 9, 10, 11, 14, 16, 19, 20, 22, 25, 27, 29, 30, 31, 32, 35, 36, 39, 43, 45, 46, 47 и 48, в соответствии с нумерацией положений, указанной в SEQ ID NO:710. В некоторых вариантах осуществления эталонный полипептид BCMA представляет собой полипептид, состоящий из внеклеточного домена BCMA или его части специфического связывания, которая связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером BAFF/APRIL. В некоторых вариантах осуществления эталонный полипептид BCMA содержит (i) последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:710, (ii) последовательность аминокислот, которая имеет по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO :710; или (iii) часть (i) или (ii), содержащую CRD. В некоторых вариантах осуществления эталонный BCMA не содержит N-концевой метионин.

В некоторых вариантах осуществления эталонный полипептид BCMA содержит (i) аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:356, (ii) аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:356; или (iii) часть (i) или (ii), содержащую CRD. В некоторых вариантах осуществления эталонный полипептид BCMA содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:356. В некоторых вариантах осуществления эталонный полипептид BCMA состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:356.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен полипептида BCMA выбраны из S9G, S9N, S9Y, Q10E, Q10P, N11D, N11S, F14Y, S16A, H19A, H19C, H19D, H19E, H19F, H19G, H19I, H19K, H19L, H19M, H19N, H19P, H19Q, H19R, H19S, H19T, H19V, H19W, H19Y, A20T, I22L, I22V, Q25E, Q25F, Q25G, Q25H, Q25I, Q25K, Q25L, Q25M, Q25S, Q25V, Q25Y, R27H, R27L, S29P, S30G, S30Y, N31D, N31G, N31H, N31K, N31L, N31M, N31P, N31S, N31V, N31Y, T32I, T32S, L35A, L35M, L35P, L35S, L35V, L35Y, T36A, T36G, T36N, T36M, T36S, T36V, R39L, R39Q, A43E, A43S, V45A, V45D, V45I, T46A, T46I, N47D, N47Y, S48G или их консервативных

аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен полипептида BCMA содержат по меньшей мере одну замену в положении 19. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна замена выбрана из H19A, H19C, H19D, H19E, H19F, H19G, H19I, H19K, H19L, H19M, H19N, H19P, H19Q, H19R, H19S, H19T, H19V, H19W, H19Y. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере аминокислотную замену H19L. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере аминокислотную замену H19K. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере аминокислотную замену H19R. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере аминокислотную замену H19Y.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен полипептида BCMA включают по меньшей мере одну замену в положении 25. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна замена выбрана из Q25E, Q25F, Q25G, Q25H, Q25I, Q25K, Q25L, Q25M, Q25S, Q25V, Q25Y.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен полипептида BCMA включают по меньшей мере одну замену в положении 31. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна замена выбрана из N31D, N31G, N31H, N31K, N31L, N31M, N31P, N31S, N31V, N31Y.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен полипептида BCMA включают по меньшей мере одну замену в положении 35. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна замена выбрана из L35A, L35M, L35P, L35S, L35V, L35Y.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен полипептида BCMA включают по меньшей мере одну замену в положении 36. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна замена выбрана из T36A, T36G, T36N, T36M, T36S, T36V.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен полипептида BCMA представляют собой H19Y/S30G; H19Y/V45A; F14Y/H19Y; H19Y/V45D; H19Y/A43E; H19Y/T36A; H19Y/I22V; N11D/H19Y; H19Y/T36M; N11S/H19Y; H19Y/L35P/T46A; H19Y/N47D; S9D/H19Y; H19Y/S30G/V45D; H19Y/R39Q; H19Y/L35P; S9D/H19Y/R27H; Q10P/H19Y/Q25H; H19Y/R39L/N47D; N11D/H19Y/N47D; H19Y/T32S; N11S/H19Y/S29P; H19Y/R39Q/N47D; S16A/H19Y/R39Q; S9N/H19Y/N31K/T46I;

H19Y/R27L/N31Y/T32S/T36A; N11S/H19Y/T46A; H19Y/T32I; S9G/H19Y/T36S/A43S; H19Y/S48G; S9N/H19Y/I22V/N31D; S9N/H19Y/Q25K/N31D; S9G/H19Y/T32S; H19Y/T36A/N47Y; H19Y/V45A/T46I; H19Y/Q25K/N31D; H19Y/Q25H/R39Q/V45D; H19Y/T32S/N47D; Q10E/H19Y/A20T/T36S; H19Y/T32S/V45I; H19F/Q25E/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25F/N31S/T36S; H19I/Q25F/N31S/T36V; H19F/Q25V/N31M/T36S; H19Y/Q25Y/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25I/N31M/L35A/T36S; H19I/Q25L/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25L/N31G/L35P/T36A; H19Y/I22L/N31G; H19F/I22V/Q25M/N31P/T36M; H19Y/N31L/L35Y/T36S; H19L/S30G/N31H/L35A; H19L/Q25S/N31V/L35S/T36V; H19L/Q25S/S30Y/N31G/L35M/T36V; H19F/Q25F/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25F/N31S/T36G; H19F/I22V/Q25S/N31V/L35S/T36V; H19F/Q25G/N31S/L35V/T36N; H19L/Q25H/N31D/L35S; или H19F/Q25F/N31S/L35Y/T36S.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен полипептида BCMA включают H19F, H19L, H19K, H19M, H19R, H10Y, N11D/H19Y/N47D, H19Y/R39Q/N47D; S16A/H19Y/R39Q, S9G/H19Y/T32S; H19Y/T36A/N47Y; или Q10E/H19Y/A20T/T36S. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен полипептида BCMA включают S16A/H19Y/R39Q.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA представляет собой полипептид, который имеет по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90% или по меньшей мере примерно 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:710 и содержит одну или несколько аминокислотных замен, как описано.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA представляет собой полипептид, который имеет по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90% или по меньшей мере примерно 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:356 и содержит одну или несколько аминокислотных замен, как описано.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA имеет до 10 аминокислотных замен по сравнению с эталонным полипептидом BCMA. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA имеет до 5 аминокислотных замен по сравнению с эталонным полипептидом BCMA. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO:356. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:356.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA обладает повышенной аффинностью связывания с одним или обоими из APRIL и BAFF по сравнению с эталонным полипептидом BCMA. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA обладает повышенной аффинностью связывания с APRIL. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA обладает повышенной аффинностью связывания с BAFF. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA обладает повышенной аффинностью связывания с APRIL и BAFF. В некоторых вариантах осуществления повышенная аффинность связывания с BAFF или APRIL независимо увеличивается более чем в 1,2 раза, в 1,5 раза, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 6 раз, в 7 раз, в 8 раз, в 9 раз, в 10 раз, в 20 раз, в 30 раз, в 40 раз, в 50 раз или в 60 раз.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA содержит последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO:357-435. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA состоит по существу или состоит из последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO:357-435. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA состоит по существу или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:357. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA состоит по существу или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:377. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA состоит по существу или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:380. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA состоит по существу или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:381. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA состоит по существу или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:390. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA состоит по существу или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:391. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA состоит по существу или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:396. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA состоит по существу или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:402. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA состоит по существу или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:405. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA состоит по существу или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:406. В некоторых вариантах

осуществления вариантный полипептид BCMA состоит по существу или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:407. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA состоит по существу или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:411. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA состоит по существу или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:405. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA состоит по существу или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:406.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок содержит гетерологичный фрагмент, который связан по меньшей мере с одним полипептидом BCMA. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный фрагмент представляет собой фрагмент, удлиняющий период полужизни, домен мультимеризации, нацеливающий фрагмент, который связывается с молекулой на поверхности клетки, или обнаруживаемую метку. В некоторых вариантах осуществления фрагмент, продлевающий период полужизни, содержит домен мультимеризации, альбумин, альбумин-связывающий полипептид, Про/Ала/Сер (PAS), С-концевой пептид (CTP) бета-субъединицы хорионического гонадотропина человека, полиэтиленгликоль (PEG), длинные неструктурированные гидрофильные последовательности аминокислот (XTEN), гидроксиэтилкрахмал (HES), малую молекулу, связывающую альбумин, или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок содержит Fc-область иммуноглобулина, которая связана по меньшей мере с одним полипептидом BCMA.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна TIM включает только одну TIM. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна TIM содержит 2, 3, 4 или 5 TIM, при необходимости, при этом все TIM являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления каждая TIM связана прямо или опосредованно через линкер, где при необходимости линкер представляет собой пептидный линкер. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна BIM содержит только одну BIM. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна BIM включает 2, 3, 4 или 5 BIM, при необходимости, при этом все BIM являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления каждая BIM связана прямо или опосредованно через линкер, где при необходимости линкер представляет собой пептидный линкер.

В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой пептидный линкер, выбранный из GSGGS (SEQ ID NO:592), GGGGS (G4S; SEQ ID NO:593),

GSGGGGS (SEQ ID NO:590), GGGGSGGGGS (2xGGGGS; SEQ ID NO:594), GGGGSGGGGSGGGGS (3xGGGGS; SEQ ID NO:595), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (4xGGGGS, SEQ ID NO:600), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (5XGGGGS, SEQ ID NO:671), GGGGSSA (SEQ ID NO:596) или их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна TIM и по меньшей мере одна BIM связаны прямо или опосредованно через линкер, при этом линкер при необходимости содержит пептидный линкер и/или фрагмент мультимеризации. В некоторых вариантах осуществления линкер включает пептидный линкер, и пептидный линкер выбран из GSGGS (SEQ ID NO:592), GGGGS (G4S; SEQ ID NO:593), GSGGGGS (SEQ ID NO:590), GGGGSGGGGS (2xGGGGS; SEQ ID NO:594), GGGGSGGGGSGGGGS (3xGGGGS; SEQ ID NO:595), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (4xGGGGS, SEQ ID NO:600), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (5XGGGGS, SEQ ID NO:671), GGGGSSA (SEQ ID NO:596) или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления линкер включает пептидный линкер, и пептидный линкер выбран из SEQ ID NO:711 (1xEAAAK), SEQ ID NO:712 (2xEAAAK), SEQ ID NO:713 (3xEAAAK), SEQ ID NO:714 (4xEAAAK), SEQ ID NO:715 (5xEAAAK), SEQ ID NO:665 (6xEAAAK). В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок представляет собой мономер и/или содержит одну полипептидную цепь.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна TIM является аминоконцевой по отношению по меньшей мере к одной BIM в полипептиде. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна TIM является карбоксиконцевой по отношению по меньшей мере к одной BIM в полипептиде.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок дополнительно содержит обнаруживаемую метку, при необходимости при этом обнаруживаемая метка представляет собой метку Flag, метку His или метку myc. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO:618-623, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с ними и сохраняет активность.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:703-708, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с ними и сохраняет активность.

В некоторых вариантах осуществления TIM и BIM связаны доменом мультимеризации. В некоторых вариантах осуществления домен мультимеризации способствует димеризации, тримеризации, тетрамеризации или пентамеризации. В некоторых вариантах осуществления домен мультимеризации представляет собой Fc-область иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок представляет собой димер. В некоторых вариантах осуществления Fc-область иммуноглобулина представляет собой гомодимерную Fc-область. В некоторых вариантах осуществления Fc-область иммуноглобулина представляет собой гетеродимерную Fc-область.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок представляет собой гомодимер, где все полипептиды димера одинаковы. В некоторых вариантах осуществления каждый полипептид содержит по меньшей мере одну TIM и по меньшей мере одну BIM, причем по меньшей мере одна TIM является аминоконцевой по отношению по меньшей мере к одной BIM в каждом полипептиде. В некоторых вариантах осуществления каждый полипептид содержит по меньшей мере одну TIM и по меньшей мере одну BIM, где по меньшей мере одна TIM является карбоксиконцевой по отношению по меньшей мере к одной BIM в каждом полипептиде.

В некоторых вариантах осуществления Fc-область иммуноглобулина представляет собой Fc-домен IgG2. В некоторых вариантах осуществления домен Fc IgG2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:729 или 853, или аминокислотную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:729 или 853. В некоторых вариантах осуществления домен Fc IgG2 указан в SEQ ID NO:729. В некоторых вариантах осуществления домен Fc IgG2 указан в SEQ ID NO:853.

В некоторых вариантах осуществления Fc-область иммуноглобулина представляет собой Fc-домен IgG4. В некоторых вариантах осуществления домен Fc IgG4 представляет собой вариантный домен Fc IgG4, содержащий аминокислотную замену S228P. В некоторых вариантах осуществления домен Fc IgG4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:731 или 854, или аминокислотную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:731 или 854. В некоторых вариантах осуществления домен Fc IgG4 указан в SEQ ID NO:731. В некоторых вариантах осуществления домен Fc IgG4 указан в SEQ ID NO:854.

В некоторых вариантах осуществления Fc иммуноглобулина представляет собой домен Fc IgG1 или вариант Fc, который проявляет пониженную аффинность связывания с

рецептором Fc и/или сниженную эффекторную функцию, при необходимости, по сравнению с доменом Fc IgG1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления Fc иммуноглобулина представляет собой домен Fc IgG1, и Fc включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:597. В некоторых вариантах осуществления Fc иммуноглобулина представляет собой домен Fc IgG4 либо дикого типа, либо модифицированный.

В некоторых вариантах осуществления Fc иммуноглобулина представляет собой вариантный домен Fc IgG1, содержащий одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из L234A, L234V, L235A, L235E, G237A, S267K, R292C, N297G и V302C, согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления Fc-область иммуноглобулина содержит аминокислотные замены L234A, L235E и G237A по нумерации EU или аминокислотные замены R292C, N297G и V302C по нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления Fc представляет собой вариантную Fc, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:589. В некоторых вариантах осуществления Fc представляет собой вариантную Fc, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:855.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок представляет собой гибридный белок BCMA-Fc. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок BCMA-Fc содержит структуру: полипептид BCMA (BCMA)-линкер-Fc-область. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок BCMA-Fc представлен в SEQ ID NO:629.

Также в настоящей заявке предложен иммуномодулирующий гибридный белок BCMA-Fc, который представляет собой гомодимер, содержащий две идентичные копии гибридного белка BCMA-Fc, представленного в SEQ ID NO:629, связанные ковалентной дисульфидной связью.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок представляет собой гибридный белок BCMA-Fc, который имеет структуру: (BCMA)-линкер-Fc область-линкер-(BCMA). В некоторых вариантах осуществления гибридный белок BCMA-Fc представлен в SEQ ID NO:809. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок BCMA-Fc представлен в SEQ ID NO:812.

В некоторых вариантах осуществления гибридный белок BCMA-Fc имеет структуру: область (BCMA)-линкер-(BCMA)-линкер-Fc. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок BCMA-Fc представлен в SEQ ID NO:813.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок, который содержит по меньшей мере одну TIM и по меньшей мере одну BIM, содержит

аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO:610-617, 624-627, 637, 638, 643, 644, 648, 653 и 654, или последовательность, которая проявляет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с ней и сохраняет активность.

В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой внеклеточный домен CTLA-4 дикого типа или его связывающую часть, а BIM представляет собой внеклеточный домен TACI или его связывающую часть, содержащую аминокислотные замены K77E/F78Y/Y102D, Q75E/R84Q или R84G, соответствующие положениям, указанным в SEQ ID NO:709. В некоторых вариантах осуществления TIM представлена в SEQ ID NO:1, а BIM представлена в SEQ ID NO:535, 541, 542 или 688. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:611, SEQ ID NO:788, SEQ ID NO:789, SEQ ID NO:790 или SEQ ID NO:792.

В настоящей заявке предложен иммуномодулирующий белок, который представляет собой гомодимер, содержащий две идентичные копии гибридного белка Fc, представленного в SEQ ID NO:611, связанные ковалентной дисульфидной связью.

В настоящей заявке предложен иммуномодулирующий белок, который представляет собой гомодимер, содержащий две идентичные копии гибридного белка Fc, представленного в SEQ ID NO:788, связанные ковалентной дисульфидной связью.

В настоящей заявке предложен иммуномодулирующий белок, который представляет собой гомодимер, содержащий две идентичные копии гибридного белка Fc, представленного в SEQ ID NO:789, связанные ковалентной дисульфидной связью.

В настоящей заявке предложен иммуномодулирующий белок, который представляет собой гомодимер, содержащий две идентичные копии гибридного белка Fc, представленного в SEQ ID NO:790, связанные ковалентной дисульфидной связью.

В настоящей заявке предложен иммуномодулирующий белок, который представляет собой гомодимер, содержащий две идентичные копии гибридного белка Fc, представленного в SEQ ID NO:792, связанные ковалентной дисульфидной связью.

В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой внеклеточный домен CTLA-4 дикого типа или его связывающую часть, а BIM представляет собой укороченный внеклеточный домен TACI, содержащий домен CRD2. В некоторых вариантах осуществления TIM указана в SEQ ID NO:1, а BIM указана в SEQ ID NO:528. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:759, SEQ ID NO:853, SEQ ID NO:854 или SEQ ID NO:791.

В настоящей заявке предложен иммуномодулирующий белок, который представляет собой гомодимер, содержащий две идентичные копии гибридного белка Fc, представленного в SEQ ID NO:759, связанные ковалентной дисульфидной связью.

В настоящей заявке предложен иммуномодулирующий белок, который представляет собой гомодимер, содержащий две идентичные копии гибридного белка Fc, представленного в SEQ ID NO:853, связанные ковалентной дисульфидной связью.

В настоящей заявке предложен иммуномодулирующий белок, который представляет собой гомодимер, содержащий две идентичные копии гибридного белка Fc, представленного в SEQ ID NO:854, связанные ковалентной дисульфидной связью.

В настоящей заявке предложен иммуномодулирующий белок, который представляет собой гомодимер, содержащий две идентичные копии гибридного белка Fc, представленного в SEQ ID NO:791, связанные ковалентной дисульфидной связью.

В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой внеклеточный домен CTLA-4 или его связывающую часть, содержащую аминокислотные замены G29W/L98Q/Y105L, соответствующие положениям, указанным в SEQ ID NO:1, а BIM представляет собой внеклеточный домен TACI или его связывающую часть, содержащую аминокислотные замены K77E/F78Y/Y102D, Q75E/R84Q или R84G, соответствующие положениям, указанным в SEQ ID NO:709. В некоторых вариантах осуществления TIM представлена в SEQ ID NO:186, а BIM представлена в SEQ ID NO:535, 541, 542 или 688. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:610.

В настоящей заявке предложен иммуномодулирующий белок, содержащий две идентичные копии гибридного белка Fc, представленного в SEQ ID NO:610, связанные ковалентной дисульфидной связью.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок, который включает по меньшей мере одну TIM и по меньшей мере одну BIM, содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO:601-609, 631-636, 645-647, 649-652, 655-659, или последовательность, которая проявляет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с ними и сохраняет активность.

В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой внеклеточный домен CTLA-4 дикого типа или его связывающую часть, а BIM представляет собой внеклеточный домен BCMA или его связывающую часть, содержащую аминокислотную замену H19L, соответствующую положениям, указанным в SEQ ID NO:710. В некоторых вариантах осуществления TIM указана в SEQ ID NO:1, а BIM указана в SEQ ID NO:406. В

некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:602.

В настоящей заявке предложен иммуномодулирующий белок, который представляет собой гомодимер, содержащий две идентичные копии гибридного белка Fc, представленного в SEQ ID NO:602, связанные ковалентной дисульфидной связью.

В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой внеклеточный домен CTLA-4 или его связывающую часть, содержащую аминокислотные замены G29W/L98Q/Y105L, соответствующие положениям, указанным в SEQ ID NO:1, а BIM представляет собой внеклеточный домен BCMA или его связывающую часть, содержащую аминокислотную замену H19L со ссылкой на положения, указанные в SEQ ID NO:710. В некоторых вариантах осуществления TIM указана в SEQ ID NO:186, а BIM указана в SEQ ID NO:406. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:601.

В настоящей заявке предложен иммуномодулирующий белок, который представляет собой гомодимер, содержащий две идентичные копии гибридного белка Fc, представленного в SEQ ID NO:601, связанные ковалентной дисульфидной связью.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок представляет собой гетеродимер, где каждый полипептид димера связан с Fc-доменом иммуноглобулина, индивидуально содержащим одну или несколько аминокислотных модификаций в Fc-домене дикого типа, для осуществления образования гетеродимера между полипептидами. В некоторых вариантах осуществления Fc иммуноглобулина дикого типа представляет собой Fc-домен IgG1. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных модификаций выбраны из модификации «выступ-во-впадину» и мутации заряда для уменьшения или предотвращения самоассоциации из-за отталкивания зарядов. В некоторых вариантах осуществления Fc-область дополнительно содержит одну или несколько аминокислотных замен для снижения аффинности связывания с Fc-рецептором и/или снижения эффекторной функции, при необходимости по сравнению с Fc доменом IgG1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен выбраны из L234A, L234V, L235A, L235E, G237A, S267K, R292C, N297G и V302C по нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления Fc-область иммуноглобулина содержит аминокислотные замены L234A, L235E и G237A по нумерации EU или аминокислотные замены R292C, N297G и V302C по нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления гетеродимер содержит первый полипептид, содержащий последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:662 или 663, и

второй полипептид, содержащий последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:660.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок блокирует связывание APRIL, BAFF или гетеротримера APRIL/BAFF с BCMA или TACI; и снижает уровни циркулирующих APRIL, BAFF или APRIL/BAFF в крови после введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок блокирует связывание APRIL, BAFF или гетеротримера APRIL/BAFF с BCMA или TACI; или снижает уровни циркулирующих APRIL, BAFF или APRIL/BAFF в крови после введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок снижает или ингибирует созревание, дифференцировку и пролиферацию B-клеток.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок блокирует связывание CD80 или CD86 с костимулирующим рецептором, при этом костимулирующий рецептор при необходимости представляет собой CD28; и иммуномодулирующий белок снижает или ингибирует костимуляцию Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок снижает или ингибирует созревание, дифференцировку или пролиферацию B-клеток. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок блокирует связывание CD80 или CD86 с костимулирующим рецептором, при этом костимулирующий рецептор при необходимости представляет собой CD28; или иммуномодулирующий белок снижает или ингибирует костимуляцию Т-клеток.

В настоящей заявке предложена молекула (молекулы) нуклеиновой кислоты, кодирующая иммуномодулирующий белок в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты представляет собой синтетическую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты представляет собой кДНК.

В настоящей заявке предложен вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления, описанных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор экспрессии. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор экспрессии млекопитающих или вирусный вектор.

В настоящей заявке предложена клетка, содержащая нуклеиновую кислоту в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящей заявке, или вектор в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку

млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека.

В настоящей заявке предложен способ получения иммуномодулирующего белка, включающий введение молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящей заявке, или вектора в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящей заявке, в клетку-хозяина в условиях, обеспечивающих экспрессию белка в клетке. В некоторых вариантах осуществления способ включает выделение или очистку иммуномодулирующего белка из клетки.

В настоящей заявке предложен иммуномодулирующий белок, полученный способом согласно любому из вариантов осуществления, описанных в настоящей заявке.

В настоящей заявке предложена фармацевтическая композиция, включающая иммуномодулирующий белок в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящей заявке.

В настоящей заявке предложен вариантный гибридный белок BCMA-Fc, включающий вариантный полипептид BCMA, Fc область и линкер между полипептидом BCMA и областью Fc, где вариантный полипептид BCMA содержит одну или несколько аминокислотных замен во внеклеточном домене (ECD) немодифицированного полипептида BCMA или его фрагмента специфического связывания, соответствующих положениям, выбранным из 9, 10, 11, 14, 16, 19, 20, 22, 25, 27, 29, 30, 31, 32, 35, 36, 39, 43, 45, 46, 47 и 48 со ссылкой на положения, указанные в SEQ ID NO:710.

В некоторых вариантах осуществления эталонный полипептид BCMA представляет собой полипептид, состоящий из внеклеточного домена BCMA или его специфически связывающей части, которая связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером BAFF/APRIL. В некоторых вариантах осуществления эталонный полипептид BCMA содержит (i) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:710, (ii) аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO :710; или (iii) часть (i) или (ii), содержащую CRD. В некоторых вариантах осуществления эталонный BCMA не содержит N-концевой метионин.

В некоторых вариантах осуществления эталонный полипептид BCMA содержит (i) аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:356, (ii) аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:356; или (iii) часть (i) или (ii), содержащую CRD. В некоторых вариантах осуществления эталонный полипептид BCMA содержит

последовательность, представленную в SEQ ID NO:356. В некоторых вариантах осуществления эталонный полипептид BCMA состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:356.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен выбраны из S9G, S9N, S9Y, Q10E, Q10P, N11D, N11S, F14Y, S16A, H19A, H19C, H19D, H19E, H19F, H19G, H19I, H19K, H19L, H19M, H19N, H19P, H19Q, H19R, H19S, H19T, H19V, H19W, H19Y, A20T, I22L, I22V, Q25E, Q25F, Q25G, Q25H, Q25I, Q25K, Q25L, Q25M, Q25S, Q25V, Q25Y, R27H, R27L, S29P, S30G, S30Y, N31D, N31G, N31H, N31K, N31L, N31M, N31P, N31S, N31V, N31Y, T32I, T32S, L35A, L35M, L35P, L35S, L35V, L35Y, T36A, T36G, T36N, T36M, T36S, T36V, R39L, R39Q, A43E, A43S, V45A, V45D, V45I, T46A, T46I, N47D, N47Y, S48G или их консервативной аминокислотной замены. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен содержат по меньшей мере одну замену в положении 19, где при необходимости по меньшей мере одна замена выбрана из H19A, H19C, H19D, H19E, H19F, H19G, H19I, H19K, H19L, H19M, H19N, H19P, H19Q, H19R, H19S, H19T, H19V, H19W, H19Y. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере аминокислотную замену H19L. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере аминокислотную замену H19K. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере аминокислотную замену H19R. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере аминокислотную замену H19Y.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере одну замену в положении 25, где при необходимости по меньшей мере одна замена выбрана из Q25E, Q25F, Q25G, Q25H, Q25I, Q25K, Q25L, Q25M, Q25S, Q25V, Q25Y. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен содержат по меньшей мере одну замену в положении 31, где при необходимости по меньшей мере одна замена выбрана из N31D, N31G, N31H, N31K, N31L, N31M, N31P, N31S, N31V, N31Y.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере одну замену в положении 35, где при необходимости по меньшей мере одна замена выбрана из L35A, L35M, L35P, L35S, L35V, L35Y. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере одну замену в положении 36, где при необходимости по меньшей мере одна замена выбрана из T36A, T36G, T36N, T36M, T36S, T36V. В

некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен представляют собой H19Y/S30G; H19Y/V45A; F14Y/H19Y; H19Y/V45D; H19Y/A43E; H19Y/T36A; H19Y/I22V; N11D/H19Y; H19Y/T36M; N11S/H19Y; H19Y/L35P/T46A; H19Y/N47D; S9D/H19Y; H19Y/S30G/V45D; H19Y/R39Q; H19Y/L35P; S9D/H19Y/R27H; Q10P/H19Y/Q25H; H19Y/R39L/N47D; N11D/H19Y/N47D; H19Y/T32S; N11S/H19Y/S29P; H19Y/R39Q/N47D; S16A/H19Y/R39Q; S9N/H19Y/N31K/T46I; H19Y/R27L/N31Y/T32S/T36A; N11S/H19Y/T46A; H19Y/T32I; S9G/H19Y/T36S/A43S; H19Y/S48G; S9N/H19Y/I22V/N31D; S9N/H19Y/Q25K/N31D; S9G/H19Y/T32S; H19Y/T36A/N47Y; H19Y/V45A/T46I; H19Y/Q25K/N31D; H19Y/Q25H/R39Q/V45D; H19Y/T32S/N47D; Q10E/H19Y/A20T/T36S; H19Y/T32S/V45I; H19F/Q25E/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25F/N31S/T36S; H19I/Q25F/N31S/T36V; H19F/Q25V/N31M/T36S; H19Y/Q25Y/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25I/N31M/L35A/T36S; H19I/Q25L/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25L/N31G/L35P/T36A; H19Y/I22L/N31G; H19F/I22V/Q25M/N31P/T36M; H19Y/N31L/L35Y/T36S; H19L/S30G/N31H/L35A; H19L/Q25S/N31V/L35S/T36V; H19L/Q25S/S30Y/N31G/L35M/T36V; H19F/Q25F/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25F/N31S/T36G; H19F/I22V/Q25S/N31V/L35S/T36V; H19F/Q25G/N31S/L35V/T36N; H19L/Q25H/N31D/L35S; или H19F/Q25F/N31S/L35Y/T36S.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают S16A/H19Y/R39Q. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA обладает повышенной аффинностью связывания с одним или обоими из APRIL и BAFF по сравнению с эталонным полипептидом TACI.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA обладает повышенной аффинностью связывания с APRIL. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA обладает повышенной аффинностью связывания с BAFF. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA обладает повышенной аффинностью связывания с APRIL и BAFF.

В некоторых вариантах осуществления повышенная аффинность связывания с BAFF или APRIL независимо увеличивается более чем в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или 60 раз. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA содержит последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:357-435. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA состоит по существу или состоит из последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO:357-435. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA состоит по существу или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:381. В некоторых

вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA состоит по существу или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:411. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA состоит по существу или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:405. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA состоит по существу или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:406.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит пептидный линкер, выбранный из GSGGS (SEQ ID NO:592), GGGGS (G4S; SEQ ID NO:593), GSGGGGS (SEQ ID NO:590), GGGGSGGGGS (2xGGGGS; SEQ ID NO:594), GGGGSGGGGSGGGGS (3xGGGGS; SEQ ID NO:595), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (4xGGGGS, SEQ ID NO:600), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (5XGGGGS, SEQ ID NO:671), GGGGSSA (SEQ ID NO:596) или их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления гибридный белок Fc представляет собой димер. В некоторых вариантах осуществления Fc-область иммуноглобулина представляет собой гомодимерную Fc-область.

В некоторых вариантах осуществления Fc иммуноглобулина представляет собой домен Fc IgG1 или вариант Fc, который проявляет пониженную аффинность связывания с рецептором Fc и/или сниженную эффекторную функцию, при необходимости по сравнению с доменом Fc IgG1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления Fc иммуноглобулина представляет собой домен Fc IgG1, и этот Fc включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:597. В некоторых вариантах осуществления Fc иммуноглобулина представляет собой вариантный домен Fc IgG1, содержащий одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из L234A, L234V, L235A, L235E, G237A, S267K, R292C, N297G и V302C, по нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления Fc-область иммуноглобулина содержит аминокислотные замены L234A, L235E и G237A по нумерации EU или аминокислотные замены R292C, N297G и V302C по нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления Fc иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:586. В некоторых вариантах осуществления Fc представляет собой вариантную Fc, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:589. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок Fc представляет собой гомодимер.

В некоторых вариантах осуществления гибридный белок Fc нейтрализует APRIL и BAFF. В некоторых вариантах осуществления IC50 для нейтрализации APRIL составляет менее 100 пМ, менее 50 пМ, менее 40 пМ, менее 30 пМ, менее 20 пМ, менее 10 пМ, менее 5 пМ или менее 1 пМ, или любое значение между любым из вышеперечисленных; и/или

IC50 для нейтрализации BAFF составляет менее 400 пМ, менее 300 пМ, менее 200 пМ, менее 100 пМ, менее 75 пМ, менее 50 пМ, менее 25 пМ или менее 10 пМ, или любое значение между любыми из вышеперечисленных.

В некоторых вариантах осуществления гибридный белок Fc блокирует связывание APRIL, BAFF или гетеротримера APRIL/BAFF с BCMA или TACI; и снижает уровни циркулирующих APRIL, BAFF или APRIL/BAFF в крови после введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления Fc иммуноглобулина представлен в SEQ ID NO:586. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок Fc блокирует связывание APRIL, BAFF или гетеротримера APRIL/BAFF с BCMA или TACI; или уровни циркулирующих APRIL, BAFF или APRIL/BAFF в крови после введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок снижает или ингибирует созревание, дифференцировку и/или пролиферацию В-клеток.

В настоящей заявке предоставлена молекула (молекулы) нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок Fc в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты представляет собой синтетическую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты представляет собой кДНК.

В настоящей заявке предложен вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор экспрессии. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор экспрессии млекопитающего для вирусного вектора.

В настоящей заявке предложена клетка, содержащая нуклеиновую кислоту в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящей заявке, или вектор в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека.

В настоящей заявке предложен способ получения иммуномодулирующего белка, включающий введение молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из вариантов осуществления, представленных в настоящей заявке, или вектора в соответствии с любым из вариантов осуществления, представленных в настоящей заявке, в клетку-хозяина в условиях, обеспечивающих экспрессию белка в клетке. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает выделение или очистку

гибридного белка Fc из клетки. В настоящей заявке предложен способ получения гибридного белка Fc, включающий введение молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из вариантов осуществления, представленных в настоящей заявке, или вектора в соответствии с любым из вариантов осуществления, представленных в настоящей заявке, в клетку-хозяина в условиях, обеспечивающих экспрессию белка в клетке.

В настоящей заявке предоставлен гибридный белок Fc, полученный способом согласно любому из вариантов осуществления, описанных в настоящей заявке.

В настоящей заявке предложена фармацевтическая композиция, включающая гибридный белок Fc по любому из вариантов осуществления, описанных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция является стерильной.

В настоящей заявке представлено изделие, включающий фармацевтическую композицию в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящей заявке, во флаконе или контейнере. В некоторых вариантах осуществления флакон или контейнер являются герметичными.

В настоящей заявке представлен набор, включающий фармацевтическую композицию по любому из вариантов осуществления, представленных в настоящей заявке, и инструкции по применению. В некоторых вариантах осуществления набор включает изделие по любому из вариантов осуществления, описанных в настоящей заявке, и инструкции по применению.

В настоящей заявке предложен способ снижения иммунного ответа у субъекта, включающий введение иммуномодулирующего белка в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящей заявке, субъекту, нуждающемуся в этом.

В настоящей заявке представлен способ снижения иммунного ответа у субъекта, включающий введение гибридного белка Fc в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящей заявке, субъекту, нуждающемуся в этом.

В настоящей заявке предложен способ снижения иммунного ответа у субъекта, включающий введение фармацевтической композиции в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящей заявке, субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления у субъекта снижается иммунный ответ В-клеток, в результате чего созревание, дифференцировка и/или пролиферация В-клеток снижаются или ингибируются. В некоторых вариантах осуществления у субъекта

снижаются циркулирующие уровни APRIL, BAFF или гетеротримера APRIL/BAFF в.

В настоящей заявке предложен способ снижения циркулирующих уровней APRIL, BAFF или гетеротримера APRIL/BAFF у субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления у субъекта снижается Т-клеточный иммунный ответ, в результате чего костимуляция Т-клеток снижается или ингибируется. В некоторых вариантах осуществления снижение иммунного ответа лечит заболевание или состояние у субъекта.

В настоящей заявке предложен способ лечения заболевания, расстройства или состояния у субъекта, включающий введение иммуномодулирующего белка в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящей заявке, субъекту, нуждающемуся в этом.

В настоящей заявке предложен способ лечения заболевания, расстройства или состояния у субъекта, включающий введение гибридного белка Fc в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящей заявке, субъекту, нуждающемуся в этом.

В настоящей заявке предложен способ лечения заболевания, расстройства или состояния у субъекта, включая введение фармацевтической композиции в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящей заявке, субъекту, нуждающемуся в этом.

Также в настоящей заявке предусмотрены любые иммуномодулирующие белки или содержащие их фармацевтические композиции для применения при лечении заболевания, расстройства или состояния у субъекта. Также в настоящей заявке предусмотрено применение любого из иммуномодулирующих белков или фармацевтических композиций, содержащих их, для получения лекарственного средства для лечения заболевания, расстройства или состояния у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления заболевание, расстройство или состояние представляет собой аутоиммунное заболевание, воспалительное состояние, В-клеточный рак, патологию, опосредованную антителами, заболевание почек, отторжение трансплантата, реакцию «трансплантат против хозяина» или вирусную инфекцию. Заболевание или состояние, которое лечат, может быть любым, как описано в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой аутоиммунное заболевание, выбранное из группы, состоящей из системной красной волчанки (СКВ); синдрома Шегрена, склеродермии, рассеянного склероза, диабета, полимиозита, первичного билиарного цирроза, IgA-нефропатии, неврита зрительного

нерва, амилоидоза, синдрома антифосфолипидных антител (АФС), аутоиммунного полигландулярного синдрома II типа (АПС II), аутоиммунного заболевания щитовидной железы (АИТ), болезни Грейвса, аутоиммунного адреналита и вульгарной пузырчатки. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой В-клеточный рак, и рак представляет собой миелому. В некоторых вариантах осуществления тип миеломы включает множественную миелому, плазмоцитому, множественную солитарную плазмоцитому и/или экстрамедуллярную миелому. В некоторых вариантах осуществления тип миеломы включает миелому легких цепей, несекреторную миелому и/или миелому IgD или IgE.

Краткое описание чертежей

На Фигуре 1 схематично представлен анализ функционального ингибирования с использованием рекомбинантных APRIL и BAFF с помощью BCMA или TACI. В анализе клетки Jurkat трансдуцировали репортером NF-κB на основе люциферазы и стабильно экспрессировали мышиный или человеческий TACI при экспрессии на клеточной поверхности. После активации рекомбинантным APRIL или BAFF эндогенные факторы транскрипции NF-κB связываются с элементами ответа ДНК, контролирующими транскрипцию гена люциферазы светлячка. Экспрессию люциферазы можно отслеживать, например, путем детекции с помощью реагента Bio-Glo™ и измерения с использованием ридера Cytation 3.

На Фигуре 2 показаны иллюстративные гибридные молекулы BCMA TD Fc для блокады передачи сигналов, опосредованной APRIL (верхняя панель) и BAFF (нижняя панель) человека. Примеры гибридов BCMA TD Fc инкубировали с APRIL (2 нМ) или BAFF (4 нМ) в течение 20 минут (комнатная температура при встряхивании) и затем добавляли в лунки, содержащие 150000 клеток Jurkat/TACI/NFκB-люциферазы, на 5 часов.

На Фигурах 3A-3B показана функция примерных гибридных молекул BCMA TD Fc отдельно или в сочетании с CTLA-4 IgD для блокады APRIL (верхняя панель каждой фигуры) или BAFF (нижняя панель каждой фигуры). На Фигурах 3A и 3B показано, что TD BCMA человека сохраняют свою функцию при сборке с CTLA-4.

На Фигурах 3C-3D показана функция примерных гибридных молекул TACI TD Fc при сборке с CTLA-4 IgD для блокады APRIL (верхняя панель каждой фигуры) или BAFF (нижняя панель каждой фигуры). На Фигурах 3C и 3D показано, что человеческие TACI TD сохраняют свою функцию при сборке с CTLA-4.

На Фигуре 4 показаны гибридные молекулы BCMA человека по отдельности или гибридные молекулы BCMA или TACI TD Fc, объединенные с CTLA-4 IgD для блокады опосредованной APRIL (левая панель) и BAFF (правая панель) передачи сигналов у

мышей.

На Фигуре 5A показаны гибридные молекулы BCMA TD Fc отдельно или в сочетании с CTLA-4 IgD для блокады передачи сигналов, опосредованных APRIL (верхняя панель) и BAFF (нижняя панель) у человека, по сравнению с TACI 13-118-Fc, TACI 30-110-Fc, и белимумабом.

На Фигуре 5B показаны гибридные молекулы TACI TD Fc человека при сборке с CTLA-4 IgD для блокады передачи сигналов, опосредованных APRIL (верхняя панель) и BAFF (нижняя панель) у человека, по сравнению с TACI 13-118-Fc, TACI 30-110-Fc и белимумабом.

На Фигуре 6 показано схематическое изображение анализа функционального ингибирования CD80/CD86-CD28-опосредованной костимуляции. Клетки Jurkat/IL-2 стабильно экспрессируют репортер люциферазы, управляемый промотором IL-2, при стимуляции анти-CD3 и анти-CD28 стимулами. Опосредованная рецептором передача сигналов приводит к люминесценции, опосредованной промотором IL-2, и биолюминесцентный сигнал можно обнаружить и количественно определить, например, с помощью субстрата Bio-Glo™ и люминометра.

На Фигурах 7A и 7B показано, что молекула дикого типа или CTLA-4 vIgD (домен IgSF) сохраняют функцию блокады CD80 (левая панель) или CD86 (правая панель) при включении в мультиспецифические (собранные) сконструированные молекулы с BCMA к TACI TD.

На Фигурах 8A-8F показана активность CTLA-4 vIgD отдельно или при включении в мультиспецифические (собранные) молекулы с BCMA или TACI TD для ингибирования человеческих фолликулярных хелперных Т- (T_{FH}) и В-клеток в анализе аутологичных T_{FH}-В-клеток. Культуры клеток В–Tfh инкубировали в течение 7 суток в присутствии титруемого (100 000 – 32 пМ) белка. Культивируемые клетки окрашивали на поверхности и анализировали с помощью проточной цитометрии на выход CD4+ Т-клеток (Фиг.8A), выход клеток CD4+CD40L+ (Фиг.8B), выход клеток CD4+ICOS+ (Фиг.8C), выход CD19+ В-клеток (Фиг.8D) и активацию/повышающую регуляцию CD86 В-клеток (Фиг.8E). Собирали надосадочную жидкость и определяли уровни секреции IgM с помощью ELISA (Фиг.8F). Данные представляют собой среднее значение (± SEM) трех повторов для каждого условия.

На Фигуре 9 показаны уровни антител IgM против KLH в сыворотке при терминации (день 19) на модели иммунизации KLH. Статистические различия между каждой группой определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа; приведены только значимые различия ($p < 0,05$).

На Фигуре 10 показаны уровни антител IgG1 против KLH в сыворотке при терминации (день 19) на модели иммунизации KLH. Статистические различия между каждой группой определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа; приведены только значимые различия ($p < 0,05$).

На Фигуре 11 показана масса селезенки при терминации (день 19) на модели KLH. Статистические различия между контрольным Fc и другими тестируемыми образцами определяли с помощью t-критерия; приведены только достоверные ($p < 0,05$) различия.

На Фигурах 12A-12H показаны данные анализа проточной цитометрией субпопуляций спленоцитов B-клеток и Tfh-клеток при терминации (день 19) на модели KLH. Селезенки обрабатывали и анализировали с помощью проточной цитометрии на B-клетки B220+ (Фиг.12A, Фиг.12E); B-клетки маргинальной зоны (MZ) (Фиг.12B, Фиг.12F); B-клетки зародышевого центра (GC) (Фиг.12C, Фиг.12G); фолликулярные T-хелперные (Tfh) клетки (Фиг.12D, Фиг.12H). «Контроль Fc» = Fc, указанный в SEQ ID NO:589. Статистически значимые различия ($p<0,05$) по сравнению с контролем Fc или абатацептом рассчитывали с помощью однофакторного ANOVA с нескорректированным критерием LSD Фишера.

На Фигурах 13A-13D показаны результаты анализа методом проточной цитометрии T-субпопуляций эффекторных клеток памяти спленоцитов при терминации (день 19) на модели KLH. Селезенки обрабатывали и анализировали с помощью проточной цитометрии на CD4+ (Фиг.13A, Фиг.13C) и CD8+ (Фиг.13B, Фиг.13D) T-эффекторные клетки памяти (Tem). «Контроль Fc» = Fc, указанный в SEQ ID NO:589. Статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с контролем Fc или абатацептом рассчитывали с помощью однофакторного дисперсионного анализа с нескорректированным LSD Фишера.

На Фигурах 14A-14I показан анализ параметров, оцененных на мышиной модели NZB/NZW СКВ человека. Оценивали показатели протеинурии (Фиг.14A), среднее процентное изменение массы тела (Фиг.14B) и процент выживаемости (Фиг.14C), начиная с 20-недельного возраста. Сыворотку анализировали на титры IgG против двухцепочечной ДНК (Фиг.14D) и азот мочевины крови (BUN) (Фиг.14E) (** по сравнению с Fc по нескорректированному критерию Данна, $p=0,0047$ и $p=0,0065$; *** по сравнению с Fc по нескорректированному критерию Данна, $p=0,0004$). Почки обрабатывали и анализировали с помощью гистологии в повторных срезах, окрашенных периодной кислотой по Шиффу (PAS), с отдельными фрагментами и общими гистологическими показателями, изображенными на Фиг.14F. Из замороженных почек также делали срезы и окрашивали для иммуногистохимического анализа отложения мышиных IgG и комплемента C3 в

клубочках, как показано на Фиг.14G и Фиг.14H, соответственно. Фиг.14I показывает гистологическую оценку ± стандартная ошибка среднего.

На Фигуре 15 схематично представлен иллюстративный гибридный белок BCMA-Fc.

На Фигуре 16 схематично представлены типичные форматы Fc гибридизации предоставленных мультидоменных (собранных) иммуномодулирующих белков.

На Фигурах 17A и 17B показаны типичные выравнивания последовательностей для идентификации соответствующих остатков в последовательности по сравнению с эталонной последовательностью. Символ «*» между двумя выровненными аминокислотами указывает, что выровненные аминокислоты идентичны. Символ «-» указывает на гэп в выравнивании. Примеры неограничивающих положений аминокислотных замен, описанных в настоящей заявке, выделены жирным шрифтом. На основе выравнивания двух сходных последовательностей, имеющих одинаковые общие остатки, специалист в данной области техники может идентифицировать «соответствующие» положения в последовательности путем сравнения с эталонной последовательностью, используя в качестве направляющих консервативные и идентичные аминокислотные остатки. На Фигуре 17A приведен пример выравнивания последовательности эталонного внеклеточного домена TACI, представленной в SEQ ID NO:709 (содержащей полный внеклеточный домен с CRD1 и CRD2 и инициирующим остатком метионина), с последовательностью внеклеточного домена TACI, представленной в SEQ ID NO:528 (содержащей только один CRD, CRD2); выравнивание идентичных остатков показывает, например, что аминокислотный остаток E7 в SEQ ID NO:528 соответствует остатку E74 в SEQ ID NO:709, аминокислотный остаток K10 в SEQ ID NO:528 соответствует остатку K77 в SEQ ID NO:709, аминокислотный остаток Y12 в SEQ ID NO:528 соответствует Y79 в SEQ ID NO:709, аминокислотный остаток L15 в SEQ ID NO:528 соответствует L82 в SEQ ID NO:709, аминокислотный остаток R17 в SEQ ID NO:528 соответствует R84 в SEQ ID NO:709; и аминокислотный остаток D16 в SEQ ID NO:528 соответствует D85 в SEQ ID NO:709. На Фигуре 17B приведен пример выравнивания эталонной последовательности внеклеточного домена BCMA, представленной в SEQ ID NO:710 (содержащей полный внеклеточный домен с CRD и инициирующим остатком метионина), с последовательностью внеклеточного домена BCMA, представленной в SEQ ID NO:356 (без инициирующего метионина); выравнивание идентичных остатков показывает, например, что аминокислотный остаток H18 в SEQ ID NO:356 соответствует остатку H19 в SEQ ID NO:710, а аминокислотный остаток R38 в SEQ ID NO:356 соответствует остатку R39 в SEQ ID NO:710. Квалифицированный

специалист может провести сходное выравнивание между двумя сходными белковыми последовательностями для идентификации соответствующих остатков, в том числе на основе приведенных здесь примеров и описания.

На Фигурах 18A-18D показан анализ параметров, оцененных на мышиной модели с гемоцианином лимфы улитки (KLH). Уровни ОП сывороточного IgM против KLH оценивали как первичный ответ (Фиг.18A) и вторичный ответ (Фиг.18B). Аналогично, уровни ОП анти-KLH IgG1 в сыворотке оценивали как первичный ответ (Фиг.18C), и как вторичный ответ (Фиг.18D).

На Фигурах 19A-19B показан анализ собранной селезенки, оцененной на модели иммунизации мышей гемоцианином лимфы (KLH). Селезенки обрабатывали и анализировали их массу (Фиг.19A), а также общее количество клеток (Фиг.19B).

На Фигуре 20 представлен анализ селезенки, оцененный на предмет состава популяции клеточных подтипов на мышиной модели с гемоцианином лимфы улитки (KLH), и показаны результаты анализа количества субпопуляций B-клеток относительно среднего значения для группы.

На Фигуре 21 показан анализ селезенки, оцененный на предмет подтипов клеточного фенотипа на мышиной модели с гемоцианином лимфы улитки (KLH), и показаны результаты для числа B-клеток зародышевого центра и плазматических клеток (Фиг.21).

На Фигурах 22A-22D показаны количества T-клеток на мышиной модели с гемоцианином лимфы улитки (KLH). Селезеночные CD3+, CD8+, CD4+ и фолликулярные хелперные T-клетки изображены на Фиг.22A, Фиг.22B, Фиг.22C и Фиг.22D, соответственно.

На Фигуре 23 показаны клеточные популяции Tcm и Tem на мышиной модели с гемоцианином лимфы улитки (KLH).

На Фигурах 24A-24B и Фигурах 25A-25B показана общая частота и степень сиалоаденита (Фиг.24A-24B) и инсулита (Фиг.25A-25B) у склонных к диабету мышей после лечения испытуемыми веществами 186-CTLA-4 Fc и CTLA4 186-GSG4S-Fc-(G4S)4 -TACI 541.

На Фигуре 26 показаны средние концентрации глюкозы в крови (мг/дл), измеренные в крови на 7, 8, 9 и 10 дни у мышей, склонных к диабету, после лечения испытуемыми веществами 186-CTLA-4 Fc и CTLA4 186-GSG4S-Fc-(G4S)4-TACI 541.

На Фигурах 27 и 28A-28C показаны результаты испытания in vivo на мышиной bm12 модели индуцированной СКВ, при использовании типичной мультидоменной молекулы CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541, и по сравнению только с WT-

TACI Fc. Концентрации BUN в сыворотке, собранной на 82-й день (завершение исследования), показаны на Фиг.27. На Фиг.28A-28C показаны уровни IgG2b (Фиг.28A), IgG2c (Фиг.28B) и IgG3 (Фиг.28C) в сыворотке, собранной в дни 14, 42 и 82.

На Фигуре 29 показаны уровни антител против двухцепочечной ДНК из сыворотки, собранной на мышиной bm12 модели индуцированной СКВ in vivo, при использовании типичной мультидоменной молекулы CTLA4186-GSG4S-Fc-(G4S)4-TACI 541.

Подробное описание изобретения

В настоящей заявке предусмотрены иммуномодулирующие белки, которые взаимодействуют с одним или несколькими другими иммунными рецепторами или лигандами, например, на антиген-презентирующих клетках или продуцируемых в виде растворимых факторов для подавления или снижения В-клеточного ответа или активности, а в некоторых случаях также и Т-клеточного ответа. Среди предоставленных иммуномодулирующих белков есть белки, которые связываются с лигандами BAFF или APRIL, чтобы нейтрализовать их активность и блокировать или антагонизировать активность рецепторов, стимулирующих В-клетки, такие как TACI или BCMA. Обеспеченные иммуномодулирующие белки могут представлять собой гибридные белки внеклеточного домена BCMA или его связывающей части (далее ECD BCMA) и домена мультимеризации, такого как Fc иммуноглобулина. Например, в настоящей заявке предусмотрены гибридные белки BCMA-Fc. Кроме того, предложены мультидоменные иммуномодулирующие белки (также называемые «собранными» иммуномодулирующими белками), которые содержат по меньшей мере один первый связывающий домен, который связывается с лигандами BAFF или APRIL, чтобы нейтрализовать их активность и блокировать или антагонизировать активность рецепторов, стимулирующих В-клетки, такими как как TACI или BCMA, и по меньшей мере один второй связывающий домен, который блокирует или антагонизировать активность рецептора, стимулирующего Т-клетки, например, путем связывания с лигандами CD80 или CD86, чтобы нейтрализовать их активность посредством взаимодействия с рецептором, стимулирующим Т-клетки, CD28 или отрицательным регуляторным белком CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующие белки, представленные в настоящей заявке, можно использовать для лечения заболеваний, расстройств или состояний, которые связаны с нарушением регуляции иммунного ответа, например, связаны с воспалительными или аутоиммунными симптомами, включая воспалительное или аутоиммунное заболевание.

Иммунная система опирается на иммунные контрольные точки для предотвращения аутоиммунитета (то есть для аутотолерантности) и для защиты тканей от

чрезмерного повреждения во время иммунного ответа, например, во время атаки против патогенной инфекции. В некоторых случаях, однако, иммунная система может выйти из строя, и аномальный иммунный ответ может развиваться против нормальной части тела или ткани, что приводит к аутоиммунному заболеванию или состоянию, или аутоиммунным симптомам. В других случаях нежелательный иммунный ответ может развиваться на чужеродную ткань, такую как трансплантат, что приводит к отторжению трансплантата.

В некоторых аспектах иммунотерапия, которая изменяет активность иммунных клеток, такую как активность В-клеток и/или активность Т-клеток, может лечить определенные заболевания, расстройства и состояния, при которых нарушена регуляция иммунного ответа. В частности, ингибирование или ослабление иммунного ответа, такого как В-клеточный ответ и/или Т-клеточный ответ, может быть необходимо для уменьшения или предотвращения нежелательного воспаления, аутоиммунных симптомов и/или отторжения трансплантата. Однако терапевтические подходы, направленные на модуляцию взаимодействий между лигандами и их рецепторами, опосредующими иммунный ответ, в том числе в иммунных синапсах, не вполне удовлетворительны. В некоторых случаях терапия для вмешательства и изменения иммуномодулирующего действия иммунных клеток, например, активация Т- или В-клеток ограничивается требованиями пространственной ориентации, а также размерными ограничениями, налагаемыми ограничениями иммунологического синапса. В некоторых аспектах существующие терапевтические препараты, включая препараты антител, могут быть неспособны взаимодействовать одновременно с несколькими белками-мишенями, участвующими в модуляции этих взаимодействий. Например, растворимые рецепторы и антитела обычно связываются конкурентно (например, не более чем с одним видом-мишенью одновременно) и, следовательно, не обладают способностью одновременно связываться с несколькими мишенями. Кроме того, фармакокинетические различия между препаратами, которые независимо воздействуют на один из этих рецепторов, могут создать трудности в поддержании на надлежащем уровне необходимой концентрации в крови комбинации лекарственных средств, воздействующей на две разные мишени, на протяжении всего курса лечения.

BAFF и APRIL являются членами суперсемейства TNF, которые связывают как TACI, так и BCMA на В-клетках; BAFF также связывает третий рецептор, BAFF-R. Вместе BAFF и APRIL поддерживают развитие, дифференцировку и выживание В-клеток. Их совместная нейтрализация резко снижает функцию В-клеток, включая выработку антител, тогда как ингибирование только BAFF или APRIL опосредует относительно

умеренные эффекты. При этом терапевтические средства на основе CTLA-4, которые блокируют костимуляцию Т-клеток, обеспечивают безопасное и умеренно эффективное ингибирование Т-клеток при многих заболеваниях, и хотя В-клеточная таргетная терапия продемонстрировала многообещающий терапевтический потенциал, но она не является полностью удовлетворительной.

Среди предлагаемых вариантов осуществления есть такие, которые обеспечивают улучшенную нейтрализующую активность и подавление или уменьшение ответов В-клеток. В некоторых вариантах осуществления улучшенная активность опосредована повышенным или улучшенным связыванием или взаимодействием предоставленных иммуномодулирующих белков с BAFF и/или APRIL. Например, в настоящей заявке предусмотрены вариантные полипептиды BCMA, которые содержат одну или несколько аминокислотных замен (замен или мутаций), которые придают белку улучшенную аффинность связывания с BAFF и/или APRIL. В частности, среди предлагаемых вариантов осуществления есть такие, которые обеспечивают улучшенное комбинированное ингибирование BAFF и APRIL. Кроме того, предоставленные иммуномодулирующие белки включают те, которые подавляют опосредованную BAFF и/или APRIL активность либо отдельно (например, BCMA-Fc), либо в сочетании с ингибированием костимуляции Т-клеток. Например, одним из предложенных вариантов осуществления является мультидоменный иммуномодулирующий белок молекулы, ингибитрующей В-клетки (BIM), представляющий собой часть внеклеточного домена, которая связывается с BAFF и/или APRIL (например, ECD BCMA), гибридизованный с молекулой, ингибирующей Т-клетки (TIM), которая представляет собой другой домен, связывающийся с лигандом рецептора, стимулирующего Т-клетки, и/или с рецептором, стимулирующим Т-клетки, для антагонизма или блокирования ответов Т-клеток. Предполагается, что предложенные иммуномодулирующие белки обеспечивают улучшенную активность по модуляции ответов В-клеток отдельно или вместе с модуляцией ответа Т-клеток. Таким образом, предложенные иммуномодулирующие белки обеспечивают эффективное и стойкое подавление заболевания при лечении аутоиммунных или воспалительных заболеваний, включая тяжелые аутоиммунные заболевания, связанные с В-клетками, такие как СКВ.

Например, предложенные варианты осуществления основаны на выводах о том, что направленная эволюция путем аффинной модификации домена TNFR (TD) эктодомена некоторых молекул (например, BCMA) способствовала разработке молекул с улучшенной аффинностью к APRIL и/или BAFF. Таким образом, модификация аффинности дает вариантный BCMA, который включает вариантный домен TNFR (vTD).

Гибридизация таких молекул с Fc иммуноглобулина приводит к получению иммуномодулирующих белков, которые подавляют активность и ответ B-клеток. Аналогичным образом, представленные варианты осуществления также основаны на результатах, которые дополнительно включают домены TD, например, TD дикого типа (WT) или vTD в виде мультидоменного гибрида с доменом суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF) молекулы, ингибирующей T-клетки, такой как внеклеточный домен CTLA-4, дополнительно усиливая иммуносупрессивную активность. Такая активность может быть дополнительно улучшена путем направленной эволюции посредством модификации аффинности домена IgSF CTLA-4 для получения вариантного домена IgSF (vIgD) для дальнейшего повышения аффинности к лигандам CD80 и/CD86, которые являются лигандами костимулирующего рецептора CD28 и ингибирующего рецептора CTLA-4. Приведенные здесь данные демонстрируют, что эти иммуномодулирующие белки последовательно проявляют мощную иммуносупрессивную активность и эффективность in vitro и in vivo, превосходя существующие и/или одобренные иммуномодуляторы, такие как белимумаб, абатацепт, атацицепт или телитацицепт. Таким образом, такие биологические препараты могут быть привлекательными кандидатами на разработку для лечения тяжелых аутоиммунных и/или воспалительных заболеваний, включая заболевания, связанные с B-клетками, такие как СКВ, синдром Шегрена и другие заболевания соединительной ткани.

Все публикации, включая патентные документы, научные статьи и базы данных, упомянутые в настоящей заявке, включены посредством ссылки во всей полноте для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация была включена в качестве ссылки по отдельности. Если определение, изложенное в настоящей заявке, противоречит или иным образом несовместимо с определением, изложенным в патентах, заявках, опубликованных заявках и других публикациях, которые включены в настоящий документ в качестве ссылки, определение, изложенное в настоящей заявке, имеет преимущественную силу над определением, которое включено в настоящий документ посредством ссылки.

Заголовки разделов, используемые в настоящей заявке, предназначены только для организационных целей и не должны толковаться как ограничивающие описываемый продукт.

I. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Если не указано иное, все термины в области техники, обозначения и другие технические и научные термины или терминология, используемые в настоящей заявке, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к

которой относится заявленный продукт изобретения. В некоторых случаях термины с общепринятыми значениями определены здесь для ясности и/или для удобства ссылки, и включение таких определений здесь не обязательно должно толковаться как представляющее существенное отличие от того, что обычно понимается в данной области техники.

Как используется в описании и прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа «включают множественное число, если в контексте явно не указано иное.

Используемый в настоящей заявке термин «примерно» относится к обычному диапазону ошибок для соответствующего значения, легко известному специалисту в данной области техники. Ссылка на «приблизительные» значения или параметры в настоящей заявке включает (и описывает) варианты осуществления, которые направлены на это значение или параметр как таковой. Например, описание, относящееся к «примерно X», включает в себя описание «X».

Термин «модифицированный по аффинности», используемый в контексте домена белка, означает белок млекопитающего, имеющий измененную аминокислотную последовательность во внеклеточном домене или его специфически связывающей части (относительно соответствующего родительского или немодифицированного домена дикого типа), таким образом, что он имеет повышенную или пониженную активность связывания, такую как аффинность связывания по меньшей мере с одним из своих партнеров по связыванию (альтернативно «контр-структурами») по сравнению с родительским доменом дикого типа или немодифицированным (т.е. доменом с немодифицированной аффинностью) белком. В некоторых вариантах осуществления домен с модифицированной аффинностью может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более различий аминокислот, таких как замены аминокислот, в домене дикого типа или немодифицированном домене. Повышение или понижение связывающей активности, т.е. аффинности связывания можно определить с помощью хорошо известных анализов связывания, включая проточную цитометрию. Larsen et al., American Journal of Transplantation, Vol 5: 443-453 (2005). См. также Linsley et al., Immunity, 1:7930801 (1994). Повышение связывающей активности белка, т.е. аффинности к его партнеру (партнерам) по связыванию составляет величину, по меньшей мере на 10% больше, чем у контроля дикого типа, а в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 100%, 200%, 300%, 500%, 1000%, 5000% или 10000% больше, чем контрольное значение дикого типа. Снижение связывающей активности белка, т.е. аффинности по

меньшей мере к одному из его партнеров по связыванию составляет не более 90% от контрольного значения, но не менее 10% от контрольного значения дикого типа, а в некоторых вариантах осуществления не более 80%, 70% 60%, 50%, 40%, 30% или 20%, но не менее 10% контрольного значения дикого типа. Белок с модифицированной аффинностью изменяет первичную аминокислотную последовательность внеклеточного домена или его специфически связывающей части путем замены, добавления или делеции аминокислотных остатков. Термин «модифицированный по аффинности» не следует толковать как налагающий какие-либо условия для какой-либо конкретной исходной композиции или способа, с помощью которого был создан белок, модифицированный по аффинности. Таким образом, модифицированный по аффинности белок не ограничивается белковыми доменами дикого типа, которые затем трансформируются в модифицированный по аффинности домен каким-либо конкретным процессом модификации аффинности. Полипептид с доменом, модифицированным по аффинности, может, например, быть создан, исходя из информации о последовательности домена дикого типа млекопитающего, затем смоделирован in silico для связывания с его партнером по связыванию и, наконец, рекомбинантно или химически синтезирован для получения композиции с доменом белка, модифицированным по аффинности. Только в одном альтернативном примере домен с модифицированной аффинностью может быть создан путем сайт-направленного мутагенеза домена дикого типа. Таким образом, домен IgSF с модифицированной аффинностью или домен TD с модифицированной аффинностью обозначает продукт, но не обязательно продукт, полученный каким-либо данным способом. Могут быть использованы различные методы, включая рекомбинантные методы, химический синтез или их комбинации.

Термин «домен IgSF с модифицированной аффинностью» относится к домену с модифицированной аффинностью белка члена суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF), имеющего измененную аминокислотную последовательность домена иммуноглобулина (например, IgV) во внеклеточном домене белка IgSF или его специфически связывающей части (относительно соответствующего родительского или немодифицированного домена дикого типа), так что он обладает повышенной или пониженной активностью связывания, такой как аффинность связывания по меньшей мере с одним из своих партнеров по связыванию (альтернативно «контр-структурами») по сравнению с родительским белком дикого типа или немодифицированным белком, содержащим не модифицированный по аффинности, или немодифицированный домен IgSF.

Термин «домен TD с модифицированной аффинностью» относится к домену с модифицированной аффинностью белка члена суперсемейства рецепторов фактора

некроза опухоли (TNFRSF) или лиганду TNF, имеющему измененную аминокислотную последовательность домена TNFR или домена TNF, соответственно. Например, TD-домен белка TNFRSF с модифицированной аффинностью имеет измененную аминокислотную последовательность домена TNFR, состоящую по меньшей мере из одного богатого цистеином домена (CRD) во внеклеточном домене белка TNFRSF или его специфически связывающей части (по отношению к соответствующему родительскому или немодифицированному домену дикого типа), так что он обладает повышенной или пониженной активностью связывания, такой как аффинность связывания по меньшей мере с одним из своих партнеров по связыванию (альтернативно «контр-структур») по сравнению с родительским доменом дикого типа или немодифицированным белком, содержащий не модифицированный по аффинности, или немодифицированный домен TD.

Термин «молекула, ингибирующая В-клетки» или BIM относится к белковой молекуле, которая антагонизирует или блокирует активность рецептора, стимулирующего В-клетки. BIM может быть антагонистом активности стимуляторов В-клеточного рецептора путем связывания непосредственно с когнатным лигандом рецептора, стимулирующего В-клетки, тем самым блокируя или уменьшая связывание между лигандом и рецептором, стимулирующим В-клетки. Например, BIM связывается с APRIL и/или BAFF, которые являются лигандами рецепторов, стимулирующих В-клетки, антигена созревания В-клеток (BCMA), рецептора фактора активации В-клеток (BAFF-R), а также трансмембранного активатора и модулятора кальция и интерактора лиганда циклофилина (TACI). В конкретных вариантах осуществления BIM, представленная в настоящей заявке, содержит внеклеточный домен или его часть, содержащую домен суперсемейства рецепторов TNF (TD, например, CRD) рецептора, стимулирующего В-клетки, который связывается с когнатным лигандом APRIL и/или BAFF, и гетеротримерами APRIL и BAFF. Например, BIM включает внеклеточный домен TACI или часть внеклеточного домена TACI, содержащую домен TD, который связывается с когнатными лигандами APRIL и/или BAFF и гетеротримерами APRIL и BAFF. В других примерах BIM включает внеклеточный домен BCMA или часть внеклеточного домена BCMA, содержащую домен TD, который связывается с когнатными лигандами APRIL и/или BAFF и гетеротримерами APRIL и BAFF. BIM также может включать модифицированный по аффинности вариант внеклеточного домена или его части из TACI или BCMA с одной или несколькими аминокислотными модификациями (например, заменами аминокислот) в TD, которые увеличивают аффинность связывания когнатного лиганда (например, APRIL и/или BAFF и гетеротримеров APRIL и BAFF).

Используемый в настоящей заявке термин «рецептор, стимулирующий В-клетки»,

относится к одному или нескольким из антигена созревания В-клеток (BCMA), рецептора фактора активации В-клеток (BAFF-R) и трансмембранного активатора и партнёру кальциевого модулятора и лиганда циклофилина (TACI), которые являются родственными рецепторами суперсемейства фактора некроза опухоли (TNFR), экспрессируемыми на В-клетках. Взаимодействие или лигирование этих родственных рецепторов их когнатными лигандами, BAFF и/или APRIL, или гетеротримерами APRIL и BAFF, регулирует гомеостаз В-клеток, включая выживание В-клеток, созревание и дифференцировку В-клеток и переключение классов иммуноглобулина. Рецептор, стимулирующий В-клетки, обычно содержит внеклеточную часть, трансмембранный домен и цитоплазматическую область, которая содержит один или несколько сайтов связывания фактора, ассоциированного с рецептором TNF (TRAF). Рекрутирование различных молекул TRAF в цитоплазматический домен может активировать различные факторы транскрипции, такие как NF-κB (например, NF-κB1 или NF-κB2), для опосредования сигнальных путей В-клеток, регулирующих гомеостаз В-клеток.

Используемые в настоящей заявке термины «связывать», «связанный» или их грамматические вариации относятся к участию молекулы в любом притягивающем взаимодействии с другой молекулой, что приводит к стабильной ассоциации, в которой две молекулы находятся в непосредственной близости друг от друга. Связывание включает, без ограничения указанными, нековалентные связи, ковалентные связи (такие как обратимые и необратимые ковалентные связи), и включает взаимодействия между молекулами, такими как, помимо прочего, белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды и небольшие молекулы, такие как химические соединения, включая лекарства.

Используемая в настоящей заявке активность связывания относится к характеристикам молекулы, например, полипептида, в отношении того, связывается ли он с одним или несколькими партнерами по связыванию и каким образом. Активность связывания может включать любую степень связывания одной молекулы с партнером по связыванию. Активность связывания включает способность связывать партнера (партнеров) по связыванию, аффинность, с которой он связывается с партнером по связыванию (например, высокую аффинность), авидность, с которой он связывается с партнером по связыванию, силу связи с партнером по связыванию. и/или специфичность или селективность связывания с партнером по связыванию.

Термин «аффинность связывания», используемый в настоящей заявке, означает специфическую аффинность связывания белка с его партнером по связыванию (т.е. его контр-структурой) в конкретных условиях связывания. Аффинность связывания относится к силе взаимодействия между двумя или более молекулами, такими как партнеры по

связыванию, обычно к силе нековалентных взаимодействий между двумя партнерами по связыванию. Увеличение или ослабление аффинности связывания домена с модифицированной аффинностью или иммуномодулирующего белка, содержащего домен с модифицированной аффинностью, к партнеру по связыванию определяют относительно аффинности связывания немодифицированного домена (например, нативного или дикого типа IgSF домена, или нативного или дикого типа TD домена). Способы определения аффинности связывания или относительной аффинности связывания известны в данной области техники, представляя собой твердофазные иммуноанализы ELISA, измерения ForteBio Octet, Biacore или проточную цитометрию. См., например, Larsen et al., American Journal of Transplantation, vol. 5: 443-453 (2005); Linsley et al., Immunity, Vol 1 (9): 793-801 (1994). В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания можно измерить с помощью проточной цитометрии, например, на основе средней интенсивности флуоресценции (MFI) в анализе проточного связывания.

Термин «авидность связывания», используемый в настоящей заявке, означает специфическую авидность связывания белка для его партнера по связыванию (т.е. его контр-структуры) в определенных условиях связывания. В биохимической кинетике авидность относится к суммарной силе множественной аффинности отдельных нековалентных связывающих взаимодействий, например, между белком и его партнером по связыванию (т.е. его контр-структурой). Таким образом, авидность отличается от аффинности, которая описывает силу единичного взаимодействия.

Термин «биологический период полужизни» относится к количеству времени, которое требуется веществу, такому как иммуномодулирующий белок, для потери половины своей фармакологической или физиологической активности или концентрации. На биологический период полужизни могут влиять элиминация, экскреция, расщепление (например, ферментативное расщепление/переваривание) вещества или абсорбция и концентрация в определенных органах или тканях организма. В некоторых вариантах осуществления биологический период полужизни может быть оценен путем определения времени, необходимого для того, чтобы концентрация вещества в плазме крови достигла половины своего стабильного уровня («период полужизни в плазме»). Конъюгаты, которые можно использовать для дериватизации и увеличения биологического периода полужизни белка, известны в данной области техники и включают, без ограничения указанными, домены мультимеризации (например, домен Fc-иммуноглобулина), полиэтиленгликоль (ПЭГ), гидроксиэтилкрахмал (ГЭК), XTEN (удлиненные рекомбинантные пептиды; см. WO 2013130683), человеческий сывороточный альбумин (HSA), бычий сывороточный альбумин (BSA), липиды (ацилирование) и поли-Pro-Ala-Ser

(PAS), полиглутаминовую кислоту (глутамилирование).

Термин «контр-структура клеточной поверхности» (альтернативно «партнер по связыванию с клеточной поверхностью»), используемый в настоящей заявке, представляет собой контр-структуру (альтернативно представляет собой партнер по связыванию), экспрессируемую в клетке млекопитающего. Как правило, партнером по связыванию с клеточной поверхностью является трансмембранный белок. В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию с клеточной поверхностью представляет собой рецептор.

Термины «партнер по связыванию» или «контр-структура» в отношении белка, такого как рецептор, растворимый лиганд, или внеклеточного домена, или его части, или его варианта с модифицированной аффинностью, относятся по меньшей мере к одной молекуле (обычно нативному белку млекопитающих), с которым указанный белок специфически связывается в определенных условиях связывания. В некоторых аспектах домен с модифицированной аффинностью или иммуномодулирующий белок, содержащий домен с модифицированной аффинностью, специфически связывается с партнером по связыванию соответствующего домена нативного белка или белка дикого типа, но с повышенной или ослабленной аффинностью. «Партнер по связыванию с клеточной поверхностью» представляет собой партнер по связыванию, экспрессируемый на клетке млекопитающего. Как правило, партнером по связыванию с клеточной поверхностью является трансмембранный белок. В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию с клеточной поверхностью представляет собой рецептор или лиганд рецептора, экспрессируемый на клетках и клетками, такими как клетки млекопитающих, образующие иммунологический синапс, например, иммунные клетки.

Термин «цис» в отношении связывания с молекулами клеточной поверхности относится к связыванию с двумя или более различными молекулами клеточной поверхности, каждая из которых присутствует на поверхности одной и той же клетки. В некоторых вариантах осуществления «цис» означает, что две или более молекул клеточной поверхности находятся исключительно на одной или исключительно на другой (но не на обеих) из двух клеток млекопитающих, образующих иммунный синапс.

Термин «консервативная аминокислотная замена», используемый в настоящей заявке, означает аминокислотную замену, при которой аминокислотный остаток заменяется другим аминокислотным остатком, имеющим группу R боковой цепи с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и

изолейцин; (2) алифатические-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) амидосодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислотные боковые цепи: аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту; и (7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Группы консервативных замен аминокислот представляют собой: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин.

Термин «соответствующий» со ссылкой на положения белка, например, указание на то, что положения нуклеотидов или аминокислот «соответствуют» положениям нуклеотидов или аминокислот в раскрытой последовательности, например, как указано в Списке последовательностей, относится к положениям нуклеотидов или аминокислот, идентифицированным при выравнивании с раскрытой последовательностью на основе выравнивания структурной последовательности или с использованием стандартного алгоритма выравнивания, такого как алгоритм GAP. Выравнивая последовательности, специалист в данной области техники может идентифицировать соответствующие остатки, например, используя в качестве направляющих консервативные и идентичные аминокислотные остатки. Фиг.17А и Фиг.17В иллюстрируют идентификацию соответствующих остатков путем выравнивания двух последовательностей.

Используемый в настоящей заявке термин «домен» (обычно последовательность из трех или более, как правило, 5 или 7 или более аминокислот, например, от 10 до 200 аминокислот) относится к части молекулы, такой как белок или кодирующая нуклеиновая кислота, которая структурно и/или функционально отличается от других частей молекулы и поддается идентификации. Например, домены включают те части полипептидной цепи, которые могут формировать независимо сложенную структуру внутри белка, состоящего из одного или нескольких структурных мотивов, и/или которые распознаются благодаря функциональной активности, такой как связывающая активность. Белок может иметь один или несколько отдельных доменов. Например, домен можно идентифицировать, определить или отличить по гомологии первичной последовательности или структуры с когнатными членами семейства, например, по гомологии с мотивами. В другом примере домен можно отличить по его функции, такой как способность взаимодействовать с биомолекулой, такой как когнатный партнер по связыванию. Домен независимо может проявлять биологическую функцию или активность, так что домен независимо или при гибридизации с другой молекулой может выполнять активность, такую как, например, связывание. Домен может представлять собой линейную последовательность аминокислот или нелинейную последовательность аминокислот. Многие полипептиды содержат

множество доменов. Такие домены известны и могут быть идентифицированы специалистами в данной области техники. В качестве примера здесь приведены определения, но понятно, что распознавание конкретных доменов по наименованию находится в пределах компетенции специалиста в данной области техники. При необходимости для идентификации доменов можно использовать соответствующее программное обеспечение. Понятно, что ссылки на аминокислоты, в том числе на конкретную последовательность, указанную как SEQ ID NO, используемую для описания организации домена (например, домена IgSF или домена TD), предназначены для иллюстративных целей и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения предоставленными вариантами осуществления. Понятно, что полипептиды и описание их доменов теоретически получены на основе анализа гомологии и сопоставления с подобными молекулами. Кроме того, в некоторых случаях соседние N- и/или C-концевые аминокислоты данного домена (например, домена IgSF или TD) также могут быть включены в последовательность, например, для обеспечения надлежащего фолдинга домена при экспрессии. Таким образом, точный локус может варьировать и не обязательно является одинаковым для каждого белка. Например, конкретный домен IgSF, такой как конкретный домен IgV или домен IgC, может быть на несколько аминокислот (1-10, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот) длиннее или короче. Аналогичным образом, конкретный домен TD, такой как конкретный домен CRD, может быть на несколько аминокислот (1-10, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот) длиннее или короче.

Термины «эктодомен», «внеклеточный домен» или «ECD», которые используются в настоящей заявке взаимозаменяемо, относятся к области мембранного белка, такого как трансмембранный белок, которая находится за пределами везикулярной мембраны (например, в пространстве вне клетки), когда из клетки экспрессируется полноразмерная форма мембранного белка. Для целей настоящей заявки подразумевается, что ссылка на ECD относится к последовательностям и доменам, которые составляют эту область, и не требуется, чтобы белок, содержащий ECD, был мембранным белком или чтобы домен присутствовал вне клетки. Например, растворимый иммуномодулирующий белок может содержать последовательности ECD мембранного белка, гибридизованные с другим фрагментом, таким как домен мультимеризации, например, Fc-область. Эктодомены часто взаимодействуют со специфическими лигандами или специфическими рецепторами клеточной поверхности, например, через связывающий домен, который специфически связывается с лигандом или рецептором клеточной поверхности. Примеры доменов связывания включают домены иммуноглобулина (IgD, также называемый доменом IgSF)

или домены, богатые цистеином (CRD). Эктодомены членов суперсемейства иммуноглобулинов содержат IgD (например, домен IgV). Эктодомены членов суперсемейства TNFR содержат домен TD (например, домен CRD). Таким образом, ссылка на ECD в настоящей заявке включает полноразмерную последовательность ECD мембранного белка, а также его специфически связывающиеся фрагменты, содержащие IgD или CRD, которые связываются с лигандом или когнатным партнером по связыванию.

Термины «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относятся к количеству и/или концентрации терапевтической композиции, такой как содержащая иммуномодулирующий белок или Fc гибридный белок, которая при введении ex vivo (при контакте с клеткой пациента) или in vivo (при введении пациенту) отдельно (т.е. в виде монотерапии) или в комбинации с дополнительными терапевтическими агентами дает статистически значимое торможение прогрессирования заболевания, например, за счет облегчения или устранения симптомов и/или причины заболевания. Эффективное количество для лечения заболевания, состояния или расстройства, такого как заболевание или расстройство иммунной системы, может представлять собой количество, которое облегчает, ослабляет или уменьшает по меньшей мере один симптом или биологическую реакцию или эффект, связанный с заболеванием, состоянием или расстройством, предотвращает прогрессирование заболевания, состояния или расстройства или улучшает физическое функционирование пациента. В случае клеточной терапии эффективное количество представляет собой эффективную дозу или количество клеток, вводимых пациенту. В некоторых вариантах осуществления пациент представляет собой пациента-человека.

Используемый в настоящей заявке термин «гибридный белок» относится к полипептиду, кодируемому последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую два или более белков, в некоторых случаях 2, 3, 4, 5 или более белков, в которых кодирующие последовательности находятся в одной и той же рамке считывания, так что при транскрипции и трансляции гибридной конструкции в клетке-хозяине образуется белок, содержащий два или более белков. Каждый из двух или более белков может быть соседним с другим белком в конструкции или разделен линкерным полипептидом, который содержит 1, 2, 3 или более, но обычно менее 20, 15, 10, 9, 8, 7, или 6 аминокислот. Белковый продукт, кодируемый гибридной конструкцией, называют гибридным полипептидом. Примером гибридного белка в соответствии с представленными вариантами осуществления является Fc гибридный белок, содержащий домен с модифицированной аффинностью (например, вариантный BCMA или его часть, содержащую CRD), который связан с доменом Fc иммуноглобулина.

Термин «фрагмент, продлевающий период полужизни» относится к фрагменту гибридного полипептида или химическому конъюгату, который продлевает период полужизни белка, циркулирующего в сыворотке крови млекопитающих, по сравнению с периодом полужизни белка, который не конъюгирован таким образом с фрагментом. В некоторых вариантах осуществления период полужизни удлиняется более чем или примерно в 1,2 раза, примерно в 1,5 раза, примерно в 2,0 раза, примерно в 3,0 раза, примерно в 4,0 раза, примерно в 5,0 раз или примерно в 6,0 раз. В некоторых вариантах осуществления период полужизни удлиняется более чем на 6 часов, более чем на 12 часов, более чем на 24 часа, более чем на 48 часов, более чем на 72 часа, более чем на 96 часов или более чем на 1 неделю после введения in vivo по сравнению с белком без фрагмента, продлевающего период полужизни. Период полужизни относится к количеству времени, которое требуется белку, чтобы потерять половину своей концентрации, количества или активности. Период полужизни можно определить, например, с помощью анализа ELISA или анализа активности. Примеры фрагментов, продлевающих время полужизни, включают домен Fc, домен мультимеризации, полиэтиленгликоль (ПЭГ), гидроксиэтилкрахмал (ГЭК), XTEN (удлиненные рекомбинантные пептиды; см. WO2013130683), человеческий сывороточный альбумин (HSA), бычий сывороточный альбумин (BSA), липиды (ацилирование) и поли-Pro-Ala-Ser (PAS) и полиглутаминовую кислоту (глутамилирование).

Fc-область (кристаллизуемый фрагмент) или домен молекулы иммуноглобулина (также называемой Fc-полипептидом) в значительной степени соответствует константной области тяжелой цепи иммуноглобулина и в некоторых случаях отвечает за различные функции, включая эффекторную функцию (функции) антитела. Домен Fc содержит часть или весь шарнирный домен молекулы иммуноглобулина плюс домены CH2 и CH3. В некоторых случаях для включения в предлагаемый гибридный белок может быть удалена вся или часть шарнирной последовательности Fc. Домен Fc может формировать димер из двух полипептидных цепей, соединенных одной или несколькими дисульфидными связями. В некоторых вариантах осуществления Fc представляет собой вариантную Fc, которая проявляет сниженную (например, сниженную более чем примерно на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более) активность для облегчения эффекторной функции. В некоторых вариантах осуществления ссылки на аминокислотные замены в Fc-области даны в системе нумерации EU, если только не указано со ссылкой на конкретную SEQ ID NO. Нумерация EU известна и соответствует последней обновленной научной диаграмме IMGT (IMGT®, международная информационная система ImMunoGeneTics®, http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html (создана: 17 мая

2001, последнее обновление: 10 января 2013) и индексу EU, как сообщается в Kabat, E.A. et al. Sequences of Proteins of Immunological interest. 5th ed. US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242 (1991).

Гибрид Fc иммуноглобулина («Fc-гибрид»), такой как иммуномодулирующий гибридный белок Fc, представляет собой молекулу, содержащую один или несколько полипептидов, функционально связанных с Fc-областью иммуноглобулина. Fc-гибрид может содержать, например, Fc-область, функционально связанную с TIM или BIM предоставленных иммуномодулирующих белков. Fc-гибрид может содержать, например, Fc-область, функционально связанную с внеклеточным доменом BCMA или его частью, содержащей CRD, включая любой из предложенных вариантов с модифицированной аффинностью. Fc-область иммуноглобулина может быть напрямую или опосредованно связана с одним или несколькими полипептидами. В данной области техники известны различные линкеры, и их можно при необходимости использовать для связывания Fc с партнером по гибридизации для получения Fc-гибрида. Гибриды Fc идентичных видов могут быть димеризованы с образованием гомодимеров Fc гибридов. Гибридизация Fc неидентичных видов (например, инженерия «выступ во впадину») может быть использована для образования гетеродимеров Fc-гибридов. В некоторых вариантах осуществления Fc представляет собой Fc млекопитающего, такую как мышиная или человеческая Fc.

Термин «клетка-хозяин» относится к любой клетке, которую можно использовать для экспрессии белка, кодируемого рекомбинантным вектором экспрессии. Клеткой-хозяином может быть прокариотическая клетка, например, E. coli, или она может представлять собой эукариотическую клетку, например, одноклеточный эукариотический организм (например, дрожжевой или другой грибок), растительную клетку (например, клетку табака или томата), клетку животного (например, клетку человека, клетку обезьяны, клетку хомяка, клетку крысы, клетку мыши или клетку насекомого) или гибридому. Примеры клеток-хозяев включают клетки яичника китайского хомячка (CHO) или их производные, такие как Veggie CHO и родственные клеточные линии, которые растут в бессывороточной среде, или штамм CHO DX-B11, дефицитный по DHFR.

Используемый в настоящей заявке термин «иммунологический синапс» или «иммунный синапс» (сокращенно «ИС») означает поверхность раздела между клеткой млекопитающего, которая экспрессирует антигены MHC I (главного комплекса гистосовместимости) или MHC II, такой как антигенпрезентирующая клетка или опухолевая клетка, и лимфоцитом млекопитающего, таким как эффекторная Т-клетка или клетка натуральный киллер (NK).

Используемый в настоящей заявке термин «иммуноглобулин» (сокращенно «Ig») является синонимом термина «антитело» (сокращенно «Ab») и относится к белку иммуноглобулина млекопитающего, включая любой из пяти классов человека: IgA (который включает подклассы IgA1 и IgA2), IgD, IgE, IgG (включая подклассы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4) и IgM. Термин также включает иммуноглобулины короче полной длины, полностью или частично синтетические (например, рекомбинантные или химически синтезированные) или полученные естественным путем, включая любой их фрагмент, содержащий по меньшей мере часть вариабельной области тяжелой (VH) цепи и/или вариабельной области легкой (VL) цепи молекулы иммуноглобулина, которая является достаточной для образования сайта связывания антигена и, при сборке, для специфического связывания антигена. Антитело также может включать всю или часть константной области. Такие фрагменты включают антигенсвязывающий фрагмент (Fab), вариабельный фрагмент (Fv), содержащий VH и VL, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий VH и VL, связанные вместе в одну цепь, а также другие фрагменты V-области антитела, такие как Fab', $F(ab)_2$, $F(ab')_2$, диатело dsFv, полипептидные фрагменты Fc и Fd. Следовательно, понятно, что ссылка на антитело в настоящей заявке включает полноразмерное антитело и его антигенсвязывающие фрагменты. Термин антитело также включает композиции антител с полиэпитопной специфичностью, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), диатела и одноцепочечные молекулы. Биспецифические антитела, гомобиспецифические и гетеробиспецифические, включены в значение этого термина. Антитела включают поликлональные антитела или моноклональные антитела. Антитело также включает синтетические антитела или рекомбинантные антитела. Структуру и свойства различных классов антител см., например, в Basic and Clinical Immunology, 8th Edition, Daniel P. Sties, Abba I. Terr and Tristram G. Parsolw (eds), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, page 71 and Chapter 6.

Термины «полноразмерное антитело», «интактное антитело» или «целое антитело» используются взаимозаменяемо для обозначения антитела в его практически интактной форме, в отличие от фрагмента антитела. Полноразмерное антитело представляет собой антитело, обычно имеющее две полноразмерные тяжелые цепи (например, VH-CH1-CH2-CH3 или VH-CH1-CH2-CH3-CH4) и две полноразмерные легкие цепи (VL-CL) и шарнирные области, такое как антитела, продуцируемые видами млекопитающих (например, человека, мыши, крысы, кролика, примата, отличного от человека, и т.д.), В-клетками, секретирующими антитело, и антитела с теми же доменами, которые продуцируются синтетическим путем. В частности, целые антитела включают антитела с

тяжелыми и легкими цепями, включая Fc область. Константные домены могут представлять собой константные домены нативной последовательности (например, константные домены нативной последовательности человека) или варианты их аминокислотной последовательности. В некоторых случаях интактное антитело может иметь одну или несколько эффекторных функций.

«Фрагмент антитела» включает часть интактного антитела, антигенсвязывающую и/или вариабельную область интактного антитела. Фрагменты антител включают, без ограничения указанными, Fab-фрагменты, Fab'-фрагменты, $F(ab')_2$-фрагменты, Fv-фрагменты, Fv с дисульфидной связью (dsFv), Fd-фрагменты, Fd'-фрагменты; диатела; линейные антитела (см. патент США № 5641870, пример 2; Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); молекулы одноцепочечных антител, включая одноцепочечные Fv (scFv) или одноцепочечные Fab (scFab); антигенсвязывающие фрагменты любых из указанных выше и полиспецифические антитела из фрагментов антител.

«Fv» состоит из одного домена вариабельной области тяжелой цепи и одного домена вариабельной области легкой цепи, связанных нековалентной ассоциацией. В результате фолдинга этих двух доменов образуются шесть гипервариабельных областей (CDR) (по 3 в каждой из тяжелой и легкой цепи), которые вносят аминокислотные остатки для связывания антигена и придают антителу специфичность связывания с антигеном. Однако даже один вариабельный домен (или половина Fv, содержащая только три CDR, специфичных для антигена) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя в некоторых случаях с более низкой аффинностью, чем весь сайт связывания.

«dsFv» относится к Fv со сконструированной межмолекулярной дисульфидной связью, которая стабилизирует пару VH-VL.

«Фрагмент Fd» представляет собой фрагмент антитела, содержащий вариабельный домен (VH) и один домен константной области (CH1) тяжелой цепи антитела.

«Fab-фрагмент» представляет собой фрагмент антитела, полученный в результате расщепления полноразмерного иммуноглобулина папаином, или фрагмент, имеющий такую же структуру, который получен синтетическим путем, например, рекомбинантными методами. Фрагмент Fab включает легкую цепь (содержащую VL и CL) и другую цепь, содержащую вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и один домен константной области тяжелой цепи (CH1).

«Фрагмент $F(ab')_2$» представляет собой фрагмент антитела, полученный в результате расщепления иммуноглобулина пепсином при pH 4,0-4,5, или фрагмент, имеющий такую же структуру, который получен синтетическим путем, например, рекомбинантными методами. Фрагмент $F(ab')_2$ по существу содержит два Fab-фрагмента,

где каждая часть тяжелой цепи содержит несколько дополнительных аминокислот, включая остатки цистеина, которые образуют дисульфидные связи, соединяющие два фрагмента.

Фрагмент Fab' представляет собой фрагмент, содержащий половину (одну тяжелую цепь и одну легкую цепь) фрагмента $F(ab')_2$.

«Фрагмент Fd» представляет собой фрагмент антитела, содержащий одну часть тяжелой цепи фрагмента $F(ab')_2$.

Фрагмент Fv представляет собой фрагмент, содержащий только домены V_H и V_L молекулы антитела.

«Фрагмент scFv» относится к фрагменту антитела, который содержит вариабельную область легкой цепи (V_L) и вариабельную область тяжелой цепи (V_H), ковалентно связанные полипептидным линкером в любом порядке. Линкер имеет такую длину, что два вариабельных домена соединяются мостиком без существенных помех. Примеры линкеров представляют собой остатки $(Gly\text{-}Ser)_n$ с некоторыми остатками Gly или Lys, распределенными повсюду для увеличения растворимости.

«Диатела» представляют собой димерные scFv; диатела обычно имеют более короткие пептидные линкеры, чем scFv, и преимущественно димеризованы.

Термин «суперсемейство иммуноглобулинов» или «IgSF», используемый в настоящей заявке, означает группу белков клеточной поверхности и растворимых белков, которые участвуют в процессах распознавания, связывания или адгезии клеток. Молекулы классифицируются как члены этого суперсемейства на основании общих структурных особенностей с иммуноглобулинами (т.е. антителами); все они обладают доменом, известным как домен или складка иммуноглобулина. Многие представители «не-антител IgSF» включают белки или рецепторы клеточной поверхности, которые не являются антителами. Члены IgSF включают антигенные рецепторы клеточной поверхности, ко-рецепторы и ко-стимулирующие молекулы иммунной системы, молекулы, участвующие в презентации антигена лимфоцитам, молекулы клеточной адгезии, определенные цитокиновые рецепторы и внутриклеточные мышечные белки. Они обычно связаны с ролью в иммунной системе. Белки иммунологического синапса часто являются членами IgSF. IgSF также можно разделить на «подсемейства» на основе общих свойств, таких как функция. Такие подсемейства обычно включают от 4 до 30 членов IgSF.

Термины «домен IgSF» или «домен иммуноглобулина» или «домен Ig» или «IgD», используемые в настоящей заявке, относятся к структурному домену или доменам белков IgSF. Домены Ig названы в честь молекул иммуноглобулина. Они содержат примерно 70-110 аминокислот и классифицируются в зависимости от их размера и функции. Ig домены

обладают характерной Ig-складкой, которая имеет сэндвич-подобную структуру, образованную двумя слоями антипараллельных бета-цепей. Взаимодействия между гидрофобными аминокислотами на внутренней стороне сэндвича и высококонсервативные дисульфидные связи, образующиеся между цистеиновыми остатками в цепях B и F, стабилизируют Ig-складку. В некоторых случаях один конец домена Ig имеет участок, называемый гипервариабельной областью, которая, в некоторых аспектах, участвует в обеспечении специфичности антител к их лигандам. Ig-подобные домены можно классифицировать (по классам) как: IgV, IgC1, IgC2 или IgI. Большинство доменов Ig являются либо вариабельными (IgV), либо константными (IgC). Домены IgV с 9 бета-цепями обычно длиннее, чем домены IgC с 7 бета-цепями. Ig-домены некоторых представителей IgSF напоминают IgV-домены по аминокислотной последовательности, но по размеру сходны с IgC-доменами. Они называются доменами IgC2, а стандартные домены IgC называются доменами IgC1. Цепи Т-клеточного рецептора (TCR) содержат два домена Ig во внеклеточной части; один домен IgV на N-конце и один домен IgC1 рядом с клеточной мембраной. «Не относящийся к антителам домен IgSF» относится к домену или доменам IgSF, присутствующим в белках, отличных от антител, которые обычно находятся во внеклеточной части или домене определенных белков клеточной поверхности. Таким образом, внеклеточный домен (ECD) членов семейства IgSF содержит один или несколько доменов Ig; следовательно, термин «домен Ig» также используется в отношении ECD таких белковых молекул. Ссылка на вариантный домен IgSF (vIgD) относится к варианту или модифицированной последовательности IgD.

Используемый в настоящей заявке термин «иммунологическая активность» относится к одной или нескольким активностям иммунных клеток, таких как Т-клетки или В-клетки, включая, например, активацию, выживание клеток, пролиферацию клеток, продукцию цитокинов (например, гамма-интерферона), цитотоксическую активность или способность активировать путь NF-κB или другой сигнальный каскад, приводящий к активации фактора транскрипции в иммунной клетке. Анализы для оценки иммунологической активности иммуномодулирующих белков можно проводить путем сравнения с контрольными белками с известной активностью.

«Иммуномодулирующий белок» или «иммуномодулирующий полипептид» представляет собой белок, который модулирует иммунологическую активность. Под «модуляцией» или «модулированием» иммунного ответа подразумевается, что иммунологическая активность либо усиливается, либо подавляется. Такая модуляция включает любую индукцию, или изменение степени или уровня, или подавление иммунологической активности иммунной клетки, такой как В-клетка или Т-клетка.

Например, растворимые гибридные белки Fc могут подавлять иммунологическую активность либо В-клеток, либо Т-клеток, либо как В-клеток, так и Т-клеток. Иммуномодулирующий белок может представлять собой одиночную полипептидную цепь или мультимер (димеры или мультимеры более высокого порядка) по меньшей мере двух полипептидных цепей, ковалентно связанных друг с другом, например, межцепочечными дисульфидными связями. Таким образом, мономерные, димерные и мультимерные белки более высокого порядка входят в объем определяемого термина. Мультимерные белки могут быть гомомультимерными (из идентичных полипептидных цепей) или гетеромультимерными (из разных полипептидных цепей).

Используемый в настоящей заявке термин «модификация» относится к модификации последовательности аминокислот полипептида или последовательности нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты, и включает изменение аминокислот или нуклеотидов, соответственно, из последовательности. Аминокислотная модификация или изменение может быть делецией, вставкой или заменой аминокислот или нуклеотидов, соответственно. Способы модификации полипептида являются обычными для специалистов в данной области техники, например, с использованием методологий рекомбинантной ДНК.

Термин «домен мультимеризации» относится к последовательности аминокислот, которая способствует образованию мультимера из двух или более полипептидов. Домен мультимеризации включает последовательности, которые способствуют стабильному взаимодействию молекулы полипептида с одной или несколькими дополнительными молекулами полипептида, каждая из которых содержит комплементарный домен мультимеризации (например, первый домен мультимеризации и второй домен мультимеризации), который может быть одним и тем же или другим доменом мультимеризации. Взаимодействия между комплементарными доменами мультимеризации, т.е. взаимодействие между первым доменом мультимеризации и вторым доменом мультимеризации образуют стабильное белок-белковое взаимодействие с образованием мультимера полипептидной молекулы с дополнительной полипептидной молекулой. В некоторых случаях домен мультимеризации является одним и тем же и взаимодействует сам с собой, образуя стабильное белок-белковое взаимодействие между двумя полипептидными цепями. Как правило, полипептид присоединен прямо или опосредованно к домену мультимеризации. Типичные домены мультимеризации включают последовательности иммуноглобулинов или их части, лейциновые молнии, гидрофобные области, гидрофильные области и совместимые домены белок-белкового взаимодействия. Домен мультимеризации, например, может представлять собой

константную область или домен иммуноглобулина, такой как, например, домен Fc или его части из IgG, включая подтипы IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, IgA, IgE, IgD и IgM и их модифицированные формы.

Термины «нуклеиновая кислота» и «полинуклеотид» используются взаимозаменяемо для обозначения полимера из остатков нуклеиновой кислоты (например, дезоксирибонуклеотидов) в одноцепочечной или двухцепочечной форме. Если не указано иное, термины охватывают нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги натуральных нуклеотидов, и тех, которые обладают сходными с ними связывающими свойствами и метаболизируются способом, сходным с натуральными нуклеотидами. Если не указано иное, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также неявно включает ее консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов) и комплементарные нуклеотидные последовательности, а также явно указанную последовательность. В частности, замены вырожденных кодонов могут быть достигнуты путем создания последовательностей, в которых третье положение одного или нескольких выбранных (или всех) кодонов заменено остатками смешанных оснований и/или дезоксиинозина. Термин нуклеиновая кислота или полинуклеотид охватывает кДНК или мРНК, кодируемую геном.

Термины «в функциональной комбинации», «в функциональном порядке» и «функционально связанный», используемые в настоящей заявке, относятся к соединению последовательностей нуклеиновых кислот таким образом или в такой ориентации, при которой сегменты расположены так, что они функционируют согласованно для своих целей. В некоторых вариантах осуществления этот термин относится к связыванию нуклеиновых кислот с получением молекулы нуклеиновой кислоты, способной направлять транскрипцию данного гена и/или продуцировать необходимую функциональную белковую молекулу. Например, сегменты последовательности ДНК, т.е. кодирующая последовательность и регуляторная последовательность (последовательности) связаны таким образом, чтобы обеспечить экспрессию генов, когда соответствующие молекулы (например, белки-активаторы транскрипции) связаны с регуляторной последовательностью.

Термин «фармацевтическая композиция» относится к композиции, пригодной для фармацевтического применения у субъекта-млекопитающего, часто у человека. Фармацевтическая композиция обычно содержит эффективное количество активного агента (например, иммуномодулирующего белка) и носителя, наполнителя или разбавителя. Носитель, наполнитель или разбавитель обычно представляют собой фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель или разбавитель соответственно.

Термины «полипептид» и «белок» используются в настоящей заявке взаимозаменяемо и относятся к молекулярной цепи из двух или более аминокислот, связанных пептидными связями. Термины не относятся к конкретной длине продукта. Таким образом, «пептиды» и «олигопептиды» включены в определение полипептида. Термины включают посттрансляционные модификации полипептида, например, гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование и т.п. Термины также включают молекулы, в которых содержатся один или несколько аналогов аминокислот или неканонических или ненатуральных аминокислот, которые могут быть синтезированы или экспрессированы рекомбинантно с использованием известных методов белковой инженерии. Кроме того, белки могут быть дериватизированы, как описано в настоящей заявке, с помощью хорошо известных методов органической химии.

Термин «очищенный» применительно к нуклеиновым кислотам, таким как кодирующие иммуномодулирующие белки, или белкам (например, иммуномодулирующим белкам), как правило, обозначает нуклеиновую кислоту или полипептид, которые по существу не содержат других фрагментов, что определяется аналитическими методами, хорошо известными в данной области техники (например, очищенный полипептид или полинуклеотид образует дискретную полосу в электрофоретическом геле, хроматографическом элюате и/или среде, подвергнутой центрифугированию в градиенте плотности). Например, нуклеиновая кислота или полипептид, дающие по существу одну полосу в геле для электрофореза, называются «очищенными». Очищенная нуклеиновая кислота или белок имеют чистоту не менее примерно 50%, обычно чистоту не менее примерно 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 99% или более (например, в процентах по массе или на молярной основе).

Термин «рекомбинантный» указывает на то, что материал (например, нуклеиновая кислота или полипептид) был искусственно (т.е. ненатуральным образом) изменен в результате вмешательства человека. Изменение может быть выполнено на материале, находящемся или удаленном из его естественной среды или состояния. Например, «рекомбинантная нуклеиновая кислота» представляет собой нуклеиновую кислоту, полученную путем рекомбинации нуклеиновых кислот, например, во время клонирования, аффинной модификации, перетасовки ДНК или других хорошо известных молекулярно-биологических процедур. «Молекула рекомбинантной ДНК» состоит из сегментов ДНК, соединенных вместе с помощью таких молекулярно-биологических методик. Термин «рекомбинантный белок» или «рекомбинантный полипептид», используемый в настоящей заявке, относится к белковой молекуле (например, иммуномодулирующему белку), которая экспрессируется с использованием

рекомбинантной молекулы ДНК. «Рекомбинантная клетка-хозяин» представляет собой клетку, которая содержит и/или экспрессирует рекомбинантную нуклеиновую кислоту, или которая изменена иным образом с помощью генной инженерии, например, путем введения в клетку молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок, такой как иммуномодулирующий белок, приведенный в настоящей заявке. Сигналы контроля транскрипции у эукариотических организмов включают «промоторные» и «энхансерные» элементы. Промоторы и энхансеры состоят из коротких наборов последовательностей ДНК, которые специфически взаимодействуют с клеточными белками, участвующими в транскрипции. Промоторные и энхансерные элементы были выделены из различных эукариотических источников, включая гены дрожжей, клеток насекомых и млекопитающих и вирусов (аналогичные контрольные элементы, т.е. промоторы, также обнаружены у прокариотических организмов). Выбор конкретного промотора и энхансера зависит от того, какой тип клеток будет использоваться для экспрессии интересующего белка.

Термин «рекомбинантный вектор экспрессии», используемый в настоящей заявке, относится к молекуле ДНК, содержащей необходимую кодирующую последовательность (например, кодирующую иммуномодулирующий белок) и соответствующие последовательности нуклеиновых кислот, необходимые для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретной клетке. Последовательности нуклеиновых кислот, необходимые для экспрессии в прокариотах, включают промотор, при необходимости операторную последовательность, сайт связывания рибосомы и, возможно, другие последовательности. Известно, что эукариотические клетки используют промоторы, энхансеры, сигналы терминации и полиаденилирования. Последовательность секреторного сигнального пептида также может, при необходимости, кодироваться рекомбинантным вектором экспрессии, функционально связанным с кодирующей последовательностью, так что экспрессируемый белок может секретироваться рекомбинантной клеткой-хозяином, например, для его экспрессии в виде секретируемого белка или для облегчения выделения или очистки иммуномодулирующего белка из клетки, если это необходимо. Термин включает вектор как самовоспроизводящуюся структуру нуклеиновой кислоты, а также вектор, включенный в геном клетки-хозяина, в которую он был введен. Среди векторов есть вирусные векторы, такие как лентивирусные векторы.

Термин «идентичность последовательности», используемый в настоящей заявке, относится к идентичности последовательности между генами или белками на уровне нуклеотидов или аминокислот, соответственно. «Идентичность последовательности»

представляет собой меру идентичности между белками на уровне аминокислот и меру идентичности между нуклеиновыми кислотами на уровне нуклеотидов. Идентичность белковой последовательности можно определить путем сравнения аминокислотной последовательности в данном положении в каждой последовательности, когда последовательности выровнены. Точно так же идентичность последовательности нуклеиновой кислоты может быть определена путем сравнения нуклеотидной последовательности в данном положении в каждой последовательности, когда последовательности выровнены. Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области техники, такие способы включают программное обеспечение GAP, BESTFIT, BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR), FASTA и TFASTA. Алгоритм BLAST вычисляет процент идентичности последовательности и выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями. Программное обеспечение для проведения анализа BLAST общедоступно на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации (NCBI). В некоторых случаях процент идентичности последовательности можно определить как процентную долю аминокислотных остатков (или нуклеотидных остатков) в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам (или нуклеотидным остаткам) в эталонной последовательности после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательности. Ссылка на идентичность последовательности включает идентичность последовательности по всей длине каждой из сравниваемых последовательностей. Специалисты в данной области техники могут определить подходящие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

Термин «растворимый», используемый в настоящей заявке в отношении белков, означает, что белок не является мембранным белком или не закреплен в клеточной мембране. Белок может быть сконструирован как растворимый белок путем включения только внеклеточного домена или его части и без трансмембранного домена. В некоторых случаях растворимость белка может быть улучшена за счет связывания или присоединения, прямо или опосредованно через линкер, к Fc-домену или другой молекуле, удлиняющей время полужизни, что в некоторых случаях также может улучшить стабильность и/или время полужизни белка. В некоторых аспектах растворимый белок представляет собой Fc гибридный белок.

Используемый в настоящей заявке термин «специфически связывает» означает

способность белка в условиях специфического связывания связываться с белком-мишенью, так что его аффинность или авидность по меньшей мере в 10 раз выше, но при необходимости в 50, 100, 250 или 500 раз больше или даже по меньшей мере в 1000 раз больше, чем средняя аффинность или авидность того же белка к набору случайных пептидов или полипептидов достаточного статистического размера. Специфически связывающий белок не обязательно должен связываться исключительно с одной молекулой-мишенью, но может специфически связываться с более чем одной молекулой-мишенью. В некоторых случаях специфически связывающийся белок может связываться с белком, имеющим сходство по структурной конформации с белком-мишенью (например, паралогами или ортологами). Специалистам в данной области техники будет понятно, что возможно специфическое связывание с молекулой, имеющей ту же функцию у другого вида животных (т.е. ортологом) или с молекулой, имеющей по существу аналогичный эпитоп, что и молекула-мишень (например, паралогом), и это не умаляет специфичности связывания, которая определяется относительно статистически достоверного набора уникальных не-мишеней (например, случайных полипептидов). Таким образом, иммуномодулирующий белок по изобретению или его BIM или TIM могут специфически связываться с более чем одним отличающимся видом молекулы-мишени из-за перекрестной реактивности. Для определения специфического связывания между двумя белками можно использовать твердофазные иммуноанализы ELISA, измерения ForteBio Octet или Biacore. Как правило, взаимодействия между двумя связывающими белками имеют константы диссоциации (Kd) менее примерно 1×10^{-5} M, а часто такие низкие, как примерно 1×10^{-12} M. В некоторых аспектах настоящего изобретения взаимодействия между двумя связывающими белками имеют константы диссоциации менее примерно 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, или 1×10^{-11} M или менее.

Термин «фрагмент специфического связывания» или «фрагмент», используемый в настоящей заявке в отношении белка, означает полипептид, который короче полноразмерного белка или его специфического домена или области, и который специфически связывается in vitro и/или in vivo с партнером по связыванию полноразмерного белка или специфического домена или области. Фрагмент специфического связывания относится к фрагменту полноразмерного внеклеточного домена полипептида или связывающего домена полипептида, который все еще связывается с партнером по связыванию связывающего домена. Например, фрагмент специфического связывания относится к фрагменту полноразмерного внеклеточного домена члена семейства IgSF или к их полноразмерному IgSF (например, IgV или IgC), но который по-прежнему связывается с партнером по связыванию члена семейства IgSF или

доменом IgSF члена семейства IgSF. В других примерах фрагмент специфического связывания относится к фрагменту внеклеточного домена полноразмерного члена семейства TNFR или его полноразмерного домена TNFR (TD) (например, CRD), но который все еще связывается с партнером по связыванию члена семейства TNFR или CRD члена семейства TNFR. В некоторых вариантах осуществления фрагмент специфического связывания имеет по меньшей мере примерно 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% длины полноразмерной последовательности внеклеточного домена, или домена или области внеклеточного домена. В некоторых вариантах осуществления фрагмент специфического связывания может иметь длину аминокислот, равную по меньшей мере 50 аминокислотам, например, по меньшей мере 60, 70, 80, 90, 100 или 110 аминокислот.

Используемый в настоящей заявке термин «субъект» представляет собой млекопитающее, такое как человек или другое животное, и обычно это человек. Субъект может быть мужчиной или женщиной, и может быть любого подходящего возраста, включая младенцев, детей, подростков, взрослых и пожилых людей.

Используемый в настоящей заявке термин «синтетический» в отношении, например, синтетической молекулы нуклеиновой кислоты или синтетического гена или синтетического пептида, относится к молекуле нуклеиновой кислоты или молекуле полипептида, полученной рекомбинантными методами и/или методами химического синтеза.

Термин «суперсемейство рецепторов TNF» или «TNFRSF», используемый в настоящей заявке, означает группу цитокиновых рецепторов клеточной поверхности, все из которых представляют собой трансмембранные гликопротеины типа I (N-концевые внеклеточные), которые содержат от одного до шести богатых цистеином доменов (CRD) во внеклеточном домене. Молекулы классифицируются как члены этого суперсемейства на основе общих структурных особенностей, которые включают один или несколько доменов, богатых цистеином (CRD), присутствующих в их N-концевой внеклеточной области, которые часто играют роль в связывании белков их когнатного партнера по связыванию или лиганда. Белок TNFRSF может иметь только один или несколько CRD (например, CRD1, CRD2 и т.д.). Как правило, ECD или эктодомен членов TNFRSF содержит от 1 до 6 псевдоповторов CRD. Например, BAFF-рецептор и BCMA содержат по одному CRD, тогда как TACI содержит два CRD (CRD1 и CRD2). Члены TNFRSF обычно представляют собой тримерные или мультимерные комплексы, которые стабилизированы своими внутрицистеиновыми дисульфидными связями. Связывание белков TNFRSF с их лигандами облегчает различные биологические активности в клетках, такие как индукция

апоптотической гибели клеток или выживания и пролиферации клеток.

Термин «TD» относится к структурному домену или доменам белков TNFRSF или лигандов семейства TNF. Например, TD белка TNFRSF представляет собой модуль богатого цистеином домена (CRD) примерно из 40 аминокислот, содержащих шесть (6) консервативных цистеинов. Следовательно, ссылка на CRD также может использоваться взаимозаменяемо с термином TD в отношении TD белка TNFRSF. Шесть цистеинов участвуют в образовании внутрицепочечных дисульфидных связей. Внеклеточный домен (ECD) членов TNFRSF содержит один или несколько доменов CRD; следовательно, термин TD также используется в отношении ECD таких белковых молекул. Ссылка на вариант TD (vTD) относится к вариантной или модифицированной последовательности TD.

Термин «молекула, ингибирующая Т-клетки» или TIM относится к белковой молекуле, которая противодействует или антагонизирует активность рецептора, стимулирующего Т-клетки. TIM может быть антагонистом активности рецептора, стимулирующего Т-клетки, связываясь непосредственно с рецептором, стимулирующим Т-клетки, или лигандом рецептора, стимулирующим Т-клетки, тем самым блокируя или уменьшая связывание между лигандом и рецептором, стимулирующим Т-клетки. Например, TIM антагонизирует или ингибирует активность костимулирующего рецептора Т-клеток, такого как CD28. В конкретных вариантах осуществления TIM, предложенная в настоящей заявке, содержит внеклеточный домен или его часть, включающую домен суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF), такой как домен IgV когнатного лиганда рецептора, стимулирующего Т-клетки. Например, TIM включает внеклеточный домен CTLA-4 или часть внеклеточного домена CTLA-4, содержащую домен IgSF (например, домен IgV), который связывается с рецептором, стимулирующим Т-клетки (например, CD28). TIM также может включать модифицированный по аффинности вариант внеклеточного домена или его часть из когнатного лиганда рецептора, стимулирующего Т-клетки, например, CTLA-4, с одной или несколькими аминокислотными модификациями (например, аминокислотными заменами) в домене IgSF, которые увеличивают аффинность связывания с рецептором, стимулирующим Т-клетки (например, CD28).

Используемый в настоящей заявке термин «рецептор, стимулирующий Т-клетки», относится к молекуле клеточной поверхности, экспрессируемой на Т-клетке, где взаимодействие или лигирование молекулы приводит к прямой или косвенной активации одной или нескольких тирозинкиназ в клетке и/или завершается индукцией или потенцированием одной или нескольких эффекторных функций Т-клетки, в которой она

экспрессируется. Рецептор, стимулирующий Т-клетки, обычно содержит внеклеточную часть, трансмембранный домен и цитоплазматическую область. В некоторых вариантах осуществления цитоплазматическая область содержит внутриклеточный сигнальный домен, который включает мотив активации иммунорецептора на основе тирозина (ITAM; определяется последовательностью YXX(L/I)X6–8YXX(L/I)), или иным образом способен взаимодействовать с одним или несколькими вспомогательными белками, такими как один или несколько адаптерных белков, участвующих или регулирующих фосфорилирование тирозина в пути передачи сигнала. В некоторых случаях рецептор, стимулирующий Т-клетки, взаимодействует или связывается с адаптерным белком, который содержит ITAM, или адаптерным белком, который содержит один или несколько доменов, связывающих белок, таких как, например, домены гомологии Src 2 (SH2) и SH3, которые связывают определенные аминокислотные последовательности, например, остатки фосфотирозина, в белке в пути передачи сигнала. Примеры адаптерных белков включают, без ограничения указанными, Lck, Fyn, ZAP70, SLP76, PI3K, Grb2, PKCΘ и SHC1. Таким образом, понятно, что рецептор, стимулирующий Т-клетки, сам по себе не обязательно должен обладать собственной ферментативной активностью, но может косвенно опосредовать ферментативную активность через вспомогательные или адаптерные белки. Как правило, Т-клеточный стимулирующий рецептор инициирует, опосредует или потенцирует активацию Т-клетки, что приводит к измеримым морфологическим, фенотипическим и/или функциональным изменениям в Т-клетке, включая пролиферацию клеток, цитолитическую активность, продукцию или секрецию цитокинов, или экспрессию молекул клеточной поверхности, таких как рецепторы или молекулы адгезии. В некоторых вариантах осуществления рецептор, стимулирующий Т-клетки, включает Т-клеточный рецептор (TCR), CD3, CD4, CD8, CD28, ICOS или CD2. Например, рецептор, стимулирующий Т-клетки, представляет собой костимулирующий рецептор, такой как CD28.

Термин «транс» в отношении связывания с молекулами клеточной поверхности относится к связыванию с двумя разными молекулами клеточной поверхности, каждая из которых присутствует на поверхности другой клетки. В некоторых вариантах осуществления «транс» означает, что в отношении двух разных молекул клеточной поверхности первая присутствует исключительно на одной из двух клеток млекопитающих, образующих ИС, а вторая присутствует исключительно на второй из двух клеток млекопитающих, образующих ИС.

Используемый в настоящей заявке термин «трансмембранный белок» означает мембранный белок, который по существу или полностью охватывает липидный бислой,

такой как те липидные бислои, которые обнаруживаются в биологической мембране, такой как клетка млекопитающего, или в искусственной конструкции, такой как липосома. Трансмембранный белок содержит трансмембранный домен («трансмембранный домен»), с помощью которого он интегрируется в липидный бислой и благодаря которому эта интеграция является термодинамически стабильной в физиологических условиях. Трансмембранные домены обычно можно предсказать по их аминокислотной последовательности с помощью любого количества коммерческих программных приложений для биоинформатики на основе их повышенной гидрофобности по сравнению с областями белка, которые взаимодействуют с водной средой (например, цитозолем, внеклеточной жидкостью). Трансмембранный домен часто представляет собой гидрофобную альфа-спираль, охватывающую мембрану. Трансмембранный белок может проходить через оба слоя липидного бислоя один или несколько раз.

Термины «лечение» или «терапия» заболевания, состояния или расстройства, используемые в настоящей заявке, означают замедление, остановку или индукцию регресса заболевания или расстройства, о чем свидетельствует уменьшение, прекращение или устранение либо клинических, либо диагностических симптомов, путем введения иммуномодулирующего белка или сконструированных клеток по настоящему изобретению либо отдельно, либо в комбинации с другим соединением, как описано в настоящей заявке. «Лечение» или «терапия» также означает уменьшение тяжести симптомов при остром или хроническом заболевании, состоянии или расстройстве, или снижение частоты рецидивов, как, например, в случае рецидивирующего или ремиттирующего аутоиммунного течения заболевания или воспалительного состояния, или уменьшение воспаления в случае воспалительного аспекта аутоиммунного заболевания или воспалительного состояния. «Предупреждение» или «профилактика» заболевания или расстройства, используемые в контексте настоящего изобретения, относятся к введению иммуномодулирующего белка, либо отдельно, либо в комбинации с другим соединением, для предотвращения возникновения или развития заболевания или расстройства, или некоторых или всех симптомов заболевания, состояния или расстройства, или для уменьшения вероятности возникновения заболевания, состояния или расстройства.

Термин «вариант» (также «модифицированный» или «мутантный», который может использоваться взаимозаменяемо) применительно к вариантному белку или полипептиду означает белок, такой как белок млекопитающих (например, человеческий или мышиный), созданный вмешательством человека. Вариант представляет собой полипептид, имеющий измененную или модифицированную аминокислотную

последовательность, такую как одна или несколько аминокислотных замен, делеций, добавлений или их комбинаций, по сравнению с немодифицированным белком или белком дикого типа или его доменом. Вариантный полипептид может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более различий аминокислот, таких как аминокислотные замены. Вариантный полипептид обычно имеет по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с соответствующей формой белка дикого типа или немодифицированного белка, такой как его зрелая последовательность (лишенная сигнальной последовательности) или его часть, содержащая внеклеточный домен или его связывающий домен. Ненатуральные аминокислоты, а также натуральные аминокислоты включены в объем допустимых замен или добавлений. Вариант белка не ограничивается каким-либо конкретным способом получения и включает, например, химический синтез, методы рекомбинантной ДНК или их комбинации. Вариант белка по изобретению специфически связывается по меньшей мере с одним или несколькими партнерами по связыванию. В некоторых вариантах осуществления измененная аминокислотная последовательность приводит к измененной (т.е. повышенной или сниженной) активности связывания, такой как аффинность или авидность связывания, с одним или несколькими партнерами по связыванию. Таким образом, вариантный белок может представлять собой «модифицированный по аффинности» белок, как описано в настоящей заявке.

Термины «дикий тип», «натуральный» или «нативный», которые используются взаимозаменяемо, в данном контексте используются в связи с биологическими материалами, такими как молекулы нуклеиновых кислот, белки, клетки-хозяева и т.п., которые обнаруживаются в природе и не изменены вмешательством человека.

II. Иммуномодулирующие белки BCMA и вариантные полипептиды BCMA

В настоящей заявке предусмотрены иммуномодулирующие белки BCMA, которые содержат часть внеклеточного домена (ECD) рецептора BCMA, или его вариант, который связывается по меньшей мере с одним когнатным партнером по связыванию BCMA. В настоящей заявке также предложены варианты полипептидов BCMA, которые проявляют измененную (например, повышенную) активность связывания или аффинность к одному или нескольким когнатным партнерам по связыванию BCMA. В некоторых вариантах осуществления когнатным партнером по связыванию BCMA является один или несколько из BAFF или APRIL, или гетеротримера BAFF/APRIL. Предоставленные иммуномодулирующие белки и полипептиды BCMA включают их растворимые гибридные белки, в которых часть BCMA из внеклеточного домена или его варианта

связана с другим фрагментом, таким как Fc иммуноглобулина, или другим доменом мультимеризации или фрагментом, продлевающим период полужизни. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок представляет собой гибридный белок BCMA-Fc. В некоторых вариантах осуществления предложен гибридный белок BCMA-Fc, содержащий (1) полипептид BCMA, состоящий из внеклеточного домена рецептора BCMA или его части, или его вариантный полипептид BCMA, который связывается по меньшей мере с одним когнатным партнером по связыванию BCMA, и (2) домен Fc. Полипептид BCMA или вариантный полипептид BCMA может быть связан прямо или опосредованно (например, через пептидный линкер) с доменом Fc.

BCMA является членом семейства рецепторов фактора некроза опухоли, характеризующимся наличием внеклеточного домена (ECD), содержащего домен богатых цистеином псевдоповторов (CRD). BCMA представляет собой связанный с мембраной рецептор, который имеет внеклеточный домен, содержащий один CRD, трансмембранный домен и цитоплазматический домен, который содержит сайты связывания TRAF для связывания с сигнальными молекулами TRAF. BCMA связывается с когнатными лигандами APRIL и BAFF, хотя связывание с BAFF происходит с более слабой аффинностью. Сообщается, что BCMA связывается с BAFF на два-три порядка более слабым связыванием, по сравнению со связыванием между BAFF и его другими когнатными рецепторами BAFF-R и TACI (Bossen and Schneider et al. 2006 Seminars in Immunology, 18:263-75).

Аминокислотная последовательность полноразмерного BCMA показана в SEQ ID NO:667. Белок представляет собой мембранный белок типа II и не имеет сигнального пептида; после экспрессии в эукариотических клетках удаляется N-концевой метионин. В некоторых вариантах осуществления зрелый белок BCMA не содержит N-концевой метионин, как указано в SEQ ID NO:667. Внеклеточный домен BCMA (аминокислотные остатки 1-54 SEQ ID NO:667; ECD представлен в SEQ ID NO:710) содержит один богатый цистеином домен (CRD, далее также называемый доменом рецептора семейства некроза опухоли или TD), который проявляет аффинность к связыванию с APRIL и, в меньшей степени, с BAFF. CRD содержит аминокислотные остатки 7-41 последовательности, представленной в SEQ ID NO:710.

В некоторых вариантах осуществления варианты полипептидов BCMA, представленные в настоящей заявке, содержат одну или несколько аминокислотных модификаций, таких как одна или несколько замен (альтернативно, «мутаций» или «замен»), делеций или добавлений во внеклеточном домене эталонного полипептида

BCMA, такого как полипептид BCMA дикого типа или немодифицированный BCMA, содержащий CRD (далее также называемый TD). Таким образом, предоставленный вариантный полипептид BCMA представляет собой или включает вариантный TD («vTD»), в котором одна или несколько аминокислотных модификаций (например, замен) находятся в CRD.

В некоторых вариантах осуществления эталонная (например, немодифицированная) последовательность BCMA представляет собой последовательность BCMA дикого типа или ее часть, которая содержит CRD. В некоторых вариантах осуществления эталонный (например, немодифицированный) BCMA представляет собой или содержит внеклеточный домен (ECD) BCMA или его часть, содержащую CRD. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA содержит или по существу состоит из CRD или его специфически связывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления вариантный BCMA представляет собой растворимый полипептид и не имеет трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA дополнительно содержит трансмембранный домен и, в некоторых случаях, также цитоплазматический домен.

В некоторых вариантах осуществления эталонная (например, немодифицированная) последовательность BCMA представляет собой последовательность BCMA млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления эталонная (например, немодифицированная) последовательность BCMA может представлять собой последовательность BCMA млекопитающего, которая включает, без ограничения указанными, последовательность человека, мыши, яванской макаки или крысы. В некоторых вариантах осуществления эталонная (например, немодифицированная) последовательность BCMA является человеческой. Внеклеточный домен типичной последовательности BCMA человека представлен в SEQ ID NO:710.

В некоторых вариантах осуществления эталонная (например, немодифицированная) последовательность BCMA имеет (i) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:710, или его последовательность, в которой отсутствует N-концевой метионин, (ii) аминокислотную последовательность, которая проявляет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательность с SEQ ID NO:710 и которая связывается с APRIL или BAFF, или (iii) представляет собой фрагмент или часть (i) или (ii), содержащую CRD, где часть связывается с APRIL или BAFF. В некоторых вариантах осуществления в эталонной (например, немодифицированной) последовательности BCMA отсутствует N-концевой метионин, как указано в SEQ ID

NO:710.

Внеклеточный домен BCMA (ECD): SEQ ID NO:710

MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNA

В некоторых вариантах осуществления в эталонной (например, немодифицированной) последовательности BCMA отсутствует N-концевой метионин, как указано в SEQ ID NO:710. В некоторых вариантах осуществления эталонная (например, немодифицированная) последовательность BCMA содержит (i) аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:356, (ii) аминокислотную последовательность, которая проявляет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO:356 и которая связывается с APRIL или BAFF, или (iii) представляет собой фрагмент или часть (i) или (ii), содержащие CRD, где часть связывается с APRIL или BAFF.

Внеклеточный домен BCMA (ECD): SEQ ID NO:356

LQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNA

Среди представленных полипептидов BCMA имеются вариантные полипептиды BCMA. Также предусмотрены иммуномодулирующие белки, такие как гибридные белки BCMA-Fc, которые содержат предоставленный вариантный полипептид BCMA. В некоторых представленных вариантах осуществления вариантная последовательность BCMA имеет последовательность эталонной (например, немодифицированной) последовательности BCMA, такую как любая из описанных выше, но дополнительно содержит еще одну аминокислотную модификацию, такую как одна или несколько аминокислотных замен. В частности, в настоящей заявке предусмотрены вариантные полипептиды BCMA, содержащие по меньшей мере один TD-домен с модифицированной аффинностью (CRD) или его специфически связывающий фрагмент, который содержит одну или несколько аминокислотных замен в TD-домене эталонного (например, немодифицированного или дикого типа) полипептида BCMA, так что вариантный полипептид BCMA проявляет измененную (например, повышенную) связывающую активность или аффинность к одному или обоим из APRIL или BAFF по сравнению с эталонным (например, немодифицированным или диким типом) полипептидом BCMA. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA имеет аффинность связывания с APRIL и/или BAFF, которая отличается от таковой для эталонной последовательности (например, немодифицированного или дикого типа) полипептида BCMA, как определено, например, с помощью твердофазных иммуноанализов ELISA, проточной цитометрии или анализов Biacore. Аффинности связывания для каждого

когнатного партнера по связыванию независимы; то есть в некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA имеет повышенную аффинность связывания для одного или обоих APRIL и BAFF, и пониженную или неизменную аффинность связывания для другого из APRIL или BAFF по сравнению с эталонным (например, немодифицированным или дикого типа) полипептидом BCMA.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA обладает повышенной аффинностью связывания с BAFF по сравнению с эталонным полипептидом (немодифицированным или дикого типа) BCMA. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA обладает повышенной аффинностью связывания с APRIL по сравнению с эталонным (немодифицированным или диким типом) полипептидом BCMA. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA обладает повышенной аффинностью связывания с APRIL и BAFF по сравнению с эталонным (немодифицированным или диким типом) полипептидом BCMA. Когнатные лиганды BAFFF и/или APRIL могут быть белком млекопитающего, таким как белок человека или белок мыши. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA с повышенной или большей аффинностью связывания с APRIL и/или BAFF будет иметь увеличение аффинности связывания по сравнению с эталонным (например, немодифицированным или диким типом) контрольным полипептидом BCMA по меньшей мере примерно на 5%, например, по меньшей мере примерно на 10%, 15%, 20%, 25%, 35% или 50%. В некоторых вариантах осуществления увеличение аффинности связывания относительно эталонного (например, немодифицированного или дикого типа) полипептида BCMA составляет более чем в 1,2 раза, в 1,5 раза, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 6 раз, в 7 раз, в 8 раз, в 9 раз, в 10 раз, в 20 раз, в 30 раз, в 40 раз или в 50 раз. В любом из примеров эталонный полипептид BCMA (например, немодифицированный или дикого типа) имеет ту же последовательность, что и вариантный полипептид BCMA, за исключением того, что он не содержит одной или нескольких аминокислотных модификаций (например, замен).

В некоторых вариантах осуществления равновесная константа диссоциации (K_d) любого из предыдущих вариантов осуществления относительно BAFF может быть меньше 1×10^{-5} M, 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M или 1×10^{-11} M, или 1×10^{-12} M. В некоторых вариантах осуществления K_d из любого из предыдущих вариантов осуществления по отношению к BAFF составляет менее или примерно 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M или 1×10^{-11} M, или 1×10^{-12} M. В некоторых вариантах осуществления K_d любого из предыдущих вариантов осуществления по отношению к BAFF составляет от 1×10^{-9} M до 1×10^{-12} M или примерно в этом диапазоне. В некоторых вариантах осуществления K_d

любого из предыдущих вариантов осуществления по отношению к BAFF составляет точно или примерно 1×10^{-9} M, точно или примерно 2×10^{-9} M, точно или примерно 4×10^{-9} M, точно или примерно 6×10^{-9} M, точно или примерно 8×10^{-9} M, точно или примерно 1×10^{-10} M, точно или примерно 2×10^{-9} M, точно или примерно 4×10^{-10} M, точно или примерно 6×10^{-10} M, точно или примерно 8×10^{-10} M, точно или примерно 1×10^{-11} M, точно или примерно 2×10^{-11} M, точно или примерно 4×10^{-11} M, точно или примерно 6×10^{-11} M, точно или примерно 8×10^{-11} M, или точно или примерно 1×10^{-12} M, или любое значение между любыми из вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления предоставленный вариант осуществления включает вариантный полипептид BCMA, как описано выше, и K_d к BAFF снижена (более высокая аффинность связывания) более чем, или более чем примерно в 1,5 раза, например, более чем или примерно в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз и более.

В некоторых вариантах осуществления равновесная константа диссоциации (K_d) из любого из предыдущих вариантов осуществления по отношению к APRIL может быть меньше 1×10^{-5} M, 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M или 1×10^{-11} M, или 1×10^{-12} M. В некоторых вариантах осуществления K_d из любого из предыдущих вариантов осуществления по отношению к APRIL составляет менее или примерно 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M или 1×10^{-11} M, или 1×10^{-12} M. В некоторых вариантах осуществления K_d из любого из предыдущих вариантов осуществления по отношению к APRIL составляет от 1×10^{-9} M до 1×10^{-12} M, или примерно в этом диапазоне. В некоторых вариантах осуществления K_d из любого из предыдущих вариантов осуществления по отношению к APRIL составляет точно или примерно 1×10^{-9} M, точно или примерно 2×10^{-9} M, точно или примерно 4×10^{-9} M, точно или примерно 6×10^{-9} M, точно или примерно 8×10^{-9} M, точно или примерно 1×10^{-10} M, точно или примерно 2×10^{-9} M, точно или примерно 4×10^{-10} M, точно или примерно 6×10^{-10} M, точно или примерно 8×10^{-10} M, точно или примерно 1×10^{-11} M, точно или примерно 2×10^{-11} M, точно или примерно 4×10^{-11} M, точно или примерно 6×10^{-11} M, точно или примерно 8×10^{-11} M или точно или примерно 1×10^{-12} M, или любое значение между любыми из вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления предоставленный вариант осуществления включает вариантный полипептид BCMA, как описано выше, и значение K_d к APRIL снижено (более высокая аффинность связывания) более чем или примерно в 1,5 раза, например, более чем или примерно в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз и более.

Эталонная (например, немодифицированная или дикого типа) последовательность BCMA при необходимости должна использоваться в качестве исходной композиции для получения вариантных полипептидов BCMA, описанных в настоящей заявке.

Следовательно, использование термина «модификация», такого как «замена», не означает, что настоящие варианты осуществления ограничиваются конкретным способом получения вариантных полипептидов BCMA или иммуномодулирующих белков, содержащих их. Вариантные полипептиды BCMA могут быть получены, например, путем синтеза пептидов de novo и, таким образом, не обязательно требуют модификации, такой как «замена», в смысле изменения кодона для кодирования модификации, например, замены. Этот принцип также распространяется на термины «добавление» и «удаление» аминокислотного остатка, которые также не подразумевают конкретного метода получения. Способы, с помощью которых конструируют или создают вариантные полипептиды BCMA, не ограничиваются каким-либо конкретным способом. Однако в некоторых вариантах осуществления эталонную (например, немодифицированную или дикого типа) нуклеиновую кислоту, кодирующую BCMA, подвергают мутагенезу из эталонного (например, немодифицированного или дикого типа) генетического материала BCMA, и подвергают скринингу на необходимую аффинность специфического связывания или другую функциональную активность. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA синтезируют de novo с использованием белковых последовательностей или последовательностей нуклеиновых кислот, доступных в любом количестве общедоступных баз данных, а затем подвергают последующему скринингу. Национальный центр биотехнологической информации предоставляет такую информацию, и его веб-сайт общедоступен через Интернет, как и база данных UniProtKB, как обсуждалось ранее.

Если не указано иное, как изложено в настоящем описании, аминокислотная модификация (модификации) в вариантном полипептиде BCMA обозначена номером положения аминокислоты, соответствующим нумерации положений эталонной последовательности ECD, указанной в SEQ ID NO:710. Специалист в данной области техники может идентифицировать соответствующее положение модификации, например, аминокислотную замену в полипептиде BCMA, включая его часть, содержащую его TD (CRD), например, путем выравнивания эталонной последовательности (например, SEQ ID NO:356) с SEQ ID NO:710. Выравнивание, идентифицирующее соответствующие остатки, показано на Фиг.17B. В перечне модификаций в настоящем изобретении положение аминокислоты указано в середине, с соответствующей ссылкой на аминокислоту (например, немодифицированной или дикого типа), указанную перед номером, и идентифицированным вариантом аминокислотной замены, указанным после номера. Если модификация представляет собой удаление положения, указывается «del», а если модификация представляет собой вставку в положение, указывается «ins». В некоторых

случаях вставка указана с положением аминокислоты, указанным в середине, с соответствующей эталонной аминокислотой, указанной до и после номера, а идентифицированная вариантная аминокислотная вставка указана после немодифицированной (например, дикого типа) аминокислоты.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замену в эталонной (например, немодифицированной или дикого типа) последовательности BCMA, такой как любая из описанных. Модификация одной или нескольких аминокислот, например, замена, может находиться в эктодомене (внеклеточном домене) эталонной (например, немодифицированной или дикого типа) последовательности BCMA. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных модификаций, например, замена находится в домене CRD или его фрагменте специфического связывания.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA имеет до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных модификаций, например, замену. Модификация, например, замена может быть в CRD. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA имеет до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных замен в CRD или его фрагменте специфического связывания. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA, содержащий одну или несколько аминокислотных модификаций (например, замены аминокислот), как описано, имеет по меньшей мере примерно 85%, 86%, 86%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с эталонным (например, немодифицированным или диким типом) полипептидом BCMA или его фрагментом специфического связывания, таким как аминокислотная последовательность SEQ ID NO:710 или 356. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA, содержащий одну или несколько аминокислотных модификаций (например, замены аминокислот), как описано, имеет по меньшей мере примерно 85%, 86%, 86%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:710. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA, содержащий одну или несколько аминокислотных модификаций (например, замены аминокислот), как описано, имеет по меньшей мере примерно 85%, 86%, 86%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:356.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA имеет одну

или несколько аминокислотных модификаций, например, замену в эталонном полипептиде BCMA или его фрагменте специфического связывания, соответствующую (соответствующие) положению (положениям) 9, 10, 11, 14, 16, 19, 20, 22, 25, 27, 29, 30, 31, 32, 35, 36, 39, 43, 45, 46, 47 или 48 со ссылкой на нумерацию SEQ ID NO:710. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замену, выбранную из S9G, S9N, S9Y, Q10E, Q10P, N11D, N11S, F14Y, S16A, H19A, H19C, H19D, H19E, H19F, H19G, H19I, H19K, H19L, H19M, H19N, H19P, H19Q, H19R, H19S, H19T, H19V, H19W, H19Y, A20T, I22L, I22V, Q25E, Q25F, Q25G, Q25H, Q25I, Q25K, Q25L, Q25M, Q25S, Q25V, Q25Y, R27H, R27L, S29P, S30G, S30Y, N31D, N31G, N31H, N31K, N31L, N31M, N31P, N31S, N31V, N31Y, T32I, T32S, L35A, L35M, L35P, L35S, L35V, L35Y, T36A, T36G, T36N, T36M, T36S, T36V, R39L, R39Q, A43E, A43S, V45A, V45D, V45I, T46A, T46I, N47D, N47Y, S48G, или их консервативную аминокислотную замену. В некоторых вариантах осуществления эталонный полипептид BCMA указан в SEQ ID NO:356.

Консервативная модификация аминокислот, например, замена представляет собой любую аминокислоту, которая относится к тому же классу аминокислот, что и замещенные аминокислоты, кроме эталонной (например, немодифицированной) или аминокислоты дикого типа. Классами аминокислот являются алифатические (глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин), гидроксил- или серосодержащие (серин, цистеин, треонин и метионин), циклические (пролин), ароматические (фенилаланин, тирозин, триптофан), основные (гистидин, лизин и аргинин) и кислые/амидные (аспартат, глутамат, аспарагин и глутамин).

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении 9. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислотная замена представляет собой S9G, S9N, S9Y.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении 10. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один аминокислотная замена представляет собой Q10E, Q10P.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении 11. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислотная замена представляет собой N11D, N11S.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA включает

по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении 19. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислотная замена представляет собой H19A, H19C, H19D, H19E, H19F, H19G, H19I, H19K, H19L, H19M, H19N, H19P, H19Q, H19R, H19S, H19T, H19V, H19W, H19Y. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислотная замена представляет собой H19L. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислотная замена представляет собой H19K. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислотная замена представляет собой H19Q. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислотная замена представляет собой H19R. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислотная замена представляет собой H19Y.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении 22. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислотная замена представляет собой I22L, I22V.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении 25. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислотная замена представляет собой Q25E, Q25F, Q25G, Q25H, Q25I, Q25K, Q25L, Q25M, Q25S, Q25V, Q25Y.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении 27. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислотная замена представляет собой R27H, R27L.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении 30. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислотная замена представляет собой S30G, S30Y.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении 31. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислотная замена представляет собой N31D, N31G, N31H, N31K, N31L, N31M, N31P, N31S, N31V, N31Y.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении 32. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислотная замена представляет собой T32I, T32S.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA включает

по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении 35. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислотная замена представляет собой L35A, L35M, L35P, L35S, L35V, L35Y.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении 36. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислотная замена представляет собой T36A, T36G, T36N, T36M, T36S, T36V.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении 39. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислотная замена представляет собой R39L, R39Q.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении 43. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислотная замена представляет собой A43E, A43S.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении 45. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислотная замена представляет собой V45A, V45D, V45I.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении 46. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислотная замена представляет собой T46A, T46I.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении 47. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислотная замена представляет собой N47D, N47Y.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают S16A/H19Y/R39Q.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA содержит любую из мутаций, перечисленных в Таблице 1. В Таблице 1 также представлены типичные последовательности со ссылкой на SEQ ID NO эталонного (например, немодифицированного) полипептида BCMA и типичные варианты полипептидов BCMA. Как указано, точный локус или остатки, соответствующие данному домену, могут варьировать, например, в зависимости от методов, используемых для идентификации или

классификации домена. Кроме того, в некоторых случаях соседние N- и/или C-концевые аминокислоты данного домена (например, CRD) также могут быть включены в последовательность вариантного полипептида BCMA, например, для обеспечения надлежащего фолдинга домена при экспрессии. Таким образом, следует понимать, что примеры SEQ ID NOS в Таблице 1 не следует рассматривать как ограничивающие. Например, конкретный домен, такой как домен ECD или его часть, содержащая только CRD1/CRD2 или CRD2 варианта полипептида BCMA, может быть на несколько аминокислот длиннее или короче, например, на 1-10, например, на 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот длиннее или короче последовательности аминокислот, указанной в соответствующей SEQ ID NO.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA содержит любую из мутаций, перечисленных в Таблице 1. В некоторых примерах мутации вносят в эталонный BCMA, содержащий последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:710. В некоторых примерах мутации вносят в эталонный BCMA, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:356.

Использование термина «модификация», такого как «замена» или «мутация», не означает, что настоящие варианты осуществления ограничиваются конкретным способом получения иммуномодулирующих белков. Вариантный полипептид BCMA может быть получен, например, путем синтеза пептида de novo и, таким образом, не обязательно требует модификации, такой как «замена» в смысле изменения кодона для кодирования модификации, например, замены. Этот принцип также распространяется на термины «добавление» и «делеция» аминокислотного остатка, которые также не подразумевают конкретного метода получения. Средства, с помощью которых разрабатывают или создают vTD, не ограничиваются каким-либо конкретным методом. Однако в некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту, кодирующую TD дикого типа или немодифицированный TD, подвергают мутагенезу из генетического материала TD дикого типа или немодифицированного типа, и подвергают скринингу на необходимую специфическую связывающую активность, например, аффинность связывания и/или изменение модуляции NF-κB или другой функциональной активности. В некоторых вариантах осуществления vTD синтезируют de novo с использованием белковых последовательностей или последовательностей нуклеиновых кислот, доступных в любом количестве общедоступных баз данных, а затем подвергают последующему скринингу. Национальный центр биотехнологической информации предоставляет такую информацию, и его веб-сайт общедоступен через Интернет, как и база данных UniProtKB.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA содержит

последовательности внеклеточного домена (ECD), указанные в любой из SEQ ID NO:357-435. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA содержит полипептидную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 91% идентичности, по меньшей мере 92% идентичности, по меньшей мере 93% идентичности, по меньшей мере 94% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, такой как по меньшей мере 96% идентичности, 97% идентичности, 98% идентичности или 99% идентичности с любой из SEQ ID NO:357-435, и сохраняет аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены) в нем, отсутствующую в эталонном (например, немодифицированном или диком типе) BCMA. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA содержит фрагмент специфического связывания любой из SEQ ID NO:357-435, где фрагмент специфического связывания связывает BAFF и/или APRIL и содержит непрерывную последовательность, включающую аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены), отсутствующая в эталонном (например, немодифицированном или диком типе) BCMA.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:381. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA состоит по существу из последовательности, представленной в SEQ ID NO:381. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:381.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:405. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA состоит по существу из последовательности, представленной в SEQ ID NO:405. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:405.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:406. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA состоит по существу из последовательности, представленной в SEQ ID NO:406. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:406.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:410. В некоторых вариантах

осуществления вариантный полипептид BCMA состоит по существу из последовательности, представленной в SEQ ID NO:410. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:410.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:411. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA состоит по существу из последовательности, представленной в SEQ ID NO:411. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:411.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA кодируется последовательностью нуклеотидов, представленной в любой из SEQ ID NO:437-515. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид BCMA кодируется последовательностью нуклеотидов, которая демонстрирует по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 91% идентичности, по меньшей мере 92% идентичности, по меньшей мере 93% идентичности, по меньшей мере 94% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, такую как по меньшей мере 96% идентичности, 97% идентичности, 98% идентичности или 99% идентичности с любой из SEQ ID NO:437-515, и сохраняет аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены), отсутствующую в эталонном (например, немодифицированном или диком типе) BCMA. Также в настоящей заявке предложена нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO:437-515, или последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 91% идентичности, по меньшей мере 92% идентичности, по меньшей мере 93% идентичности, по меньшей мере 94% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, например, по меньшей мере 96% идентичности, 97% идентичности, 98% идентичности или 99% идентичности с любой из SEQ ID NO:437-515.

Таблица 1: Примерный вариант BCMA в BCMA-иммуномодулирующем белке (например, BCMA-Fc) или в качестве BIM			
Наименование	**Мутация (мутации)**	**ECD SEQ ID NO**	
		AA SEQ ID NO	**NT SEQ ID NO**
356 (WT) BCMA	Дикий тип	356	436
357 BCMA	H19Y	357	437
358 BCMA	H19Y, S30G	358	438
359 BCMA	H19Y, V45A	359	439
360 BCMA	F14Y, H19Y	360	440
361 BCMA	H19Y, V45D	361	441
362 BCMA	H19Y, A43E	362	442
363 BCMA	H19Y, T36A	363	443
364 BCMA	H19Y, I22V	364	444
365 BCMA	N11D, H19Y	365	445
366 BCMA	H19Y, T36M	366	446
367 BCMA	N11S, H19Y	367	447
368 BCMA	H19Y, L35P, T46A	368	448
369 BCMA	H19Y, N47D	369	449
370 BCMA	S9D, H19Y	370	450
371 BCMA	H19Y, S30G, V45D	371	451
372 BCMA	H19Y, R39Q	372	452
373 BCMA	H19Y, L35P	373	453
374 BCMA	S9D, H19Y, R27H	374	454
375 BCMA	Q10P, H19Y, Q25H	375	455
376 BCMA	H19Y, R39L, N47D	376	456
377 BCMA	N11D, H19Y, N47D	377	457
378 BCMA	H19Y, T32S	378	458
379 BCMA	N11S, H19Y, S29P	379	459
380 BCMA	H19Y, R39Q, N47D	380	460
381 BCMA	S16A, H19Y, R39Q	381	461
382 BCMA	S9N, H19Y, N31K, T46I	382	462
383 BCMA	H19Y, R27L, N31Y, T32S, T36A	383	463
384 BCMA	N11S, H19Y, T46A	384	464
385 BCMA	H19Y, T32I	385	465
386 BCMA	S9G, H19Y, T36S, A43S	386	466
387 BCMA	H19Y, S48G	387	467
388 BCMA	S9N, H19Y, I22V, N31D	388	468
389 BCMA	S9N, H19Y, Q25K, N31D	389	469
390 BCMA	S9G, H19Y, T32S	390	470
391 BCMA	H19Y, T36A, N47Y	391	471
392 BCMA	H19Y, V45A, T46I	392	472
393 BCMA	H19Y, Q25K, N31D	393	473
394 BCMA	H19Y, Q25H, R39Q, V45D	394	474
395 BCMA	H19Y, T32S, N47D	395	475
396 BCMA	Q10E, H19Y, A20T, T36S	396	476

Таблица 1: Примерный вариант BCMA в BCMA-иммуномодулирующем белке (например, BCMA-Fc) или в качестве BIM			
Наименование	**Мутация (мутации)**	**ECD SEQ ID NO**	
		AA SEQ ID NO	**NT SEQ ID NO**
397 BCMA	H19Y, T32S, V45I	397	477
398 BCMA	H19A	398	478
399 BCMA	H19C	399	479
400 BCMA	H19D	400	480
401 BCMA	H19E	401	481
402 BCMA	H19F	402	482
403 BCMA	H19G	403	483
404 BCMA	H19I	404	484
405 BCMA	H19K	405	485
406 BCMA	H19L	406	486
407 BCMA	H19M	407	487
408 BCMA	H19N	408	488
409 BCMA	H19P	409	489
410 BCMA	H19Q	410	490
411 BCMA	H19R	411	491
412 BCMA	H19S	412	492
413 BCMA	H19T	413	493
414 BCMA	H19V	414	494
415 BCMA	H19W	415	495
416 BCMA	H19F, Q25E, N31L, L35Y, T36S	416	496
417 BCMA	H19F, Q25F, N31S, T36S	417	497
418 BCMA	H19I, Q25F, N31S, T36V	418	498
419 BCMA	H19F, Q25V, N31M, T36S	419	499
420 BCMA	H19Y, Q25Y, N31L, L35Y, T36S	420	500
421 BCMA	H19F, Q25I, N31M, L35A, T36S	421	501
422 BCMA	H19I, Q25L, N31L, L35Y, T36S	422	502
423 BCMA	H19F, Q25L, N31G, L35P, T36A	423	503
424 BCMA	H19Y, I22L, N31G	424	504
425 BCMA	H19F, I22V, Q25M, N31P, T36M	425	505
426 BCMA	H19Y, N31L, L35Y, T36S	426	506
427 BCMA	H19L, S30G, N31H, L35A	427	507
428 BCMA	H19L, Q25S, N31V, L35S, T36V	428	508
429 BCMA	H19L, Q25S, S30Y, N31G, L35M, T36V	429	509
430 BCMA	H19F, Q25F, N31L, L35Y, T36S	430	510
431 BCMA	H19F, Q25F, N31S, T36G	431	511
432 BCMA	H19F, I22V, Q25S, N31V, L35S, T36V	432	512
433 BCMA	H19F, Q25G, N31S, L35V, T36N	433	513
434 BCMA	H19L, Q25H, N31D, L35S	434	514
435 BCMA	H19F, Q25F, N31S, L35Y, T36S	435	515

В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке также представлены гибридные последовательности ECD BCMA, в которых любая из вышеуказанных

последовательностей BCMA связана или гибридизована с доменом мультимеризации, таким как любой описанный в настоящей заявке. Примеры доменов мультимеризации описаны в Разделе IV.C. В некоторых вариантах осуществления домен мультимеризации представляет собой Fc-область иммуноглобулина (например, IgG1), в которой гибридный белок представляет собой BCMA-Fc, включающий (1) последовательность BCMA, содержащую любую из предоставленных последовательностей ECD BCMA; и (2) Fc область иммуноглобулина. Таким образом, среди представленных вариантов осуществления находятся белки гибридизации BCMA-Fc, включающие (1) последовательность BCMA, содержащую или состоящую из любой из вышеописанных полипептидных последовательностей ECD BCMA, таких как вариантный полипептид BCMA; и (2) Fc область иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления гибрид BCMA-Fc представляет собой вариант гибридизации BCMA-Fc, содержащий или состоящий из любого из вышеописанных вариантов полипептидов BCMA и Fc-области иммуноглобулина.

В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке представлен вариант гибридной последовательности BCMA-Fc, который включает (1) последовательность ECD BCMA, содержащую последовательность, указанную в любом из SEQ ID NO:357-435, и (2) Fc область иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке представлен вариант гибридной последовательности BCMA-Fc, который включает (1) последовательность ECD BCMA, которая состоит по существу или состоит из последовательности, изложенной в любой из SEQ ID NO:357-435, и (2) Fc область иммуноглобулина.

В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке представлен вариант гибридной последовательности BCMA-Fc, который включает (1) последовательность ECD BCMA, содержащую последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO:357-435, и (2) Fc область иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления здесь представлен вариант гибридной последовательности BCMA-Fc, который содержит (1) последовательность ECD BCMA, которая состоит или по существу состоит из последовательности, изложенной в любой из SEQ ID NO:357-435, и (2) Fc область иммуноглобулина.

В представленных вариантах осуществления BCMA-Fc Fc область иммуноглобулина может представлять собой Fc иммуноглобулина дикого типа, такую как Fc IgG1. В некоторых случаях Fc область может быть вариантом Fc, у которого отсутствует эффекторная функция (также называемая «безэффекторной Fc»). Примерные Fc-области и их варианты в предоставленных гибридных белках BCMA-Fc описаны ниже

в Разделе IV.C.

В некоторых вариантах осуществления Fc является мышиной или человеческой Fc. В некоторых вариантах осуществления Fc представляет собой Fc области IgGl, lgG2, lgG3 или lgG4 млекопитающих или человека.

В некоторых вариантах осуществления Fc является производной от IgG1, такого как человеческий IgG1. В некоторых вариантах осуществления Fc представляет собой Fc IgG1, указанную в SEQ ID NO:586, имеющую аллотип, содержащий остатки Глу (E) и Мет (M) в положениях 356 и 358 по нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления Fc содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:586, или последовательность аминокислот, которая проявляет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO:586. В других вариантах осуществления Fc представляет собой Fc IgG1, которая содержит аминокислоты человеческого аллотипа G1m1, такие как остатки, содержащие Asp (D) и Leu (L) в положениях 356 и 358, например, как указано в SEQ ID NO:597. Таким образом, в некоторых случаях Fc, представленная в настоящей заявке, может содержать аминокислотные замены E356D и M358L для восстановления остатков аллотипа G1m1. В некоторых вариантах осуществления Fc содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:597, или последовательность аминокислот, которая проявляет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO:597.

В некоторых вариантах осуществления Fc область имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:597.

В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:755. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:756. В некоторых вариантах осуществления Fc-область, используемая в конструкции, представленной в настоящей заявке, может дополнительно не содержать С-концевого остатка лизина.

В некоторых вариантах осуществления Fc является производной от IgG2, такого как человеческий IgG2. В некоторых вариантах осуществления Fc содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:726, или аминокислотную последовательность, которая проявляет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO:726.

В некоторых вариантах осуществления Fc является производной от IgG4, такого

как человеческий IgG4. В некоторых вариантах осуществления Fc содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:727, или аминокислотную последовательность, которая проявляет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO:727. В некоторых вариантах осуществления Fc IgG4 представляет собой стабилизированную Fc, в которой домен CH3 человеческого IgG4 заменен доменом CH3 человеческого IgG1, и которая проявляет ингибированное образование агрегатов, антитело, в котором домены CH3 и CH2 человеческого IgG4 заменены доменами CH3 и CH2 человеческого IgG1 соответственно, или антитело, в котором аргинин в положении 409, указанный в индексе EU, предложенном Kabat et al. человеческого IgG4, замещен лизином и которое проявляет ингибированное образование агрегатов (см., например, патент США № 8,911,726). В некоторых вариантах осуществления Fc представляет собой IgG4, содержащий мутацию S228P, которая, как было показано, предотвращает рекомбинацию между терапевтическим антителом и эндогенным IgG4 путем обмена Fab-плеча (см., например, Labrijin et al. (2009) Nat. Biotechnol., 27(8): 767-71). В некоторых вариантах осуществления Fc содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:728, или последовательность аминокислот, которая проявляет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO:728.

В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой вариантную Fc-область, в которой Fc дикого типа модифицирована одной или несколькими аминокислотными заменами для снижения эффекторной активности или для придания Fc инертности для Fc-эффекторной функции. Примеры безэффекторных или инертных мутаций включают мутации, описанные в настоящей заявке, в том числе в Разделе IV.C. В некоторых вариантах осуществления Fc-область иммуномодулирующих белков включает Fc-область, в которой любая одна или несколько аминокислот в положениях 234, 235, 236, 237, 238, 239, 270, 297, 298, 325, и 329 (обозначены нумерацией EU) заменены различными аминокислотами по сравнению с нативной Fc областью. Такие изменения Fc-области включают, например, такие изменения, как дегликозилированные цепи (N297A и N297Q), IgG1-N297G, IgG1-L234A/L235A, IgG1-L234A/L235E/G237A, IgG1-A325A/A330S/P331S, IgG1-C226S/C229S, IgG1-C226S/C229S/E233P/L234V/L235A, IgG1-E233P/L234V/L235A/G236del/ S267K, IgG1-L234F/L235E/P331S, IgG1-S267E/L328F, IgG2-V234A/G237A, IgG2-H268Q/V309L/A330S/A331S, IgG4-L235A/G237A/E318A, и IgG4-L236E описанные в Current Opinion in Biotechnology (2009) 20 (6), 685-691; изменения,

такие как G236R/L328R, L235G/G236R, N325A/L328R и N325LL328R, описанные в WO 2008/092117; вставки аминокислот в положениях 233, 234, 235 и 237 (обозначены по нумерации EU); и изменения в участках, описанные в WO 2000/042072.

В некоторых вариантах осуществления вариант Fc-области, содержащий одну или несколько аминокислотных модификаций (например, аминокислотных замен), получен из IgG1 дикого типа, такого как IgG1 человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления Fc IgG1 дикого типа может быть Fc, указанной в SEQ ID NO:586, имеющей аллотип, содержащий остатки Глу (E) и Мет (M) в положениях 356 и 358 по нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc-область получена из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:586. В других вариантах осуществления Fc IgG1 дикого типа содержит аминокислоты человеческого аллотипа G1m1, такие как остатки, содержащие Asp (D) и Leu (L) в положениях 356 и 358, например, как указано в SEQ ID NO:597. Таким образом, в некоторых случаях вариантная Fc является производной от аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:597.

В некоторых вариантах осуществления в Fc-области отсутствует C-концевой лизин, соответствующий положению 232 дикого типа или немодифицированной Fc, указанной в SEQ ID NO:586 или 597 (соответствует K447del по нумерации EU).

В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc-область содержит аминокислотную модификацию C5S дикого типа или немодифицированную Fc-область с нумерацией SEQ ID NO:586 (соответствует C220S по нумерации EU).

В некоторых вариантах осуществления Fc область представляет собой вариантную Fc, которая содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, которая является N82G по нумерации SEQ ID NO:586 (соответствует N297G по нумерации EU). В некоторых вариантах осуществления Fc дополнительно содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, которая является R77C или V87C по нумерации SEQ ID NO:586 (соответствует R292C или V302C по нумерации EU). В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc область дополнительно содержит модификацию аминокислоты C5S с нумерацией SEQ ID NO:586 (соответствует C220S по нумерации EU). Например, в некоторых вариантах осуществления вариантная Fc область содержит следующие модификации аминокислот: N297G и одну или несколько из следующих модификаций аминокислот C220S, R292C или V302C по нумерации EU (соответствует N82G и одной или нескольким из следующих модификаций аминокислот C5S, R77C или V87C со ссылкой на SEQ ID NO:586), например, Fc область содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:598.

В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc содержит аминокислотные замены L234A/L235E/G237A, по нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc содержит аминокислотные замены A330S/P331S по нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc содержит аминокислотные замены L234A/L235E/G237A/A330S/P331S (Gross et al. (2001), Immunity 15:289). В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:757. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:758. В некоторых вариантах осуществления Fc область, используемая в конструкции, представленной в настоящей заявке, может дополнительно не содержать С-концевого остатка лизина.

В некоторых вариантах осуществления Fc область представляет собой вариантную Fc, которая включает мутации L234A, L235E и G237A по нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления Fc дикого типа дополнительно модифицируют путем удаления одного или нескольких остатков цистеина, таких как замена остатков цистеина на остаток серина в положении 220 (C220S) по нумерации EU. Примеры инертных Fc-областей, имеющих пониженную эффекторную функцию, приведены в SEQ ID NO:599 и SEQ ID NO:591, которые основаны на аллотипах, изложенных в SEQ ID NO:586 или SEQ ID NO:597, соответственно. В некоторых вариантах осуществления в Fc-области может дополнительно отсутствовать С-концевой остаток лизина. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc-область содержит одну или несколько аминокислотных модификаций C220S, L234A, L235E или G237A, например, Fc-область содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:589, 591, 599 или 724. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:589. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:591. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:599. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:724.

В некоторых вариантах осуществления Fc область представляет собой вариантную Fc, которая имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:589.

В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой вариантную Fc-область, которая содержит одну или несколько аминокислотных модификаций C220S, L235P, L234V, L235A, G236del или S267K, например, Fc-область содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:722. В некоторых вариантах осуществления в Fc-области отсутствует С-концевой лизин, соответствующий положению 232 дикого

типа или немодифицированной Fc, указанной в SEQ ID NO:586 (соответствует K447del по нумерации EU).

В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой вариантную Fc-область, которая содержит одну или несколько аминокислотных модификаций C220S, R292C, N297G, V302C. В некоторых вариантах осуществления в Fc-области отсутствует C-концевой лизин, соответствующий положению 232 дикого типа или немодифицированной Fc, указанной в SEQ ID NO:586 (соответствует K447del по нумерации EU). Примерная вариантная Fc область указана в SEQ ID NO:723.

В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc-область содержит одну или несколько аминокислотных модификаций C220S/E233P/L234V/L235A/G236del/S267K. В некоторых вариантах осуществления в Fc-области отсутствует C-концевой лизин, соответствующий положению 232 дикого типа или немодифицированной Fc, указанной в SEQ ID NO:586 (соответствует K447del по нумерации EU). Примерная вариантная Fc область изложена в SEQ ID NO:725.

В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой вариантную Fc-область, содержащую любую комбинацию Fc мутаций в Таблице 4. В некоторых вариантах осуществления Fc область является вариантной Fc областью, имеющий последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO в Таблице 4.

Например, вариантная Fc-область может представлять собой Fc без эффекторной активности, которая проявляет пониженную эффекторную активность по сравнению с IgG1 дикого типа, указанным в SEQ ID NO:586 или SEQ ID NO:597. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc содержит последовательность аминокислот, указанную в любой из следующих SEQ ID NO:591, 598, 599, 722, 589, 723, 724, или 725, или последовательность аминокислот, которая проявляет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности с любой из SEQ ID NO:591, 598, 599722, 589, 723, 724, или 725. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:589.

В некоторых вариантах осуществления полипептид BCMA, такой как вариантный полипептид BCMA, непосредственно связан с последовательностью Fc. В некоторых вариантах осуществления полипептид BCMA, такой как вариантный полипептид BCMA, опосредованно связан с последовательностью Fc, например, через линкер. В некоторых вариантах осуществления один или несколько «пептидных линкеров» связывают полипептид BCMA (например, вариантный полипептид BCMA) и Fc-область. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер может представлять собой один

аминокислотный остаток или более по длине. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер имеет по меньшей мере один аминокислотный остаток, но не более 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, или 1 аминокислотных остатков по длине. Примерные линкеры приведены в подразделе «Линкер».

В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой (в однобуквенном аминокислотном коде): GGGGS («4GS»; SEQ ID NO:593) или мультимеры линкера 4GS, такие как повторы 2, 3, 4 или 5 линкеров 4GS. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой пептидный линкер $(GGGGS)_2$ (SEQ ID NO:594), $(GGGGS)_3$ (SEQ ID NO:595), $(GGGGS)_4$ (SEQ ID NO:600) или $(GGGGS)_5$ (SEQ ID NO:671). В некоторых вариантах осуществления линкер также может включать ряд остатков аланина отдельно или в дополнение к другому пептидному линкеру (такому как линкер 4GS или его мультимер). В некоторых вариантах осуществления линкером (в однобуквенном аминокислотном коде) является GSGGGGS (SEQ ID NO:590) или GGGGSSA (SEQ ID NO:596). В некоторых примерах линкер представляет собой 2xGGGGS, за которыми следуют три аланина (GGGGSGGGGSAAA; SEQ ID NO:721).

В некоторых вариантах осуществления предусмотрен гибридный белок BCMA-Fc, который представляет собой димер, образованный двумя идентичными полипептидами BCMA (например, вариантным полипептидом BCMA), как описано, связанными с Fc-доменом. В некоторых вариантах осуществления идентичные разновидности любого из предоставленных гибридных полипептидов BCMA-Fc, например, гибридный вариант BCMA-Fc, будут димеризованы для создания гомодимера. В некоторых вариантах осуществления димер представляет собой гомодимер, в котором два полипептида BCMA Fc, например, варианты полипептидов BCMA Fc, являются одинаковыми. Для получения гомодимерной молекулы Fc Fc-область является такой, которая способна формировать гомодимер с соответствующей Fc областью путем совместной экспрессии отдельных Fc областей в клетке.

Также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие гибридные белки BCMA-Fc, например, вариантный гибридный белок BCMA-Fc. В некоторых вариантах осуществления для получения гибридного белка Fc молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный белок BCMA-Fc, например, вариантный гибридный белок BCMA-Fc, вставляют в соответствующий вектор экспрессии. Полученный в результате гибридный белок BCMA-Fc, например, вариантный гибридный белок BCMA-Fc, может экспрессироваться в клетках-хозяевах, трансформированных с помощью экспрессии, где сборка между доменами Fc происходит посредством межцепочечных дисульфидных связей, образующихся между фрагментами Fc, с получением димерных,

таких как двухвалентные, гибридных белков BCMA-Fc. Полученные в результате гибридные белки Fc могут быть легко очищены с помощью аффинной хроматографии на колонках с белком A или белком G.

В вариантах осуществления, при продукции и экспрессии из клеток, предлагаемый иммуномодулирующий белок, такой как BCMA-Fc, представляет собой гомодимер, содержащий две идентичные полипептидные цепи. Фиг.15 изображает структуру примерного гибридного белка BCMA-Fc, представленного в настоящей заявке.

III. МУЛЬТИДОМЕННЫЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ БЕЛКИ

В настоящей заявке представлены мультидоменные иммуномодулирующие белки, которые содержат (1) одну или несколько молекул, ингибирующих B-клетки (BIM), которые связываются с лигандом рецептора, стимулирующего B-клетки, и (2) одну или несколько молекул, ингибирующих T-клетки (BIM), которые связываются с рецептором, стимулирующим T-клетки, или лигандом рецептора, стимулирующего T-клетки. Среди представленных мультидоменных иммуномодулирующих белков есть те, в которых BIM антагонизирует, например, снижает или ингибирует активность рецептора, стимулирующего B-клетки, и в которых TIM антагонизирует, например, снижает или ингибирует активность рецептора, стимулирующего T-клетки. Таким образом, предлагаемые иммуномодулирующие белки объединяют ингибиторы B- и T-клеток в единую молекулу. В некоторых вариантах осуществления BIM и TIM связаны прямо или опосредованно. Предлагаемый иммуномодулирующий белок может быть гибридным белком, в котором мультидоменные BIM и TIM фрагменты дополнительно связаны с другой частью, такой как домен мультимеризации или молекула, увеличивающая время полужизни. В конкретных вариантах осуществления мультидоменный иммуномодулирующий белок представляет собой гибридный белок BIM/TIM Fc. Предоставленные молекулы могут быть использованы для модуляции путей B- и T-клеток, чтобы таким образом лечить аутоиммунные заболевания, в частности аутоиммунные заболевания, этиология которых связана с ответами B- и T-клеток.

В некоторых вариантах осуществления рецептор, стимулирующий B-клетки, представляет собой рецептор, экспрессируемый на B-клетках, который стимулирует B-клеточные реакции, такие как созревание и дифференцировка B-клеток. Рецептором, стимулирующим B-клетки, может быть BAFF-R, BCMA и/или TACI. В некоторых вариантах осуществления предоставленные мультидоменные иммуномодулирующие белки являются антагонистами активности одного или нескольких из BAFF-R, BCMA или TACI. В некоторых вариантах осуществления BIM связывается с лигандом BAFF-R, BCMA или TACI. Лигандом может быть BAFF или APRIL, которые являются

гомотримерными молекулами, общими для членов суперсемейства TNF. BAFF и APRIL оба в основном экспрессируются миелоидными клетками и, как сообщалось, действуют как факторы костимуляции В-клеток. BAFF и APRIL имеют общие два рецептора TACI и BCMA; BAFF также способен связывать и стимулировать BAFF-R. В некоторых случаях лиганд может быть гетеротримером BAFF и APRIL. Например, гетеротримерные комплексы APRIL и BAFF обнаруживаются в сыворотке крови, особенно у субъектов с аутоиммунными заболеваниями, такими как ревматические заболевания, обусловленные системным иммунитетом.

В некоторых вариантах осуществления рецепторы, стимулирующие Т-клетку, содержат мотив активации иммунорецептора на основе тирозина (ITAM) или взаимодействуют с адаптерным белком, участвующим в путях передачи сигнала в Т-клетках, для передачи сигналов активации. Рецептор, стимулирующий Т-клетки, может быть костимулирующим рецептором, экспрессируемым на Т-клетках, таких как CD28 или ICOS. В конкретных вариантах осуществления предоставленные мультидоменные иммуномодулирующие белки являются антагонистами активности рецептора, стимулирующего Т-клетки, такого как рецептор костимуляции Т-клеток, например, CD28 или ICOS. TIM может связываться с костимулирующим рецептором или с лигандом костимулирующего рецептора. В некоторых вариантах осуществления предоставленные мультидоменные иммуномодулирующие белки могут быть получены таким образом, что TIM связывается непосредственно с рецептором, стимулирующим Т-клетки. Например, TIM может быть молекулой, связывающей CD28 или ICOS. В других вариантах осуществления предоставленные мультидоменные иммуномодулирующие белки могут быть получены таким образом, что TIM связывает лиганд рецептора, стимулирующего Т-клетки, и таким образом, косвенно антагонизирует или ингибирует рецептор, стимулирующий Т-клетки. Например, TIM связывается с CD80 или CD86, которые являются лигандами CD28.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько TIM и/или BIM независимо включают антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела. В некоторых аспектах TIM и/или BIM могут быть человеческим антителом и/или антителом, которое связывает человеческий белок.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из TIM или BIM не является антителом или антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из TIM или BIM представляет собой или содержит внеклеточный домен молекулы клеточной поверхности, экспрессируемой на иммунных клетках. Например, некоторые члены суперсемейства иммуноглобулинов, не являющихся

антителами (IgSF), экспрессируются на Т-клетках или регулируют активность Т-клеток. К ним относятся, например, определенные костимулирующие молекулы Т-клеток или их лиганды. В некоторых случаях TIM включает домен (IgSF) (IgD) члена IgSF (например, IgD дикого типа), или вариант IgD (далее называемый «vIgD»), в котором содержится одна или несколько аминокислотных модификаций (например, замен) в IgD. Аналогичным образом, некоторые представители суперсемейства рецепторов TNF экспрессируются на В-клетках или регулируют активность В-клеток. К ним относятся, например, определенные рецепторы, стимулирующие В-клетки, такие как TACI или BCMA. В некоторых случаях BIM включает домен рецептора TNF (TD) члена суперсемейства TNFR (например, TD дикого типа) или вариант TD (далее называемый «vTD»), в котором содержится одна или несколько аминокислотных модификаций (например, замен) в TD.

В некоторых вариантах осуществления BIM может связываться с лигандом рецептора, стимулирующего В-клетки, по меньшей мере, с определенной активностью связывания, такой как аффинность связывания, измеряемая любым из ряда известных способов. В некоторых вариантах осуществления TIM может связываться с рецептором, стимулирующим Т-клетки, или лигандом рецептора, стимулирующего Т-клетки, по меньшей мере, с определенной активностью связывания, такой как аффинность связывания, измеряемая любым из ряда известных способов. В некоторых вариантах осуществления аффинность представлена равновесной константой диссоциации (K_D) или представлена EC_{50}. Известно множество анализов для оценки связывающей активности, включая аффинность связывания, и/или определения того, специфически ли связывающая молекула (например, TIM или BIM) связывается с конкретным партнером по связыванию. В некоторых вариантах осуществления прибор BIAcore® может использоваться для определения кинетики связывания и констант комплекса между двумя белками с использованием анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (см., например, Scatchard et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 51:660, 1949; Wilson, Science 295:2103, 2002; Wolff et al., Cancer Res. 53:2560, 1993; и патенты США № 5,283,173; 5,468,614 или эквиваленты). В других вариантах осуществления может быть использована биослойная интерферометрия (BLI) с использованием системы ForteBio Octet, например, с датчиком, покрытым стрептавидином, и биотинилированным доменом рекомбинантного белка. Другие подходящие анализы для измерения связывания одного белка с другим включают, например, иммуноанализы, такие как иммуноферментный анализ (ELISA) и радиоиммунологический анализ (РИА), или определение связывания путем мониторинга изменения спектроскопических или оптических свойств белков посредством

флуоресценции, поглощения УФ-излучения, кругового дихроизма или ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Другие примеры анализов включают, без ограничения указанными, вестерн-блоттинг, ELISA, аналитическое ультрацентрифугирование, спектроскопию, проточную цитометрию, секвенирование и другие методы для детекции экспрессируемых нуклеиновых кислот или связывания белков.

В некоторых вариантах осуществления BIM и TIM независимо проявляют аффинность к партнеру по связыванию с K_D (т.е. равновесной константой диссоциации конкретного связывающего взаимодействия в единицах М; равной отношению скорости диссоциации [k_{off} или k_d] к скорости ассоциации [k_{on} или k_a] для этой реакции ассоциации, предполагая бимолекулярное взаимодействие), равной или меньшей, чем 10^{-5} М. Например, равновесная константа диссоциации K_D находится в диапазоне от 10^{-6} М до 10^{-12} М, например, от 10^{-7} М до 10^{-11} М, от 10^{-8} М до 10^{-10} М или от 10^{-9} М до 10^{-10} М. Константу ассоциации (константу скорости ассоциации; k_{on} или k_a; единицы 1/Мс) и константу диссоциации (константу скорости диссоциации; k_{off} или k_d; единицы 1/с) можно определить с использованием любого из методов анализа, известных в данной области техники, например, поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

В некоторых вариантах осуществления BIM проявляет аффинность связывания с лигандом рецептора, стимулирующего В-клетки, которая составляет точно или примерно от 0,001 нМ до 1000 нМ, например, точно или примерно от 0,01 нМ до 500 нМ, точно или примерно от 0,01 нМ до 400 нМ, точно или примерно от 0,01 нМ до 100 нМ, точно или примерно от 0,01 нМ до 50 нМ, точно или примерно от 0,01 нМ до 10 нМ, точно или примерно от 0,01 нМ до 1 нМ, точно или примерно от 0,01 нМ до 0,1 нМ, точно или примерно от 0,1 нМ до 500 нМ, точно или примерно от 0,1 нМ до 400 нМ, точно или примерно от 0,1 нМ до 100 нМ, точно или примерно от 0,1 нМ до 50 нМ, точно или примерно от 0,1 нМ до 10 нМ, точно или примерно от 0,1 нМ до 1 нМ, точно или примерно от 0,5 нМ до 200 нМ, точно или примерно от 1 нМ до 500 нМ, точно или примерно от 1 нМ до 100 нМ, точно или примерно от 1 нМ до 50 нМ, точно или примерно от 1 нМ до 10 нМ, точно или примерно от 2 нМ до 50 нМ, точно или примерно от 10 нМ до 500 нМ, точно или примерно от 10 нМ до 100 нМ, точно или примерно от 10 нМ до 50 нМ, точно или примерно от 50 нМ до 500 нМ, точно или примерно от 50 нМ до 100 нМ или точно или примерно от 100 Нм до 500 нМ. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания BIM с ингибирующим рецептором составляет точно, или менее, или примерно 400 нМ, 300 нМ, 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 40 нМ, 30 нМ, 25 нМ, 20 нМ, 19 нМ, 18 нМ, 17 нМ, 16 нМ, 15 нМ, 14 нМ, 13 нМ, 12 нМ, 11 нМ, 10 нМ, 9 нМ, 8 нМ, 7 нМ, 6 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ или 1 нМ или менее.

В некоторых вариантах осуществления TIM проявляет аффинность связывания с рецептором, стимулирующим Т-клетки, или лигандом рецептора, стимулирующего Т-клетки, которая составляет точно или примерно от 0,001 нМ до 1000 нМ, например, точно или примерно от 0,01 нМ до 500 нМ, точно или примерно от 0,01 нМ до 400 нМ, точно или примерно от 0,01 нМ до 100 нМ, точно или примерно от 0,01 нМ до 50 нМ, точно или примерно от 0,01 нМ до 10 нМ, точно или примерно от 0,01 нМ до 1 нМ, точно или примерно от 0,01 нМ до 0,1 нМ, точно или примерно от 0,1 нМ до 500 нМ, точно или примерно от 0,1 нМ до 400 нМ, точно или примерно от 0,1 нМ до 100 нМ, точно или примерно от 0,1 нМ до 50 нМ, точно или примерно от 0,1 нМ до 10 нМ, точно или примерно от 0,1 нМ до 1 нМ, точно или примерно от 0,5 нМ до 200 нМ, точно или примерно от 1 нМ до 500 нМ, точно или примерно от 1 нМ до 100 нМ, точно или примерно от 1 нМ до 50 нМ, точно или примерно от 1 нМ до 10 нМ, точно или примерно от 2 нМ до 50 нМ, точно или примерно от 10 нМ до 500 нМ, точно или примерно от 10 нМ до 100 нМ, точно или примерно от 10 нМ до 50 нМ, точно или примерно от 50 нМ до 500 нМ, точно или примерно от 50 нМ до 100 нМ или точно или примерно от 100 нМ до 500 нМ. В определенных вариантах осуществления аффинность связывания TIM со стимулирующим рецептором или лигандом стимулирующего рецептора Т-клеток составляет точно, или меньше, или примерно 400 нМ, 300 нМ, 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 40 нМ, 30 нМ, 25 нМ, 20 нМ, 19 нМ, 18 нМ, 17 нМ, 16 нМ, 15 нМ, 14 нМ, 13 нМ, 12 нМ, 11 нМ, 10 нМ, 9 нМ, 8 нМ, 7 нМ, 6 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ или 1 нМ или менее.

В некоторых вариантах осуществления TIM или мультидоменный иммуномодулирующий белок, содержащий TIM, не является агонистом рецептора, стимулирующего Т-клетки (например, костимулирующего). В некоторых вариантах осуществления TIM или мультидоменный иммунодулирующий белок, содержащий TIM, связывается с Т-клеточным костимулирующим рецептором, например, CD28 или ICOS, но проявляет относительно низкую аффинность к Т-клеточному костимулирующему рецептору. В некоторых вариантах осуществления TIM имеет аффинность связывания с Т-клеточным костимулирующим рецептором, превышающую 1×10^{-9} М, например, составляющую точно или примерно 1×10^{-7} М и точно или примерно 1×10^{-9} М. В некоторых вариантах осуществления TIM имеет аффинность связывания с рецептором костимуляции Т-клеток, составляющую точно или примерно 1×10^{-7} М, точно или примерно $2,5\times10^{-7}$ М, точно или примерно 5×10^{-7} М, точно или примерно $7,5\times10^{-7}$ М, точно или примерно 1×10^{-8} М, точно или примерно $2,5\times10^{-8}$ М, точно или примерно 5×10^{-8} М, точно или примерно $7,5\times10^{-8}$ М, точно или примерно 1×10^{-9} М, или любое значение между любым из вышеперечисленных.

В некоторых вариантах осуществления TIM предоставленных мультидоменных иммуномодулирующих белков непосредственно не связывается с Т-клеточным костимулирующим рецептором. В некоторых вариантах осуществления TIM предоставленных мультидоменных иммуномодулирующих белков связывается с лигандом костимулирующего рецептора Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления предоставленные мультидоменные иммуномодулирующие белки могут включать BIM и TIM в различных конфигурациях или форматах, включая форматы с одним или несколькими дополнительными фрагментами. В некоторых вариантах осуществления предоставленные иммуномодулирующие белки включают полипептиды, в которых одна или несколько BIM являются N-концевыми по отношению к TIM. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько BIM являются С-концевыми по отношению к TIM. Одна или несколько BIM и одна или несколько TIM могут быть связаны прямо или опосредованно, через линкер. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующие белки могут быть отформатированы в виде мультимерных молекул посредством гибридизации с доменом мультимеризации, таким как Fc-белок. В некоторых вариантах осуществления мультидоменные иммуномодулирующие белки могут быть отформатированы в виде мультимерных молекул, например, димерных, тримерных, тетрамерных или пентамерных молекул. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующие белки имеют формат мономерных молекул, содержащих одиночные полипептидные гибриды одной или нескольких BIM и одной или нескольких TIM. Фиг.16 показывает примерные форматы и конфигурации, все из которых могут быть охвачены предоставленным мультидоменным иммуномодулирующим белком.

В подразделах ниже описаны примерные BIM и TIM компоненты предоставленного мультидоменного иммуномодулирующего белка, а также примерные форматы для таких иммуномодулирующих белков.

А. МОЛЕКУЛА, ИНГИБИРУЮЩАЯ В-КЛЕТКИ (BIM)

В некоторых вариантах осуществления предлагаемый иммуномодулирующий белок содержит BIM, которая связывается с одним или несколькими лигандами рецептора, стимулирующего В-клетки. В некоторых вариантах осуществления рецептор, стимулирующий В-клетки, является членом TNFRSF. В некоторых вариантах осуществления одним или несколькими рецепторами, стимулирующими В-клетки, являются TACI и BCMA. В некоторых вариантах осуществления лигандом рецептора, стимулирующего В-клетки, является BAFF или APRIL. В некоторых вариантах осуществления BIM связывается с BAFF, APRIL и/или гетеротримером BAFF/APRIL. В

некоторых вариантах осуществления BIM может связываться с BAFF, APRIL и гетеротримером BAFF/APRIL.

В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с лигандом рецептора, стимулирующего В-клетки. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который связывает BAFF и/или APRIL, такой как человеческий BAFF и/или человеческий APRIL.

В некоторых вариантах осуществления BIM является или содержит партнера по связыванию лиганда рецептора, стимулирующего В-клетки. В некоторых вариантах осуществления мультидоменный иммуномодулирующий белок, представленный в настоящей заявке, является растворимым белком и/или не содержит части, которая включает трансмембранный домен. Специалистам в данной области техники известно, что белки клеточной поверхности, включая белки TNFRSF, такие как стимулирующие рецепторы В-клеток, например, BCMA и TACI, как правило, имеют внутриклеточный домен, трансмембранный домен и внеклеточный домен (ECD), и что растворимая форма таких белков может быть получена с использованием внеклеточного домена или его иммунологически активной подпоследовательности. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления BIM не имеет трансмембранного домена или части трансмембранного домена рецептора, стимулирующего В-клетки, например, BCMA или TACI. В некоторых вариантах осуществления у BIM отсутствует внутриклеточный (цитоплазматический) домен или часть внутриклеточного домена рецептора, стимулирующего В-клетки, например, BCMA или TACI. В некоторых вариантах осуществления BIM содержит только домен ECD или его часть, содержащую TD, такую как CRD, или его специфические связывающие фрагменты.

Например, в некоторых аспектах BIM представляет собой или содержит ECD рецептора, стимулирующего В-клетки, или его часть или фрагмент специфического связывания, содержащие по меньшей мере один TD (например, по меньшей мере один CRD), который связывается с лигандом рецептора, стимулирующего В-клетки. Например, BIM может содержать ECD TACI или BCMA, или часть или фрагмент специфического связывания TACI или BCMA, содержащий по меньшей мере один TD (например, по меньшей мере один CRD), который связывается с APRIL, BAFF и/или гетеротримером APRIL/BAFF. В некоторых вариантах осуществления BIM состоит по существу или состоит из ECD рецептора, стимулирующего В-клетки, или части или фрагмента специфического связывания, содержащего по меньшей мере один TD (например, по меньшей мере один CRD), например, состоит по существу или состоит из ECD TACI или

BCMA или части или фрагмента специфического связывания ECD TACI или BCMA, содержащего по меньшей мере один TD (например, по меньшей мере один CRD). В некоторых вариантах осуществления BIM имеет длину меньше, чем полноразмерная последовательность ECD рецептора, стимулирующего B-клетки. В некоторых вариантах BIM представляет собой или содержит только один CRD или фрагмент специфического связывания CRD. В некоторых вариантах осуществления BIM состоит по существу или состоит из CRD рецептора, стимулирующего B-клетки, например, состоит по существу или состоит из одного CRD из TACI или BCMA. В некоторых вариантах осуществления последовательность BIM, содержащая ECD, или ее связывающая часть или фрагмент, содержащий TD (например, по меньшей мере один CRD), является последовательностью млекопитающих, которая включает, без ограничения указанными, человека, мышь, яванскую макаку или крысу. В некоторых вариантах осуществления последовательность BIM является человеческой и/или связывает человеческий белок.

В некоторых аспектах BIM представляет собой или включает vTD, который является доменом с модифицированной аффинностью, который проявляет повышенную активность связывания, такую как повышенная аффинность связывания, для лиганда рецептора, стимулирующего B-клетки, по сравнению со связывающей активностью немодифицированного или дикого типа TD для той же молекулы. В некотором варианте осуществления BIM содержит vTD с одной или несколькими аминокислотными заменами по сравнению с TD члена TNFRSF, например, BCMA или TACI, в которых одна или несколько аминокислотных замен придают или приводят к повышенной аффинности связывания с когнатным лигандом рецептора, стимулирующего B-клетки.

В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой или содержит vTD, который включает одну или несколько модификаций аминокислот, таких как одна или несколько замен (альтернативно, «мутаций» или «замен»), делеций или добавлений, относительно дикого типа или немодифицированного TD партнера по связыванию лиганда рецептора, стимулирующего B-клетки. В некоторых аспектах vTD содержит до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 модификаций аминокислот, таких как аминокислотные замены, делеции или добавления в TD-домене партнера по связыванию TNFRSF рецептора, стимулирующего B-клетки. Модификации (например, замены) могут быть в CRD. В некоторых вариантах осуществления vTD имеет до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, или 20 аминокислотных модификаций (например, замен) в CRD или его фрагменте специфического связывания. В некоторых вариантах осуществления vTD имеет по меньшей мере примерно 85%, 86%, 86%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичности

последовательности с диким типом или немодифицированным TD или его фрагментом специфического связывания.

Неограничивающие примеры BIM в предоставленных мультидоменных иммуномодулирующих белках описаны в следующих подразделах. Любая из описанных в настоящей заявке BIM может быть объединена с TIM, как описано в Разделе III.B.

1. *TACI*

В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой или содержит ECD TACI дикого типа или его часть или фрагмент специфического связывания, содержащий по меньшей мере один TD (например, по меньшей мере один CRD), который связывается с APRIL, BAFF и/или гетеротримером APRIL/BAFF. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой или содержит вариантный ECD TACI или его часть или фрагмент специфического связывания, содержащие по меньшей мере один TD (например, по меньшей мере один CRD), который связывается с APRIL, BAFF и/или гетеротримером APRIL/BAFF. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой полипептид TACI или его вариант с любой из последовательностей, изложенных в настоящей заявке.

TACI является членом семейства рецепторов фактора некроза опухоли, характеризующимся наличием внеклеточного домена (ECD), содержащего домены с богатыми цистеином псевдовторами (CRD). TACI является мембраносвязанным рецептором, который имеет внеклеточный домен, содержащий два богатых цистеином псевдовтора (CRD1 и CRD2), трансмембранный домен и цитоплазматический домен, который взаимодействует с CAML (модулятором кальция и лигандом циклофилина), интегральным мембранным белком, расположенным во внутриклеточных везикулах, который является коиндуктором активации NF-AT при сверхэкспрессии в клетках Jurkat. TACI ассоциирован с B-клетками и субпопуляцией T-клеток. Рецептор TACI связывает два члена семейства лигандов фактора некроза опухоли (TNF). Один лиганд обозначен как BAFF (фактор активации B-клеток семейства TNF), а также иначе обозначен как ZTNF4, «нейтрокин-α», «BLyS», «TALL-1» и «THANK» (Yu et al., международная публикация № WO98/18921 (1998), Moore et al., Science 285:269 (1999); Mukhopadhyay et al., J. Biol. Chem. 274:15978 (1999); Schneider et al., J. Exp. Med. 189:1747 (1999); Shu et al., J. Leukoc. Biol. 65:680 (1999)). Другой лиганд был обозначен как APRIL, а также иначе обозначен как «ZTNF2» и «лиганд смерти TNRF-1» (Hahne et al., J. Exp. Med. 188:1185 (1998); Kelly et al., Cancer Res. 60:1021 (2000)). Оба лиганда также связываются рецептором созревания B-клеток (BCMA) (Gross et al., Nature 404:995 (2000)). Связывание рецептора TACI с его лигандами BAFF или APRIL стимулирует ответы B-клеток, включая T-клеточно-

независимые ответы антител В-клеток, переключение изотипа и гомеостаз В-клеток.

Аминокислотная последовательность полноразмерного TACI изложена в SEQ ID NO:666. Белок относится к мембранным белкам III типа и не содержит сигнального пептида; после экспрессии в эукариотических клетках N-концевой метионин удаляется. В некоторых вариантах осуществления зрелый белок TACI не содержит N-концевой метионин, как указано в SEQ ID NO:666. Внеклеточный домен TACI (аминокислотные остатки 1-166 из SEQ ID NO:666; ECD, указанный в SEQ ID NO:709) содержит два богатых цистеином домена (CRDS, далее также называемые доменом рецептора семейства некроза опухоли или TD), каждый из которых проявляет аффинность связывания с BAFF и APRIL. Первый домен, богатый цистеином (CRD1), содержит аминокислотные остатки 34-66 последовательности, указанной в SEQ ID NO:709. Второй домен, богатый цистеином (CRD2), соответствует аминокислотам 71-104 последовательности, указанной в SEQ ID NO:709. TACI также содержит область выступа примерно из 60 аминокислот, следующую за вторым цистеиновым повтором во внеклеточном домене, что соответствует аминокислотным остаткам 105-165 последовательности, указанной в SEQ ID NO:709.

В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид TACI, который содержит одну или несколько аминокислотных модификаций, таких как одна или несколько замен (альтернативно, «мутаций» или «замен»), делеций или добавлений во внеклеточном домене эталонного полипептида TACI, такого как полипептид дикого типа или немодифицированный полипептид TACI, содержащий CRD (далее также называемые TD). Таким образом, предлагаемая BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, представляет собой или содержит вариантный TD («vTD»), в котором одна или несколько аминокислотных модификаций (например, замен) находятся в CRD. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных модификаций, таких как одна или несколько замен (альтернативно, «мутаций» или «замен»), делеций или добавлений, находятся в области CRD1. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько модификаций аминокислот, таких как одна или несколько замен (альтернативно, «мутации» или «замены»), делеции или добавления, находятся в области CRD2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных модификаций, таких как одна или несколько замен (альтернативно, «мутаций» или «замен»), делеций или добавлений, находятся в аминокислотах как в областях CRD1, так и CRD2.

В некоторых вариантах осуществления эталонная (например, немодифицированная) последовательность TACI представляет собой последовательность TACI дикого типа или ее часть, которая содержит один или оба CRD. В некоторых

вариантах осуществления эталонный (например, немодифицированный) TACI представляет собой или включает внеклеточный домен (ECD) TACI или его часть, содержащую один или оба домена CRD. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен эталонного (например, немодифицированного) полипептида TACI содержит CRD1 и CRD2. Однако вариантный полипептид TACI необязательно должен содержать как CRD1, так и CRD2. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI содержит или состоит по существу из CRD1 или его фрагмента специфического связывания. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI содержит или состоит по существу из CRD2 или его фрагментов специфического связывания. В некоторых вариантах осуществления вариантный TACI является растворимым полипептидом и не имеет трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI дополнительно содержит трансмембранный домен и, в некоторых случаях, также цитоплазматический домен.

В некоторых вариантах осуществления эталонная (например, немодифицированная) последовательность TACI представляет собой последовательность TACI млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления эталонной (например, немодифицированной) последовательностью TACI может быть последовательность TACI млекопитающего, которая включает, без ограничения указанными, человека, мышь, яванскую макаку или крысу. В некоторых вариантах осуществления эталонной (например, неизмененной) последовательностью TACI является человеческая. Внеклеточный домен эталонной последовательности TACI человека указан в SEQ ID NO:709.

В некоторых вариантах осуществления эталонная (например, немодифицированная) последовательность TACI содержит (i) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:709, или ее последовательность, в которой отсутствует N-концевой метионин, (ii) аминокислотную последовательность, которая содержит по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO:709 и которая связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером APRIL/BAFF, или (iii) представляет собой фрагмент или часть (i) или (ii), содержащую CRD1 и/или CRD2, где часть связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером APRIL/BAFF. В некоторых вариантах осуществления в эталонной (например, немодифицированной) последовательности TACI отсутствует N-концевой метионин, как указано в SEQ ID NO:709.

Внеклеточный домен TACI (ECD): SEQ ID NO:709

MSGLGRSRRGGRSRVDQEERFPQGLWTGVAMRSCPEEQYWDPLLGTCMSCKTI

CNHQSQRTCAAFCRSLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPV
NLPPELRRQRSGEVENNSDNSGRYQGLEHRGSEASPALPGLKLSADQVALVYST

В некоторых вариантах осуществления эталонная (например, немодифицированная) последовательность TACI представляет собой последовательность внеклеточного домена TACI, которая представляет собой часть ECD, содержащую N-концевую делецию относительно последовательности аминокислот, указанной в SEQ ID NO:709. В некоторых вариантах осуществления N-концевая делеция представляет собой делецию N-концевых аминокислотных остатков 1-28, соответствующих остаткам, указанным в SEQ ID NO:709. В некоторых вариантах осуществления N-концевая делеция представляет собой делецию N-концевых аминокислотных остатков 1-29, соответствующих остаткам, указанным в SEQ ID NO:709. В некоторых вариантах осуществления N-концевая делеция представляет собой делецию N-концевых аминокислотных остатков 1-30, соответствующих остаткам, указанным в SEQ ID NO:709. В некоторых вариантах осуществления N-концевая делеция представляет собой делецию N-концевых аминокислотных остатков 1-31, соответствующих остаткам, указанным в SEQ ID NO:709. В некоторых вариантах осуществления N-концевая делеция представляет собой делецию N-концевых аминокислотных остатков 1-32, соответствующих остаткам, указанным в SEQ ID NO:709. В некоторых вариантах осуществления N-концевая делеция представляет собой делецию N-концевых аминокислотных остатков 1-33, соответствующих остаткам, указанным в SEQ ID NO:709.

В некоторых из представленных вариантов осуществления эталонная (например, немодифицированная) последовательность TACI представляет собой участок ECD, который содержит делецию одного или нескольких остатков стволовой части внеклеточного домена TACI. В некоторых вариантах осуществления эталонная (например, немодифицированная) последовательность TACI представляет собой участок ECD, в котором отсутствуют один или несколько смежных С-концевых аминокислотных остатков, начиная с остатка 105 и до или включая аминокислотный остаток 166, соответствующий остаткам последовательности ECD, изложенным в SEQ ID NO:709. В некоторых вариантах осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61 или 62 остатка из последовательности ECD удаляют.

В некоторых вариантах осуществления эталонная (например, немодифицированная) последовательность TACI содержит участок ECD, имеющий непрерывную последовательность аминокислот, которая включает CRD1 и/или CRD2

(например, CRD1 и CRD2 или только CRD2) и только сегмент или часть стволовой последовательности. Подходящие сегменты ствола включают одну или несколько аминокислот из аминокислотных остатков с 105 по 154 из SEQ ID NO:709. Например, сегмент ствола может состоять из следующего со ссылкой на SEQ ID NO:709: аминокислотный остаток 105, аминокислотные остатки от 105 до 106, аминокислотные остатки от 105 до 107, аминокислотные остатки от 105 до 108, аминокислотные остатки от 105 до 109, аминокислотные остатки от 105 до 110, аминокислотные остатки от 105 до 111, аминокислотные остатки от 105 до 112, аминокислотные остатки от 105 до 113, аминокислотные остатки от 105 до 114, аминокислотные остатки от 105 до 115, аминокислотные остатки от 105 до 116, аминокислотные остатки от 105 до 117, аминокислотные остатки от 105 до 118, аминокислотные остатки 105 до 119, аминокислотные остатки от 105 до 120, аминокислотные остатки от 105 до 121, аминокислотные остатки от 105 до 122, аминокислотные остатки от 105 до 123, аминокислотные остатки от 105 до 124, аминокислотные остатки от 105 до 125, аминокислотные остатки от 105 до 126, аминокислотные остатки от 105 до 127, аминокислотные остатки от 105 до 128, аминокислотные остатки 105 до 129, аминокислотные остатки от 105 до 130, аминокислотные остатки от 105 до 131, аминокислотные остатки от 105 до 132, аминокислотные остатки от 105 до 133, аминокислотные остатки от 105 до 134, аминокислотные остатки от 105 до 135, аминокислотные остатки от 105 до 136, аминокислотные остатки от 105 до 137, аминокислотные остатки от 105 до 137, аминокислотные остатки от 105 до 138, аминокислотные остатки от 105 до 139, аминокислотные остатки от 105 до 140, аминокислотные остатки от 105 до 141, аминокислотные остатки от 105 до 142, аминокислотные остатки от 105 до 143, аминокислотные остатки от 105 до 144, аминокислотные остатки от 105 до 145, аминокислотные остатки от 105 до 146, аминокислотные остатки 105 до 147, аминокислотные остатки от 105 до 148, аминокислотные остатки от 105 до 149, аминокислотные остатки от 105 до 150, аминокислотные остатки от 105 до 151, аминокислотные остатки от 105 до 152, аминокислотные остатки от 105 до 153, и аминокислотные остатки от 105 до 154.

В некоторых вариантах осуществления эталонная (например, немодифицированная) последовательность TACI отсутствует или мутирована в одном или нескольких потенциальных сайтах расщепления фурина. В некоторых случаях эталонная (например, немодифицированная) последовательность TACI представляет собой ECD или ту часть, в которой остаток аргинина в положении 119 мутирован, например, R119G. В некоторых случаях эталонная (например, немодифицированная) последовательность TACI

представляет собой ECD или ту часть, в которой мутирован остаток глутамина в положении 121, например, Q121P. В некоторых случаях эталонная (например, неизмененная) последовательность TACI представляет собой ECD или часть, в которой остаток аргинина в положении 122 мутирован, например, R122Q.

В некоторых вариантах осуществления эталонная последовательность TACI представляет собой последовательность ECD TACI, как указано в международной публикации PCT № WO2000/067034, WO2002/094852 или WO2008/154814.

В некоторых вариантах осуществления эталонная последовательность TACI представляет собой последовательность ECD TACI, которая содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:719.

ECD TACI (CRD1/CRD2): SEQ ID NO:719

SRVDQEER FPQGLWTGVA MRSCPEEQYW DPLLGTCMSCKTICNHQSQR TCAAFCRSLS CRKEQGKFYD HLLRDCISCA SICGQHPKQCAYFCENKLRS PVNLPPEL

В некоторых вариантах осуществления эталонная последовательность TACI представляет собой последовательность ECD TACI, которая содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:718.

ECD TACI (CRD1/CRD2): SEQ ID NO:718

AMRSCPEEQYWDPLLGTCMSCKTICNHQSQRTCAAFCRSLSCRKEQGKFYDHLL RDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRS

В некоторых вариантах осуществления эталонная последовательность TACI представляет собой последовательность ECD TACI, которая содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:516 (кодируется последовательностью нуклеотидов, указанной в SEQ ID NO:551).

ECD TACI (CRD1/CRD2): SEQ ID NO:516

VAMRSCPEEQYWDPLLGTCMSCKTICNHQSQRTCAAFCRSLSCRKEQGKFYDHL LRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRS

В некоторых вариантах осуществления эталонная последовательность TACI представляет собой область внеклеточного домена TACI, которая состоит по существу только из последовательности CRD2 и в которой частично или полностью удалена последовательность CRD1 и по существу вся стволовая область. Хотя предыдущие исследования показали, что остатки в стволовой области могут содержать сайт расщепления протеазой, считалось, что по меньшей мере CRD1 и CRD2 необходимы для достаточной экспрессии и/или связывающей активности TACI для его когнатных лигандов. Например, международная публикация PCT №. WO2002/094852 демонстрирует, что молекула TACI, содержащая CRD1 и CRD2, но в которой была удалена вся

аминоконцевая область и частичная последовательность стволовой области, проявляла пониженную деградацию белка при экспрессии. Другие исследования показали, что по меньшей мере часть N-концевой области перед CRD1 была необходима для достаточной связывающей активности TACI для его когнатных лигандов, см., например, международную публикацию №. WO2008/154814, где было определено, что остатки 13-118 или 13-108 внеклеточной области TACI необходимы для биологической активности при минимизации деградации TACI во время экспрессии. Неожиданно здесь обнаружено (например, Пример 8), что внеклеточная область TACI, которая состоит по существу только из CRD2 с небольшой частью стволовой области, проявляет существенно улучшенную активность по связыванию когнатных молекул по сравнению с более длинной молекулой TACI, содержащей как CRD1, так и CRD2.

В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой полипептид TACI, который представляет собой часть области внеклеточного домена TACI (ECD), которая содержит CRD2, с делецией N-концевой области и CRD1 и делецией одного или нескольких остатков стволовой части внеклеточного домена TACI, например, относительно последовательности аминокислот, указанной в SEQ ID NO:709. В некоторых вариантах осуществления часть внеклеточного домена TACI, которая содержит CRD2, включает аминокислотные остатки 71-104, соответствующие остаткам, указанным в SEQ ID NO:709. В представленных вариантах осуществления BIM иммуномодулирующего белка представляет собой полипептид TACI, который содержит делецию N-концевых аминокислотных остатков 1-66, соответствующих остаткам, указанным в SEQ ID NO:709. В представленных вариантах осуществления BIM иммуномодулирующего белка представляет собой полипептид TACI, который содержит делецию N-концевых аминокислотных остатков 1-67, соответствующих остаткам, указанным в SEQ ID NO:709. В представленных вариантах осуществления BIM иммуномодулирующего белка представляет собой полипептид TACI, который содержит делецию N-концевых аминокислотных остатков 1-68, соответствующих остаткам, указанным в SEQ ID NO:709. В представленных вариантах осуществления BIM иммуномодулирующего белка представляет собой полипептид TACI, который содержит делецию N-концевых аминокислотных остатков 1-69, соответствующих остаткам, указанным в SEQ ID NO:709. В представленных вариантах осуществления BIM иммуномодулирующего белка представляет собой полипептид TACI, который содержит делецию N-концевых аминокислотных остатков 1-70, соответствующих остаткам, указанным в SEQ ID NO:709. В некоторых из таких вариантов осуществления BIM иммуномодулирующего белка представляет собой полипептид TACI, в котором

отсутствуют один или несколько смежных С-концевых аминокислотных остатков, начиная с остатка 105 и до или включая аминокислотный остаток 166, что соответствует остаткам последовательности ECD, изложенной в SEQ ID NO:709. В некоторых вариантах осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61 или 62 остатка из последовательности ECD удаляют.

В некоторых вариантах осуществления BIM иммуномодулирующего белка, представленного в настоящей заявке, представляет собой полипептид TACI с последовательностью, которая содержит часть ECD, имеющую непрерывную последовательность аминокислот ECD TACI, которая включает CRD2 (например, остатки 71-104 со ссылкой на SEQ ID NO:709), но с удалением N-концевой области и CRD1 и удалением одного или нескольких остатков стволовой части внеклеточного домена TACI, например, относительно последовательности аминокислот, указанной в SEQ ID NO:709. Например, часть ECD TACI может состоять из следующего со ссылкой на аминокислотные остатки, указанные в SEQ ID NO:709: аминокислотные остатки с 67 по 118, аминокислотные остатки с 67 по 117, аминокислотные остатки с 67 по 116, аминокислотные остатки с 67 по 115, аминокислотные остатки с 67 по 114, аминокислотные остатки с 67 по 113, аминокислотные остатки с 67 по 112, аминокислотные остатки с 67 по 111, аминокислотные остатки с 67 по 110, аминокислотные остатки с 67 по 109, аминокислотные остатки с 67 по 108, аминокислотные остатки с 67 по 107, аминокислотные остатки с 67 по 106, аминокислотные остатки с 67 по 105 или аминокислотные остатки с 67 по 104. В некоторых примерах часть ECD TACI может состоять из следующего со ссылкой на остатки, указанные в SEQ ID NO:709: аминокислотные остатки с 68 по 118, аминокислотные остатки с 68 по 117, аминокислотные остатки с 68 по 116, аминокислотные остатки с 68 по 115, аминокислотные остатки с 68 по 114, аминокислотные остатки с 68 по 113, аминокислотные остатки с 68 по 112, аминокислотные остатки с 68 по 111, аминокислотные остатки с 68 по 110, аминокислотные остатки с 68 по 109, аминокислотные остатки с 68 по 108, аминокислотные остатки с 68 по 107, аминокислотные остатки с 68 по 106, аминокислотные остатки с 68 по 105, или аминокислотные остатки с 68 по 104. В некоторых примерах часть ECD TACI может состоять из следующего со ссылкой на остатки, указанные в SEQ ID NO:709: аминокислотные остатки с 69 по 118, аминокислотные остатки с 69 по 117, аминокислотные остатки с 69 по 116, аминокислотные остатки с 69 по 115, аминокислотные остатки с 69 по 114,

аминокислотные остатки с 69 по 113, аминокислотные остатки с 69 по 112, аминокислотные остатки с 69 по 111, аминокислотные остатки с 69 по 110, аминокислотные остатки с 69 по 109, аминокислотные остатки с 69 по 108, аминокислотные остатки с 69 по 107, аминокислотные остатки с 69 по 106, аминокислотные остатки с 69 по 105, или аминокислотные остатки с 69 по 104. В некоторых примерах часть ECD TACI может состоять из следующего со ссылкой на остатки, указанные в SEQ ID NO:709: аминокислотные остатки с 70 по 118, аминокислотные остатки с 70 по 117, аминокислотные остатки с 70 по 116, аминокислотные остатки с 70 по 115, аминокислотные остатки с 70 по 114, аминокислотные остатки с 70 по 113, аминокислотные остатки с 70 по 112, аминокислотные остатки с 70 по 111, аминокислотные остатки с 70 по 110, аминокислотные остатки с 70 по 109, аминокислотные остатки с 70 по 108, аминокислотные остатки с 70 по 107, аминокислотные остатки с 70 по 106, аминокислотные остатки от 70 до 105, или аминокислотные остатки от 70 до 104. В некоторых примерах часть ECD TACI может состоять из следующего со ссылкой на остатки, указанные в SEQ ID NO:709: аминокислотные остатки с 71 по 118, аминокислотные остатки с 71 по 117, аминокислотные остатки с 71 по 116, аминокислотные остатки с 71 по 115, аминокислотные остатки с 71 по 114, аминокислотные остатки с 71 по 113, аминокислотные остатки с 71 по 112, аминокислотные остатки с 71 по 111, аминокислотные остатки с 71 по 110, аминокислотные остатки с 71 по 109, аминокислотные остатки с 71 по 108, аминокислотные остатки с 71 по 107, аминокислотные остатки с 71 по 106, аминокислотные остатки с 71 по 105, или аминокислотные остатки с 71 по 104. Любая из вышеуказанных последовательностей ECD TACI также может быть эталонной последовательностью TACI в соответствии с TIM, которая является вариантом TACI в представленных в настоящей заявке иммуномодулирующих белках, где такие иммуномодулирующие белки содержат вариантный полипептид TACI, который модифицирован одной или несколькими аминокислотными модификациями (например, заменой), как описано в настоящей заявке, по сравнению с такой эталонной последовательностью TACI.

В частности, среди BIM в предоставленном иммуномодулирующем белке есть последовательность ECD TACI, которая содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:528 (кодируется последовательностью нуклеотидов, указанной в SEQ ID NO:563). В некоторых вариантах осуществления эталонная последовательность TACI содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:528, где

предоставленный вариантный полипептид TACI модифицирован одной или несколькими аминокислотными модификациями (например, заменой), как описано в настоящей заявке, по сравнению с такой эталонной последовательностью TACI.

Последовательность ECD TACI (CRD2): SEQ ID NO:528

SLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRS

Среди BIMS в представленном иммуномодулирующем белке есть варианты полипептидов TACI. В некоторых из представленных вариантов осуществления вариантная последовательность TACI имеет последовательность эталонной (например, немодифицированной) последовательности TACI, такую как любая описанная выше, но дополнительно содержит еще одну аминокислотную модификацию, такую как одна или несколько аминокислотных замен. В частности, BIM, представленная в настоящей заявке, может быть вариантным полипептидом TACI, содержащим по меньшей мере один модифицированный по аффинности TD-домен (например, CRD1 и/или CRD2) или его фрагмент специфического связывания, который содержит одну или несколько аминокислотных замен в TD-домене эталонного (например, немодифицированного или дикого типа) полипептида TACI, так что вариантный полипептид TACI проявляет измененную (например, повышенную) активность связывания или аффинность к одному или обоим из APRIL или BAFF по сравнению с эталонным (например, немодифицированным или дикого типа) полипептидом TACI. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид TACI, который имеет аффинность связывания с APRIL и/или BAFF, которая отличается от аффинности эталонной (например, немодифицированного или дикого типа) контрольной последовательности полипептида TACI, определенной, например, с помощью твердофазного иммуноанализа ELISA, проточной цитометрии или анализов Biacore. Аффинность связывания для каждого из когнатных партнеров по связыванию является независимой; то есть, в некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI имеет повышенную аффинность связывания с одним или обоими APRIL и BAFF, и пониженную или неизмененную аффинность связывания с другим из APRIL или BAFF относительно эталонного (например, немодифицированного или дикого типа) полипептида TACI.

В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид TACI, который обладает повышенной аффинностью связывания с BAFF по сравнению с эталонным (немодифицированным или дикого типа) полипептидом TACI. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид TACI, который обладает повышенной аффинностью связывания с APRIL по сравнению с

эталонным (немодифицированным или дикого типа) полипептидом TACI. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид TACI, обладающий повышенной аффинностью связывания с APRIL и BAFF по сравнению с эталонным (немодифицированным или дикого типа) полипептидом TACI. Когнатными лигандами BAFF и/или APRIL могут быть белки млекопитающих, такие как белок человека или мышиный белок. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая представляет собой вариантный полипептид TACI с повышенной или большей аффинностью связывания с APRIL и/или BAFF, будет иметь повышенную аффинность связывания относительно эталонного (например, немодифицированного или дикого типа) контрольного полипептида TACI по меньшей мере примерно на 5%, например, по меньшей мере примерно на 10%, 15%, 20%, 25%, 35%, или 50%. В некоторых вариантах осуществления увеличение аффинности связывания относительно эталонного (например, немодифицированного или дикого типа) полипептида TACI составляет более чем в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз или 50 раз. В любом из примеров эталонный (например, немодифицированный или дикого типа) полипептид TACI имеет ту же последовательность, что и вариантный полипептид TACI, за исключением того, что он не содержит одной или нескольких аминокислотных модификаций (например, замен).

В некоторых вариантах осуществления равновесная константа диссоциации (K_d) любого из вышеупомянутых вариантов осуществления для BAFF может составлять менее 1×10^{-5} M, 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M или 1×10^{-11} M, или 1×10^{-12} M. В некоторых вариантах осуществления K_d любого из вышеуказанных вариантов осуществления для BAFF составляет менее или примерно 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M или 1×10^{-11} M, или 1×10^{-12} M. В некоторых вариантах осуществления K_d любого из вышеупомянутых вариантов осуществления для BAFF составляет от 1×10^{-9} M до или примерно 1×10^{-12} M. В некоторых вариантах осуществления K_d любого из вышеупомянутых вариантов осуществления для BAFF составляет точно или примерно 1×10^{-9} M, точно или примерно 2×10^{-9} M, точно или примерно 4×10^{-9} M, точно или примерно 6×10^{-9} M, точно или примерно 8×10^{-9} M, точно или примерно 1×10^{-10} M, точно или примерно 2×10^{-10} M, точно или примерно 4×10^{-10} M, точно или примерно 6×10^{-10} M, точно или примерно 8×10^{-10} M, точно или примерно 1×10^{-11} M, точно или примерно 2×10^{-11} M, точно или примерно 4×10^{-11} M, точно или примерно 6×10^{-11} M, точно или примерно 8×10^{-11} M, точно или примерно 1×10^{-12} M, или любое значение между любым из вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления BIM в предоставленном варианте осуществления представляет собой вариантный полипептид TACI, как описано выше, и K_d к BAFF снижена (более

высокая аффинность связывания) более чем, или более чем примерно в 1,5 раза, например, более чем или примерно в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или более.

В некоторых вариантах осуществления равновесная константа диссоциации (K_d) любого из вышеуказанных вариантов осуществления к APRIL может составлять менее 1×10^{-5} M, 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M или 1×10^{-11} M, или 1×10^{-12} M. В некоторых вариантах осуществления K_d любого из вышеупомянутых вариантов осуществления для APRIL составляет менее или примерно 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M или 1×10^{-11} M, или 1×10^{-12} M. В некоторых вариантах осуществления K_d любого из вышеуказанных вариантов осуществления для APRIL составляет от 1×10^{-9} M до точно или примерно 1×10^{-12} M. В некоторых вариантах осуществления K_d любого из вышеуказанных вариантов осуществления для APRIL составляет точно или примерно 1×10^{-9} M, точно или примерно 2×10^{-9} M, точно или примерно 4×10^{-9} M, точно или примерно 6×10^{-9} M, точно или примерно 8×10^{-9} M, точно или примерно 1×10^{-10} M, точно или примерно 2×10^{-10} M, точно или примерно 4×10^{-10} M, точно или примерно 6×10^{-10} M, точно или примерно 8×10^{-10} M, точно или примерно 1×10^{-11} M, точно или примерно 2×10^{-11} M, точно или примерно 4×10^{-11} M, точно или примерно 6×10^{-11} M, точно или примерно 8×10^{-11} M, или точно или примерно 1×10^{-12} M, или любое значение между любыми из вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления BIM предоставленного варианта осуществления представляет собой вариантный полипептид TACI, как описано выше, и K_d к APRIL снижена (более высокая аффинность связывания) более чем или более чем примерно в 1,5 раза, например, более чем или примерно в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или более.

Эталонная (например, неизмененная или дикого типа) последовательность TACI не обязательно должна использоваться в качестве исходной композиции для получения BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, описанного в настоящей заявке. Следовательно, использование термина «модификация», такого как «замена», не подразумевает, что настоящие варианты осуществления ограничены конкретным способом получения вариантов полипептидов TACI или иммуномодулирующих белков, содержащих их. Варианты полипептидов TACI могут быть получены, например, путем синтеза пептида de novo и, таким образом, не обязательно требуют модификации, такой как «замена», в смысле изменения кодона для кодирования модификации, например, замены. Этот принцип также распространяется на термины «добавление» и «делеция» аминокислотного остатка, которые также не подразумевают конкретного способа получения. Средства, с помощью которых разрабатываются или создаются полипептиды

варианта TACI, не ограничены каким-либо конкретным способом. В некоторых вариантах осуществления, однако, нуклеиновая кислота, кодирующая эталонный (например, неизмененный или дикого типа) TACI, получена путем мутагенеза из эталонного (например, немодифицированного или дикого типа) генетического материала TACI и скрининга на необходимую специфическую аффинность связывания или другую функциональную активность. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI синтезируют de novo с использованием последовательностей белка или нуклеиновой кислоты, доступных в любом количестве общедоступных баз данных, и затем проводят последующий скрининг. Национальный центр биотехнологической информации предоставляет такую информацию, и его веб-сайт является общедоступным через Интернет, как и база данных UniProtKB, как обсуждалось ранее.

Если не установлено иное, как указано во всем настоящем раскрытии, ссылка на аминокислотную модификацию (модификации) BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, обозначается номером аминокислотного положения, соответствующим нумерации положений эталонной последовательности ECD, изложенной в SEQ ID NO:709. Специалист в данной области техники может идентифицировать соответствующее положение модификации, например, аминокислотной замены, в полипептиде TACI, включая его часть, содержащую TD (например, CRD1 и/или CRD2), например, путем выравнивания эталонной последовательности (например, SEQ ID NO:516 или 528) с SEQ ID NO:709. Выравнивание, идентифицирующее соответствующие остатки, показано на Фигуре 17A. В перечне модификаций по всему этому раскрытию положение аминокислоты указано в середине, при этом соответствующая эталонная (например, немодифицированная или дикого типа) аминокислота указана перед номером, а идентифицированный вариант аминокислотной замены указан после номера. Если модификация представляет собой удаление положения, указывается «del», а если модификация представляет собой вставку в положение, указывается «ins». В некоторых случаях вставка указана с положением аминокислоты, указанным в середине, при этом соответствующая эталонная аминокислота указана до и после номера, а идентифицированный вариант аминокислотной вставки указан после немодифицированной (например, дикого типа) аминокислоты.

В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид TACI, который имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замену в эталонной (например, немодифицированной или дикого типа) последовательности TACI, такую как любая из описанных. Модификация одной или

нескольких аминокислот, например, замена, может находиться в эктодомене (внеклеточном домене) эталонной (например, немодифицированной или дикого типа) последовательности TACI. В некоторых вариантах осуществления модификация одной или нескольких аминокислот, например, замена, происходит в домене CRD1 или его фрагменте специфического связывания. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных модификаций, например, замена происходит в домене CRD2 или его фрагменте специфического связывания. В некоторых вариантах осуществления вариантного полипептида TACI часть одной или нескольких аминокислотных модификаций, например, замена, находится в домене CRD1 или его фрагменте специфического связывания, и некоторые из одной или нескольких аминокислотных модификаций, например, замена, находятся в домене CRD2 или его фрагменте специфического связывания.

В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, имеет до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, или 20 аминокислотных модификаций, например, замен. Модификация, например, замена, может быть в домене CRD1 или домене CRD2. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, имеет до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, или 20 аминокислотных замен в домене CRD1 или его фрагменте специфического связывания. В некоторых вариантах осуществления BIM, который является вариантным полипептидом TACI, имеет до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, или 20 аминокислотных замен в домене CRD2 или его фрагменте специфического связывания. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI, содержащий одну или несколько аминокислотных модификаций (например, аминокислотных замен), как описано, имеет по меньшей мере примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичности последовательности с эталонным (например, немодифицированным или дикого типа) полипептидом TACI или его фрагментом специфического связывания, например, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:516, 528 или 709. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI, содержащий одну или несколько аминокислотных модификаций (например, аминокислотных замен), как описано, имеет по меньшей мере примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:709. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI, содержащий одну или несколько аминокислотных модификаций (например, аминокислотных замен), как описано, имеет по

меньшей мере примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:516. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI, содержащий одну или несколько аминокислотных модификаций (например, аминокислотных замен), как описано, имеет по меньшей мере примерно 85%, 86%, 86%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:528.

В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замену в эталонном полипептиде TACI или фрагменте специфического связывания, соответствующем положению (положениям) 40, 59, 60, 61, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 92, 95, 97, 98, 99, 101, 102 и 103 со ссылкой на нумерацию SEQ ID NO:709. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замену, выбранную из W40R, Q59R, R60G, T61P, E74V, Q75E, Q75R, G76S, K77E, F78Y, Y79F, L82H, L82P, L83S, R84G, R84L, R84Q, D85E, D85V, C86Y, I87L, I87M, S88N, I92V, Q95R, P97S, K98T, Q99E, A101D, Y102D, F103S, F103V, F103Y, или их консервативной аминокислотной замены. В некоторых вариантах осуществления эталонный полипептид TACI включает домен CRD1 или домен CRD2, например, эталонный полипептид TACI указанный в SEQ ID NO:516 или SEQ ID NO:709.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены находятся только в домене CRD2. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замену в эталонном полипептиде TACI или фрагменте специфического связывания, соответствующую положению (положениям) 74, 75, 76, 77, 78, 79, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 92, 95, 97, 98, 99, 101, 102 и 103 со ссылкой на нумерацию SEQ ID NO:709. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замену, выбранную из E74V, Q75E, Q75R, G76S, K77E, F78Y, Y79F, L82H, L82P, L83S, R84G, R84L, R84Q, D85E, D85V, C86Y, I87L, I87M, S88N, I92V, Q95R, P97S, K98T, Q99E, A101D, Y102D, F103S, F103V, F103Y, или их консервативной аминокислотной замены. В некоторых вариантах осуществления среди доменов CRD эталонный полипептид TACI включает только домен CRD2, но не содержит домена CRD1, например, эталонный полипептид TACI указан в SEQ ID NO:528. Соответственно, в некоторых вариантах

осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает часть последовательности ECD полипептида TACI, которая включает домен CRD2, но лишена домена CRD1.

Консервативная аминокислотная модификация, например, замена, представляет собой любую аминокислоту, которая относится к тому же классу аминокислот, что и замещенные аминокислоты, кроме эталонной (например, немодифицированной) или аминокислоты дикого типа. Классы аминокислот являются алифатическими (глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин), гидроксильными или серосодержащими (серин, цистеин, треонин и метионин), циклическими (пролин), ароматическими (фенилаланин, тирозин, триптофан), основными (гистидин, лизин и аргинин), и кислотными/амидными (аспартат, глутамат, аспарагин и глутамин).

В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении 75 со ссылкой на нумерацию SEQ ID NO:709. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена в положении 75 обеспечивает повышенное связывание с BAFF или APRIL по сравнению с эталонным (например, диким типом или немодифицированным) полипептидом TACI, не содержащим аминокислотную замену. В некоторых вариантах осуществления замещенная аминокислота представляет собой кислую аминокислоту или амид, например, на другую кислую аминокислоту или амид, по сравнению с эталонным (например, дикого типа или немодифицированным) полипептидом TACI. В некоторых вариантах осуществления замещенная аминокислота в положении 75 представляет собой глутаминовую кислоту (Glu, E). В некоторых вариантах замещенная аминокислота в положении 75 представляет собой аспарагиновую кислоту (Asp, D). В некоторых вариантах осуществления замещенная аминокислота в положении 75 представляет собой аспарагин (Asn N). В некоторых вариантах осуществления замещенная аминокислота в положении 75 представляет собой глутамин (Gln, Q).

В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении 77 со ссылкой на нумерацию SEQ ID NO:709. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена в положении 77 обеспечивает повышенное связывание с BAFF или APRIL по сравнению с эталонным (например, диким типом или немодифицированным) полипептидом TACI, не содержащим аминокислотную замену. В некоторых вариантах осуществления замещенная аминокислота в положении 77 представляет собой кислую аминокислоту или амид. В некоторых вариантах осуществления замещенная аминокислота в положении 77 представляет собой

глутаминовую кислоту (Glu, E). В некоторых вариантах осуществления замещенная аминокислота в положении 77 представляет собой аспарагиновую кислоту (Asp, D). В некоторых вариантах осуществления замещенная аминокислота в положении 77 представляет собой аспарагин (Asn, N). В некоторых вариантах осуществления замещенная аминокислота в положении 77 представляет собой глутамин (Gln, Q).

В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении 78 со ссылкой на нумерацию SEQ ID NO:709. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена в положении 78 обеспечивает повышенное связывание с BAFF или APRIL по сравнению с эталонным (например, диким типом или немодифицированным) полипептидом TACI, не содержащим аминокислотную замену. В некоторых вариантах осуществления замещенная аминокислота в положении 78 является ароматической аминокислотой, такой как другая ароматическая аминокислота по сравнению с эталонным (например, диким типом или немодифицированным) полипептидом TACI. В некоторых вариантах осуществления замещенная аминокислота в положении 78 представляет собой фенилаланин (Фен, F). В некоторых вариантах осуществления замещенная аминокислота в положении 78 представляет собой тирозин (Tyr, Y). В некоторых вариантах осуществления замещенная аминокислота в положении 78 представляет собой триптофан (Trp, W).

В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении 84 со ссылкой на нумерацию SEQ ID NO:709. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена в положении 84 обеспечивает повышенное связывание с BAFF или APRIL по сравнению с эталонным (например, диким типом или немодифицированным) полипептидом TACI, не содержащим аминокислотную замену. В некоторых вариантах осуществления замещенная аминокислота в положении 84 представляет собой кислую аминокислоту или амид. В некоторых вариантах осуществления замещенная аминокислота в положении 84 представляет собой глутаминовую кислоту (Glu, E). В некоторых вариантах осуществления замещенная аминокислота в положении 84 представляет собой аспарагиновую кислоту (Asp, D). В некоторых вариантах осуществления замещенная аминокислота в положении 84 представляет собой аспарагин (Asn, N). В некоторых вариантах осуществления замещенная аминокислота в положении 84 представляет собой глутамин (Gln, Q).

В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в

положении 102 со ссылкой на нумерацию SEQ ID NO:709. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена в положении 102 обеспечивает повышенное связывание с BAFF или APRIL по сравнению с эталонным (например, диким типом или немодифицированным) полипептидом TACI, не содержащим аминокислотную замену. В некоторых вариантах осуществления замещенная аминокислота в положении 102 представляет собой кислую аминокислоту или амид. В некоторых вариантах осуществления замещенная аминокислота в положении 102 представляет собой глутаминовую кислоту (Glu, E). В некоторых вариантах осуществления замещенная аминокислота в положении 102 представляет собой аспарагиновую кислоту (Asp, D). В некоторых вариантах осуществления замещенная аминокислота в положении 102 представляет собой аспарагин (Asn, N). В некоторых вариантах осуществления замещенная аминокислота в положении 102 представляет собой глутамин (Gln, Q).

В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает по меньшей мере одну аминокислотную замену E74V. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает по меньшей мере одну аминокислотную замену Q75E. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает по меньшей мере одну аминокислотную замену K77E. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает по меньшей мере одну аминокислотную замену F78Y. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает по меньшей мере одну аминокислотную замену Y79F. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает по меньшей мере одну аминокислотную замену L82H. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает по меньшей мере одну аминокислотную замену L82P. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает по меньшей мере одну аминокислотную замену R84G. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает по меньшей мере одну аминокислотную замену R84L. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает по меньшей мере одну аминокислотную замену R84Q. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает по меньшей мере одну аминокислотную замену D85V. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает по меньшей мере одну

аминокислотную замену C86Y. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает по меньшей мере одну аминокислотную замену Y102D. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, содержит две или более аминокислотных замен любых двух или более из вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает одну или несколько аминокислотных замен, которые являются консервативной аминокислотной заменой любого из вышеперечисленных. В представленных вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в любой эталонной последовательности полипептида TACI, как описано. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:516. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:528. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:718. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:719.

В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает аминокислотную замену E74V. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает аминокислотную замену Q75E. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает аминокислотную замену K77E. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает аминокислотную замену F78Y. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает аминокислотную замену Y79F. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает аминокислотную замену L82H. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает аминокислотную замену L82P. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает аминокислотную замену R84G. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает аминокислотную замену R84L. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает аминокислотную

замену R84Q. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает аминокислотную замену D85V. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает аминокислотную замену C86Y. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает аминокислотную замену Y102D. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, содержит две или более аминокислотных замен любых двух или более из вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает одну или несколько аминокислотных замен, которые являются консервативной аминокислотной заменой любой из вышеперечисленных. В представленных вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает аминокислотную замену в любой эталонной последовательности полипептида TACI, как описано. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:516. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:528. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:718. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:719. В некоторых вариантах осуществления аминокислотными заменами являются D85E/K98T. В некоторых вариантах осуществления аминокислотными заменами являются I87L/K98T. В некоторых вариантах осуществления аминокислотными заменами являются R60G/Q75E/L82P. В некоторых вариантах осуществления аминокислотными заменами являются R60G/C86Y. В некоторых вариантах осуществления аминокислотными заменами являются W40R/L82P/F103Y. В некоторых вариантах осуществления аминокислотными заменами являются W40R/Q59R/T61P/K98T. В некоторых вариантах осуществления аминокислотными заменами являются L82P/I87L. В некоторых вариантах осуществления аминокислотными заменами являются G76S/P97S. В некоторых вариантах осуществления аминокислотными заменами являются K77E/R84L/F103Y. В некоторых вариантах осуществления аминокислотными заменами являются Y79F/Q99E. В некоторых вариантах осуществления аминокислотными заменами являются L83S/F103S. В некоторых вариантах осуществления аминокислотными заменами являются K77E/R84Q. В некоторых вариантах осуществления аминокислотными заменами являются K77E/A101D. В некоторых вариантах осуществления аминокислотными заменами являются K77E/F78Y/Y102D. В некоторых

вариантах осуществления аминокислотными заменами являются Q75E/R84Q. В некоторых вариантах осуществления аминокислотными заменами являются Q75R/R84G/I92V. В некоторых вариантах осуществления аминокислотными заменами являются K77E/A101D/Y102D. В некоторых вариантах осуществления аминокислотными заменами являются R84Q/S88N/A101D. В некоторых вариантах осуществления аминокислотными заменами являются R84Q/F103V. В некоторых вариантах осуществления аминокислотными заменами являются K77E/Q95R/A101D. В некоторых вариантах осуществления аминокислотными заменами являются I87M/A101D. В представленных вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает аминокислотные замены в любой эталонной последовательности полипептида TACI, как описано. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:516. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:528. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:718. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:719.

В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает аминокислотные замены K77E и F78Y (K77E/F78Y). В предоставленных вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает аминокислотные замены в любой эталонной последовательности полипептида TACI, как описано. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:516. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:528. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:718. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:719.

В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает аминокислотные замены K77E и Y102D (K77E/Y102D). В предоставленных вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает аминокислотные замены в любой эталонной последовательности полипептида TACI, как описано. В некоторых вариантах

осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:516. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:528. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:718. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:719.

В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, содержит аминокислотные замены F78Y и Y102D (F78Y/Y012D). В предоставленных вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает аминокислотные замены в любой эталонной последовательности полипептида TACI, как описано. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:516. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:528. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:718. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:719.

В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, содержит аминокислотные замены K77E, F78Y и Y102D (K77E/F78Y/Y102D). В предоставленных вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает аминокислотные замены в любой эталонной последовательности полипептида TACI, как описано. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:516. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:528. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:718. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:719.

В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, содержит аминокислотные замены Q75E/R84Q. В предоставленных вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает аминокислотные замены в любой эталонной последовательности полипептида

TACI, как описано. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:516. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:528. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:718. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:719.

В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, содержит любую из мутаций, перечисленных в Таблице 2. В Таблице 2 также приведены примерные последовательности со ссылкой на SEQ ID NO эталонного (например, немодифицированного) полипептида TACI и примерные варианты полипептидов TACI. Как указано, точный локус или остатки, соответствующие данному домену, могут варьировать, например, в зависимости от методов, используемых для идентификации или классификации домена. Также, в некоторых случаях, соседние N- и/или C-концевые аминокислоты данного домена (например, CRD) также могут быть включены в последовательность BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, например, для обеспечения надлежащего фолдинга домена при экспрессии. Таким образом, понятно, что приведенная в Таблице 2 иллюстрация SEQ ID NO не должна толковаться как ограничивающая. Например, конкретный домен, такой как домен ECD или его часть, содержащая CRD1/CRD2 или только CRD2 вариантного полипептида TACI может быть на несколько аминокислот длиннее или короче, например, 1-10, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот длиннее или короче, чем аминокислотная последовательность, указанная в соответствующей SEQ ID NO.

В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, содержит любую из мутаций (аминокислотных замен), перечисленных в Таблице 2. В некоторых примерах мутации (аминокислотные замены) производят в эталонном TACI, содержащем последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:709. В некоторых примерах мутации (аминокислотные замены) производят в эталонном TACI, который содержит домены CRD1 и CRD2 TACI, например, как указано в SEQ ID NO:516. В некоторых примерах мутации (аминокислотные замены) производят в эталонном TACI, который дополнительно укорочен путем удаления N-концевых и C-концевых аминокислотных остатков для сохранения CRD2, например, как указано в SEQ ID NO:528.

Использование термина «модификация», такого как «замена» или «мутация», не подразумевает, что настоящие варианты осуществления ограничены конкретным

способом получения иммуномодулирующих белков. BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, может быть получена, например, путем синтеза пептида de novo и, таким образом, не обязательно требует модификации, такой как «замена» в смысле изменения кодона для кодирования модификации, например, замены. Этот принцип также распространяется на термины «добавление» и «делеция» аминокислотного остатка, которые также не подразумевают конкретного способа получения. Средства, с помощью которых разрабатывают или создают vTD, не ограничены каким-либо конкретным методом. Однако в некоторых вариантах осуществления кодирующую нуклеиновую кислоту дикого типа или немодифицированную TD получают путем мутагенеза из генетического материала дикого типа или немодифицированного TD, и подвергают скринингу на необходимую специфическую активность связывания, например, аффинность связывания и/или изменение модуляции NF-κB или другой функциональной активности. В некоторых вариантах осуществления vTD синтезируют de novo с использованием последовательностей белков или нуклеиновых кислот, доступных в любом количестве общедоступных баз данных, и затем проводят последующий скрининг. Национальный центр биотехнологической информации предоставляет такую информацию, и его веб-сайт является общедоступным через Интернет, как и база данных UniProtKB.

В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, включает последовательности внеклеточного домена (ECD), содержащие CRD1 и CRD2, такие как вариантный полипептид TACI, указанный в любой из SEQ ID NO:517-527, 536, 537, 682-701. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, содержит полипептидную последовательность, которая проявляет по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 91% идентичности, по меньшей мере 92% идентичности, по меньшей мере 93% идентичности, по меньшей мере 94% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, например, по меньшей мере 96% идентичности, 97% идентичности, 98% идентичности или 99% идентичности с любой из SEQ ID NO:517-527, 536, 537, 682-701, и сохраняет аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены), отсутствующую в эталонном (например, немодифицированном или дикого типа) TACI. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, содержит фрагмент специфического связывания любой из SEQ ID NO:517-527, 536, 537, 682-701, где фрагмент специфического связывания связывает BAFF, APRIL или гетеротример BAFF/APRIL и содержит в нем непрерывную последовательность, которая включает аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены),

отсутствующую в эталонном (например, немодифицированном или дикого типа) TACI.

В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, состоит по существу или состоит из последовательностей варианта внеклеточного домена TACI (ECD), изложенных в любой из SEQ ID NO:517-527, 536, 537, 682-701. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, состоит по существу или состоит из полипептидной последовательности, которая проявляет по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 91% идентичности, по меньшей мере 92% идентичности, по меньшей мере 93% идентичности, по меньшей мере 94% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, например, по меньшей мере 96% идентичности, 97% идентичности, 98% идентичности или 99% идентичности с любой из SEQ ID NO:517-527, 536, 537, 682-701, и сохраняет аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены), отсутствующую в эталонном (например, немодифицированном или дикого типа) TACI. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, состоит по существу или состоит из фрагмента специфического связывания любой из SEQ ID NO:517-527, 536, 537, 682-701, где фрагмент специфического связывания связывает BAFF, APRIL или гетеротример APRIL/BAFF и содержит в нем непрерывную последовательность, включающую аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены), отсутствующую в эталонном (например, немодифицированном или дикого типа) TACI.

В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, содержит последовательности внеклеточного домена (ECD), содержащие CRD2, но не имеющие CRD1 эталонного полипептида TACI, такого как вариантный полипептид TACI, указанный в любой из SEQ ID NO:529-535, 538-550, 673-681. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, содержит полипептидную последовательность, которая проявляет по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 91% идентичности, по меньшей мере 92% идентичности, по меньшей мере 93% идентичности, по меньшей мере 94% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, такую как по меньшей мере 96% идентичности, 97% идентичности, 98% идентичности или 99% идентичности с любой из SEQ ID NO:529-535, 538-550, 673-681, и сохраняет аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены), отсутствующую в эталонном (например, немодифицированном или дикого типа) TACI. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, содержит фрагмент специфического связывания любой из SEQ ID NO:529-535, 538-550, 673-681, в котором

фрагмент специфического связывания связывает BAFF, APRIL или гетеротример BAFF/APRIL и содержит непрерывную последовательность, включающую аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены), отсутствующую в эталонном (например, немодифицированном или дикого типа) TACI.

В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, состоит по существу или состоит из последовательности, изложенной в любой из SEQ ID NO:529-535, 538-550, 673-681. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, состоит по существу или состоит из полипептидной последовательности, которая проявляет по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 91% идентичности, по меньшей мере 92% идентичности, по меньшей мере 93% идентичности, по меньшей мере 94% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, такую как по меньшей мере 96% идентичности, 97% идентичности, 98% идентичности или 99% идентичности с любой из SEQ ID NO:529-535, 538-550, 673-681, и сохраняет аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены), отсутствующую в эталонном (например, немодифицированном или дикого типа) TACI. В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, состоит по существу или состоит из фрагмента специфического связывания любой из SEQ ID NO:529-535, 538-550, 673-681, где фрагмент специфического связывания связывает BAFF, APRIL или гетеротример BAFF/APRIL и содержит в нем непрерывную последовательность, включающую аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены), не присутствующую в эталонном (например, немодифицированном или дикого типа) TACI.

В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, является такой, где вариантный полипептид TACI содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:535. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI состоит по существу из последовательности, указанной в SEQ ID NO:535. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:535.

В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, является такой, где вариантный полипептид TACI содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:541. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI состоит по существу из последовательности, указанной в SEQ ID NO:541. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:541.

В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным

полипептидом TACI, является такой, где вариантный полипептид TACI содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:542. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI состоит по существу из последовательности, указанной в SEQ ID NO:542. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:542.

В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, является такой, где вариантный полипептид TACI содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:688. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI состоит по существу из последовательности, указанной в SEQ ID NO:688. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:688.

В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, является такой, где вариантный полипептид TACI кодируется последовательностью нуклеотидов, указанной в любой из SEQ ID NO:552-562, 571 или 572. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI кодируется последовательностью нуклеотидов, которая демонстрирует по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 91% идентичности, по меньшей мере 92% идентичности, по меньшей мере 93% идентичности, по меньшей мере 94% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, такой как по меньшей мере 96% идентичности, 97% идентичности, 98% идентичности или 99% идентичности с любой из SEQ ID NO:552-562, 571 или 572, и сохраняет аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены), отсутствующую в эталонном (например, немодифицированном или дикого типа) TACI.

В некоторых вариантах осуществления BIM, которая является вариантным полипептидом TACI, является такой, где вариантный полипептид TACI кодируется последовательностью нуклеотидов, изложенных в любой из SEQ ID NO:564-570 или 573-585. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI кодируется последовательностью нуклеотидов, которая демонстрирует по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 91% идентичности, по меньшей мере 92% идентичности, по меньшей мере 93% идентичности, по меньшей мере 94% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, такой как по меньшей мере 96% идентичности, 97% идентичности, 98% идентичности или 99% идентичности с любой из SEQ ID NO:564-570 или 573-585, и сохраняет аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены), отсутствующую в эталонном (например, немодифицированном или дикого типа) TACI.

Таблица 2: Примерный вариант BIM TACI					
Название	**Мутация (мутации)**	**ECD (CRD1/CRD2)**		**ECD (CRD2)**	
		AA SEQ ID NO	**NT SEQ ID NO**	**AA SEQ ID NO**	**NT SEQ ID NO**
516 (WT) TACI CRD1/CRD2 528 (WT) TACI CRD2	Дикий тип	516	551	528	563
517 TACI CRD1/CRD2 673 TACI CRD2	L82P	517	552	673	
518 TACI CRD1/CRD2 674 TACI CRD2	D85E, K98T	518	553	674	
519 TACI CRD1/CRD2 675 TACI CRD2	I87L, K98T	519	554	675	
520 TACI CRD1/CRD2	R60G, Q75E, L82P	520	555		
521 TACI CRD1/CRD2	R60G, C86Y	521	556		
522 TACI CRD1/CRD2 676 TACI CRD2	A101D	522	557	676	
523 TACI CRD1/CRD2 677 TACI CRD2	C86Y	523	558	677	
524 TACI CRD1/CRD2	W40R, L82P, F103Y	524	559		
525 TACI CRD1/CRD2	W40R, Q59R, T61P, K98T	525	560		
526 TACI CRD1/CRD2 678 TACI CRD2	L82P, I87L	526	561	678	
527 TACI CRD1/CRD2 679 TACI CRD2	G76S, P97S	527	562	679	
682 TACI CRD1/CRD2 529 TACI CRD2	D85V	682		529	564
683 TACI CRD1/CRD2 530 TACI CRD2	E74V	683		530	565
684 TACI CRD1/CRD2 531 TACI CRD2	R84L	684		531	566
685 TACI CRD1/CRD2 532 TACI CRD2	K77E, R84L, F103Y	685		532	567
686 TACI CRD1/CRD2 533 TACI CRD2	Y79F, Q99E	686		533	568
687 TACI CRD1/CRD2 534 TACI CRD2	Y79F	687		534	569
536 TACI CRD1/CRD2 680 TACI CRD2	R84G	688		535	570
536 TACI CRD1/CRD2 680 TACI CRD2	L83S, F103S	536	571	680	
537 TACI CRD1/CRD2 681 TACI CRD2	L82H	537	572	681	
689 TACI CRD1/CRD2 538 TACI CRD2	A101D	689		538	573
690 TACI CRD1/CRD2 539 TACI CRD2	K77E, R84Q	690		539	574

Таблица 2: Примерный вариант BIM TACI					
Название	**Мутация (мутации)**	**ECD (CRD1/CRD2)**		**ECD (CRD2)**	
		AA SEQ ID NO	**NT SEQ ID NO**	**AA SEQ ID NO**	**NT SEQ ID NO**
691 TACI CRD1/CRD2 540 TACI CRD2	K77E, A101D	691		540	575
692 TACI CRD1/CRD2 541 TACI CRD2	K77E, F78Y, Y102D	692		541	576
693 TACI CRD1/CRD2 542 TACI CRD2	Q75E, R84Q	693		542	577
694 TACI CRD1/CRD2 543 TACI CRD2	Q75R, R84G, I92V	694		543	578
695 TACI CRD1/CRD2 544 TACI CRD2	K77E, A101D, Y102D	695		544	579
696 TACI CRD1/CRD2 545 TACI CRD2	R84Q	696		545	580
697 TACI CRD1/CRD2 546 TACI CRD2	R84Q, S88N, A101D	697		546	581
698 TACI CRD1/CRD2 547 TACI CRD2	K77E	698		547	582
699 TACI CRD1/CRD2 548 TACI CRD2	R84Q, F103V	699		548	583
700 TACI CRD1/CRD2 549 TACI CRD2	K77E, Q95R, A101D	700		549	584
701 TACI CRD1/CRD2 550 TACI CRD2	I87M, A101D	701		550	585
769 TACI CRD2	Q75E			769	
770 TACI CRD2	Q75E, K77E			770	
771 TACI CRD2	Q75E, F78Y			771	
772 TACI CRD2	Q75E, A101D			772	
773 TACI CRD2	Q75E, Y102D			773	
774 TACI CRD2	K77E, F78Y, R84Q			774	
775 TACI CRD2	F78Y			775	
776 TACI CRD2	F78Y, R84Q			776	
777 TACI CRD2	F78Y, A101D			777	
778 TACI CRD2	F78Y, Y102D			778	
779 TACI CRD2	R84Q, A101D			779	
780 TACI CRD2	R84Q, Y102D			780	

Таблица 2: Примерный вариант BIM TACI					
Название	**Мутация (мутации)**	**ECD (CRD1/CRD2)**		**ECD (CRD2)**	
		AA SEQ ID NO	**NT SEQ ID NO**	**AA SEQ ID NO**	**NT SEQ ID NO**
781 TACI CRD2	A101D, Y102D			781	
792 TACI CRD2	Y102D			792	
793 TACI CRD2	K77E, F78Y			793	
794 TACI CRD2	K77E, Y102D			794	

В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой или содержит ECD дикого типа или немодифицированный ECD TACI или его часть специфического связывания или ее фрагмент, содержащий по меньшей мере один TD (например, по меньшей мере один CRD, такой как CRD1 и/или CRD2), который связывается с APRIL, BAFF и/или гетеротримером APRIL/ BAFF. В некоторых вариантах осуществления BIM содержит последовательность ECD, указанную в SEQ ID NO:709, (ii) последовательность аминокислот, которая проявляет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO:709 и которая связывается с APRIL, BAFF или гетеротимером APRIL/BAFF, или (iii) является фрагментом или частью (i) или (ii), содержащей CRD1 и/или CRD2, где часть связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером APRIL/BAFF. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой последовательность TACI, которая состоит по существу или состоит из последовательности, изложенной в SEQ ID NO:709. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой последовательность TACI, содержащую остатки 2-166 из SEQ ID NO:709, в которой отсутствует N-концевой метионин, как указано в SEQ ID NO:709. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой последовательность TACI, которая состоит по существу или состоит из последовательности, изложенной в виде аминокислот 2-166 из SEQ ID NO:709.

В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой или содержит связывающую часть дикого типа или немодифицированного ECD TACI или часть специфического связывания или ее фрагмент, который содержит CRD1 и CRD2 TACI и который связывается с APRIL, BAFF и/или гетеротримером APRIL/BAFF. В некоторых вариантах осуществления BIM содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:719, (ii) последовательность аминокислот, которая проявляет по меньшей мере 85%,

86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более последовательности, идентичной SEQ ID NO:719 и которая связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером APRIL/BAFF, или (iii) является фрагментом или частью (i) или (ii), содержащей часть CRD1 и/или CRD2, где часть связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером APRI/BAFF. В некоторых вариантах осуществления BIM содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO:719. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой последовательность TACI, которая состоит по существу или состоит из последовательности, изложенной в SEQ ID NO:719. В некоторых вариантах осуществления BIM содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:718, (ii) последовательность аминокислот, которая проявляет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO:718 и которая связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером APRIL/BAFF, или (iii) является фрагментом или частью (i) или (ii), содержащей часть CRD1 и/или CRD2, где часть связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером APRI/BAFF. В некоторых вариантах BIM содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO:718. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой последовательность TACI, которая состоит по существу или состоит из последовательности, изложенной в SEQ ID NO:718. В некоторых вариантах осуществления BIM содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:516, (ii) последовательность аминокислот, которая проявляет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO:516 и которая связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером APRIL/BAFF, или (iii) является фрагментом или частью (i) или (ii), содержащей часть CRD1 и/или CRD2, где часть связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером APRI/BAFF. В некоторых вариантах осуществления BIM содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO:516. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой последовательность TACI, которая состоит по существу или состоит из последовательности, изложенной в SEQ ID NO:516.

В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой или содержит связывающую часть дикого типа или немодифицированного ECD TACI, или его часть специфического связывания или фрагмент, который содержит только CRD2 TACI и который связывается с APRIL, BAFF и/или гетеротримером APRIL/BAFF. В некоторых вариантах осуществления BIM содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:528, (ii) последовательность аминокислот, которая проявляет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более

идентичности последовательности с SEQ ID NO:528 и которая связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером APRIL/BAFF, или (iii) является фрагментом или частью (i) или (ii), содержащей часть CRD2, где часть связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером APRI/BAFF. В некоторых вариантах BIM содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO:528. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой последовательность TACI, которая состоит по существу или состоит из последовательности, изложенной в SEQ ID NO:528.

В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариант TACI, содержащий ECD или его часть специфического связывания или фрагмент, имеющий vTD, содержащий одну или несколько аминокислотных замен (мутаций или замещений) относительно эталонной последовательности TACI. Эталонная последовательность TACI может включать любую, как описано в Разделе II выше. Одна или несколько аминокислотных замен могут включать любую из аминокислотных замен, описанных в Разделе II выше. Например, BIM может быть вариантом TACI, содержащим ECD или его фрагмент специфического связывания, имеющий vTD, содержащий любую из аминокислотных замен, изложенных в Таблице 2. В некоторых примерах мутации производят в эталонном TACI, содержащем последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:709. В некоторых примерах мутации производят в эталонном TACI, который содержит домены CRD1 и CRD2 TACI, например, как указано в SEQ ID NO:516. В некоторых примерах мутации производят в эталонном TACI, который дополнительно укорочен путем удаления N-концевых и C-концевых аминокислотных остатков для сохранения CRD2, например, как указано в SEQ ID NO:528.

В некоторых вариантах осуществления BIM содержит последовательность внеклеточного домена (ECD), содержащую CRD1 и CRD2, такую как вариантный полипептид TACI, указанный в любой из SEQ ID NO:517-527, 536, 537, 682-701. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид TACI, который содержит полипептидную последовательность, которая проявляет по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 91% идентичности, по меньшей мере 92% идентичности, по меньшей мере 93% идентичности, по меньшей мере 94% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, такую как по меньшей мере 96% идентичности, 97% идентичности, 98% идентичности или 99% идентичности с любой из SEQ ID NO:517-527, 536, 537, 682-701, и сохраняет аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены), отсутствующую в эталонном (например, немодифицированном или дикого типа) TACI. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид TACI, который содержит фрагмент

специфического связывания любой из SEQ ID NO:517-527, 536, 537, 682-701, где фрагмент специфического связывания связывает BAFF, APRIL или гетеротимер BAFF/APRIL и содержит непрерывную последовательность, включающую аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены), отсутствующая в эталонном (например, немодифицированном или дикого типа) TACI.

В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид TACI, который состоит по существу или состоит из вариантных последовательностей внеклеточного домена TACI (ECD), изложенных в любой из SEQ ID NO:517-527, 536, 537, 682-701. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид TACI, который состоит по существу или состоит из полипептидной последовательности, которая проявляет по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 91% идентичности, по меньшей мере 92% идентичности, по меньшей мере 93% идентичности, по меньшей мере 94% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, такой как по меньшей мере 96% идентичности, 97% идентичности, 98% идентичности или 99% идентичности с любой из SEQ ID NO:517-527, 536, 537, 682-701, и сохраняет аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены), отсутствующую в эталонном (например, немодифицированном или дикий тип) TACI. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид TACI, который состоит по существу или состоит из фрагмента специфического связывания любой из SEQ ID NO:517-527, 536, 537, 682-701, где фрагмент специфического связывания связывает BAFF, APRIL или гетеротример APRIL/BAFF и содержит непрерывную последовательность, включающую аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены), отсутствующую в эталонном (например, немодифицированном или дикого типа) TACI.

В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид TACI, который включает последовательности внеклеточного домена (ECD), содержащие CRD2, но не имеющие CRD1 эталонного полипептида TACI, такого как вариантный полипептид TACI, указанный в любой из SEQ ID NO:529-535, 538-550, 673-681, 769-794. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид TACI, который содержит полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 91% идентичности, по меньшей мере 92% идентичности, по меньшей мере 93% идентичности, по меньшей мере 94% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, такую как по меньшей мере 96% идентичности, 97% идентичности, 98% идентичности или 99% идентичности с любой из SEQ ID NO:529-535, 538-550, 673-681, и сохраняющую аминокислотную модификацию

(модификации), например, замену (замены), отсутствующую в эталонном (например, немодифицированном или дикого типа) TACI. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид TACI, который содержит фрагмент специфического связывания любой из SEQ ID NO:529-535, 538-550, 673-681, 769-794, где фрагмент специфического связывания связывает BAFF, APRIL или гетеротимер BAFF/APRIL и содержит в нем непрерывную последовательность, включающую аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены), отсутствующую в эталонном (например, немодифицированнои или дикого типа) TACI.

В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид TACI, который состоит по существу или состоит из последовательности, изложенной в любой из SEQ ID NO:529-535, 538-550, 673-681, 769-794. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид TACI, который состоит по существу или состоит из полипептидной последовательности, которая проявляет по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 91% идентичности, по меньшей мере 92% идентичности, по меньшей мере 93% идентичности, по меньшей мере 94% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, такой как по меньшей мере 96% идентичности, 97% идентичности, 98% идентичности или 99% идентичности с любой из SEQ ID NO:529-535, 538-550, 673-681, 769-794, и сохраняет аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены), отсутствующую в эталонном (например, немодифицированном или дикого типа) TACI. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид TACI, который состоит по существу или состоит из фрагмента специфического связывания любой из SEQ ID NO:529-535, 538-550, 673-681, 769-794, где фрагмент специфического связывания связывает BAFF, APRIL или гетеротример BAFF/APRIL и содержит непрерывную последовательность, включающую аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены), отсутствующую в эталонном (например, немодифицированном или дикого типа) TACI.

В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид TACI, который содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:535. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид TACI, который состоит по существу из последовательности, указанной в SEQ ID NO:535. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид TACI, который состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:535.

В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид TACI, который содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:541. В

некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид TACI, который состоит по существу из последовательности, указанной в SEQ ID NO:541. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид TACI, который состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:541.

В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид TACI, который содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:542. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид TACI, который состоит по существу из последовательности, указанной в SEQ ID NO:542. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид TACI, состоящий из последовательности, указанной в SEQ ID NO:542.

В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид TACI, который содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:688. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид TACI, который состоит по существу из последовательности, указанной в SEQ ID NO:688. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид TACI, который состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:688.

2. BCMA

В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой или содержит ECD BCMA дикого типа или его часть специфического связывания, или фрагмент, содержащий TD (например, CRD), который связывается с APRIL, BAFF и/или гетеротримером APRIL/BAFF. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой или содержит вариант ECD BCMA или его часть специфического связывания или фрагмент, содержащий TD (например, CRD), который связывается с APRIL, BAFF и/или гетеротримером APRIL/BAFF. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой полипептид BCMA или его вариант с любой из последовательностей, изложенных в Разделе II выше (например, Таблице 1).

В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой или содержит ECD BCMA дикого типа или немодифицированный ECD BCMA, или его часть специфического связывания, или фрагмент, содержащий TD (например, CRD), который связывается с APRIL, BAFF и/или гетеротримером APRIL/BAFF. В некоторых вариантах осуществления BIM содержит последовательность ECD, указанную в SEQ ID NO:710, (ii) последовательность аминокислот, которая проявляет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO:710 и которая связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером APRIL/BAFF, или (iii) является фрагментом или частью (i) или (ii),

содержащей CRD, где часть связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером APRIL/BAFF. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой последовательность BCMA, которая состоит по существу или состоит из последовательности, изложенной в SEQ ID NO:710. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой последовательность BCMA, содержащую остатки 2-54 SEQ ID NO:710, в которой отсутствует N-концевой метионин, как указано в SEQ ID NO:710. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой последовательность BCMA, которая состоит по существу или состоит из последовательности, изложенной в виде аминокислот 2-54 из SEQ ID NO:710.

В некоторых вариантах осуществления BIM содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:356, (ii) последовательность аминокислот, которая проявляет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO:356, и которая связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером APRIL/BAFF, или (iii) является фрагментом или частью (i) или (ii), содержащей часть CRD, где часть связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером APRI/BAFF. В некоторых вариантах осуществления BIM содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO:356. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой последовательность BCMA, которая состоит по существу или состоит из последовательности, изложенной в SEQ ID NO:356.

В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный BCMA, содержащий ECD или его часть специфического связывания или фрагмент, имеющий vTD, содержащий одну или несколько аминокислотных замен (мутаций или замещений) относительно эталонной последовательности BCMA. Эталонная последовательность BCMA может включать любую, как описано в Разделе II выше. Одна или несколько аминокислотных замен могут включать любую из аминокислотных замен, описанных в Разделе II выше. Например, BIM может быть вариантным BCMA, содержащим ECD или его фрагмент специфического связывания, имеющий vTD, содержащий любую из аминокислотных замен, изложенных в Таблице 1. В некоторых примерах мутации осуществляют в эталонном BCMA, содержащем последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:710. В некоторых примерах мутации осуществляют в эталонном BCMA, который содержит CRD-домен BCMA. В некоторых примерах мутации осуществляют в эталонном BCMA, указанном в SEQ ID NO:356.

В некоторых вариантах осуществления BIM содержит вариантный полипептид BCMA, указанный в любой из SEQ ID NO:357-435. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид BCMA, который содержит

полипептидную последовательность, проявляющую по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 91% идентичности, по меньшей мере 92% идентичности, по меньшей мере 93% идентичности, по меньшей мере 94% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, такую как по меньшей мере 96% идентичности, 97% идентичности, 98% идентичности или 99% идентичности с любой из SEQ ID NO:357-435, и сохраняет аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены), отсутствующие в эталонном (например, немодифицированном или дикого типа) BCMA. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид BCMA, который содержит фрагмент специфического связывания любой из SEQ ID NO:357-435, где фрагмент специфического связывания связывает BAFF, APRIL или гетеротимер BAFF/APRIL и содержит непрерывную последовательность, включающую аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены), отсутствующие в эталонном (например, немодифицированном или дикого типа) BCMA.

В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид BCMA, который состоит по существу или состоит из последовательностей внеклеточного домена (ECD) вариантного BCMA, изложенных в любой из SEQ ID NO: 357-435. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид BCMA, который состоит по существу или состоит из полипептидной последовательности, которая проявляет по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 91% идентичности, по меньшей мере 92% идентичности, по меньшей мере 93% идентичности, по меньшей мере 94% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, такой как по меньшей мере 96% идентичности, 97% идентичности, 98% идентичности или 99% идентичности с любой из SEQ ID NO:357-435, и сохраняет аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены), отсутствующую в эталонном (например, немодифицированном или дикого типа) BCMA. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид BCMA, который состоит по существу или состоит из фрагмента специфического связывания любой из SEQ ID NO:357-435, где фрагмент специфического связывания связывает BAFF, APRIL или гетеротример APRIL/BAFF и содержит непрерывную последовательность, которая включает аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены), отсутствующую в эталонном (например, немодифицированном или дикого типа) BCMA.

В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид BCMA, который содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:381. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид BCMA, который состоит по существу из последовательности, указанной в SEQ ID

NO:381. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид BCMA, который состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:381.

В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид BCMA, который содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:405. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид BCMA, который состоит по существу из последовательности, указанной в SEQ ID NO:405. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид BCMA, который состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:405.

В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид BCMA, который содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:406. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид BCMA, который состоит по существу из последовательности, указанной в SEQ ID NO:406. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид BCMA, который состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:406.

В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид BCMA, который содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:410. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид BCMA, который состоит по существу из последовательности, указанной в SEQ ID NO:410. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид BCMA, который состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:410.

В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид BCMA, который содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:411. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид BCMA, который состоит по существу из последовательности, указанной в SEQ ID NO:411. В некоторых вариантах осуществления BIM представляет собой вариантный полипептид BCMA, который состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:411.

B. МОЛЕКУЛА, ИНГИБИРУЮЩАЯ Т-КЛЕТКИ (TIM)

В некоторых вариантах осуществления предлагаемый иммуномодулирующий белок содержит TIM, которая связывается с рецептором, стимулирующим Т-клетки, или с лигандом рецептора, стимулирующего Т-клетки. В некоторых аспектах рецептор, стимулирующий Т-клетки, содержит цитоплазматическую область, включающую мотив активации иммунорецептора на основе тирозина (ITAM), или цитоплазматическую область, которая взаимодействует с одним или несколькими адаптерными белками, участвующими в пути передачи сигнала в клетке, чтобы индуцировать, опосредовать или усиливать активацию Т-клетки. В одном варианте осуществления белок-адаптер содержит

связывающий домен, специфичный для остатка фосфотирозина в цитоплазматической области стимулирующего рецептора. В некоторых вариантах осуществления рецептор, стимулирующий Т-клетку, включает фрагмент комплекса TCR или является корецептором или костимулирующей молекулой, которая усиливает передачу сигналов TCR. В некоторых вариантах осуществления рецептор, стимулирующий Т-клетки, представляет собой TCR, CD3, CD4, CD8, CD28, ICOS или CD2, включая любые их ортологи у млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления мишенью рецептора, стимулирующего Т-клетки, является TCR человека, CD3 человека, CD4 человека, CD8 человека, CD28 человека, ICOS человека или CD2 человека. В некоторых вариантах осуществления рецептор, стимулирующий Т-клетки, экспрессируется на Т-клетке человека.

В некоторых вариантах осуществления TIM связывается непосредственно с рецептором, стимулирующим Т-клетки, например, непосредственно с фрагментом комплекса TCR или корецептором или костимулирующей молекулой, которая усиливает передачу сигналов TCR. В некоторых вариантах осуществления TIM связывается с TCR, CD3, CD4, CD8, CD28, ICOS или CD2, включая любые их ортологи у млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления TIM связывается с TCR человека, CD3 человека, CD4 человека, CD8 человека, CD28 человека, ICOS человека или CD2 человека.

В некоторых случаях TIM связывается с лигандом рецептора, стимулирующего Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления TIM связывается с лигандом компонента комплекса TCR или лигандом корецепторной или костимулирующей молекулы, которая усиливает передачу сигналов TCR. В некоторых вариантах осуществления TIM связывается с лигандом молекулы TCR, CD3, CD4, CD8, CD28, ICOS или CD2, включая такие молекулы, экспрессируемые на Т-клетке, например, Т-клетке человека. В некоторых вариантах осуществления TIM связывается с лигандом CD28, таким как лиганд CD28, экспрессируемый на Т-клетке, например, Т-клетке человека. В некоторых вариантах осуществления лиганд представляет собой CD80 или CD86, такой как человеческий CD80 или человеческий CD86. В некоторых вариантах лиганд экспрессируется на антигенпрезентирующих клетках.

В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с рецептором, стимулирующим Т-клетки, или связывается с лигандом рецептора, стимулирующего Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с TCR, CD3, CD4, CD8, CD28, ICOS или CD2, включая любые их ортологи у млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления антитело

или антигенсвязывающий фрагмент связывается с TCR человека, CD3 человека, CD4 человека, CD8 человека, CD28 человека, ICOS человека или CD2 человека, включая такие молекулы, экспрессируемые на Т-клетке человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с CD80 или CD86. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с человеческим CD80 или человеческим CD86, включая такие молекулы, экспрессируемые на человеческих антигенпрезентирующих клетках.

В некоторых вариантах осуществления TIM является или содержит партнера по связыванию рецептора, стимулирующего Т-клетки, или лиганда рецептора, стимулирующего Т-клетки. Среди молекул, которые могут быть использованы в качестве TIM, есть внеклеточные домены семейства белков IgSF, в частности, членов IgSF, которые являются рецепторами, стимулирующими Т-клетки, или их лигандами.

В некоторых аспектах TIM представляет собой или содержит IgD или член семейства IgSF, который связывается с рецептором, стимулирующим Т-клетки, например, связывается с TCR, CD3, CD4, CD8, CD28, ICOS или CD2, или является его специфическим фрагментом или vIgD, который связывается с рецептором, стимулирующим Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления рецептором, стимулирующим Т-клетки, является CD28 или ICOS, а TIM связывается с CD28 или ICOS. Примерные члены семейства IgSF, которые являются партнерами по связыванию или которые связываются с CD28 или ICOS, включают, например, CD80, CD86 и ICOSL, такие как человеческие CD80, CD86 или ICOSL. В некоторых примерах TIM является или содержит IgD CD80, CD86 или ICOSL дикого типа, или является или содержит их vIgD, при этом TIM специфически связывается с CD28.

В других аспектах TIM представляет собой или содержит IgD из семейства IgSF, который связывается с лигандом рецептора, стимулирующего Т-клетки, например, связывается с CD80 или CD86, или представляет собой его специфический фрагмент или vIgD, который связывается с лигандом рецептора, стимулирующего Т-клетки. Примерные члены семейства IgSF, которые являются партнерами по связыванию или которые связываются с CD80 или CD86, включают, например, CTLA-4, такой как человеческий CTLA-4. В некоторых примерах TIM является или содержит IgD CTLA-4 дикого типа, или является или содержит его vIgD, при этом TIM специфически связывается с CD80 или CD86. Примерные последовательности для включения в качестве TIM в предоставленные мультидоменные иммуномодулирующие белки включают молекулы, описанные в Международной публикации PCT № WO2019/074983.

В некоторых вариантах осуществления мультидоменный иммуномодулирующий

белок, представленный в настоящей заявке, является растворимым белком и/или не содержит части, которая включает трансмембранный домен. Специалистам в данной области техники понятно, что белки клеточной поверхности, включая белки IgSF, обычно имеют внутриклеточный домен, трансмембранный домен и внеклеточный домен (ECD), и что растворимая форма таких белков может быть получена с использованием внеклеточного домена или его иммунологически активной подпоследовательности. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления в TIM отсутствует трансмембранный домен или часть трансмембранного домена члена IgSF. В некоторых вариантах осуществления у TIM отсутствует внутриклеточный (цитоплазматический) домен или часть внутриклеточного домена члена IgSF. В некоторых вариантах осуществления TIM содержит только домен ECD или его часть, содержащую домен IgSF, такой домен IgV, или его специфические связывающие фрагменты.

Например, в некоторых аспектах TIM представляет собой или содержит ECD рецептора IgSF или его часть или фрагмент специфического связывания, содержащие по меньшей мере один IgD (например, IgV), который связывается с лигандом рецептора, стимулирующего Т-клетки. Например, TIM может содержать ECD CTLA-4 или часть или фрагмент специфического связывания CTLA-4, содержащие по меньшей мере один IgD (например, IgV), который связывается с CD80 или CD86. В некоторых вариантах осуществления TIM состоит по существу или состоит из ECD рецептора IgSF или его части или фрагмента специфического связывания, содержащего по меньшей мере один IgD (например, IgV), такой, который состоит по существу или состоит из ECD CTLA-4 или части или фрагмента специфического связывания ECD CTLA-4, который содержит IgD (например, IgV). В некоторых вариантах осуществления TIM короче полноразмерной последовательности ECD рецептора из лиганда рецептора, стимулирующего Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой или содержит только один vIgD (например, IgV), или фрагмент специфического связывания только одного vIgD (например, IgV). В некоторых вариантах осуществления TIM состоит по существу или состоит из IgV рецептора из лиганда рецептора, стимулирующего Т-клетки, например, состоит по существу или состоит только из IgV CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления последовательность TIM, содержащая ECD, или ее связывающая часть или фрагмент, содержащий IgD (например, IgV), представляет собой последовательность млекопитающих, которая включает, без ограничения указанными, человека, мышь, яванскую макаку или крысу. В некоторых вариантах осуществления последовательность TIM является человеческой и/или связывает человеческий белок.

В некоторых аспектах vIgD представляет собой модифицированный по

аффинности домен, который проявляет повышенную активность связывания, такую как повышенная аффинность связывания, для рецептора, стимулирующего Т-клетки, или лиганда рецептора, стимулирующего Т-клетки, по сравнению со связывающей активностью немодифицированного IgD или дикого типа для той же молекулы. В одном варианте осуществления TIM содержит vIgD с одной или несколькими аминокислотными заменами по сравнению с IgD семейства IgSF, например, CTLA-4, где одна или несколько аминокислотных замен придают или приводят к повышенной аффинности связывания с когнатным партнером по связыванию, который является рецептор, стимулирующий Т-клетки, или лиганд рецептора, стимулирующего Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой или включает vIgD, который содержит одну или несколько аминокислотных модификаций, таких как одна или несколько замен (альтернативно, «мутаций» или «замещений»), делеций или добавлений в IgD относительно IgD дикого типа или немодифицированного партнера по связыванию рецептора, стимулирующего Т-клетки, или лиганда рецептора, стимулирующего Т-клетки. В некоторых аспектах vIgD содержит до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных модификаций, таких как аминокислотные замены, делеции или добавления в домене IgD партнера по связыванию IgSF из рецептора, стимулирующего Т-клетки, или лиганда рецептора, стимулирующего Т-клетки. Модификации (например, замены) могут быть в домене IgV или домене IgC. В некоторых вариантах осуществления vIgD имеет до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, или 20 аминокислотных модификаций (например, замен) в IgV домене или его фрагменте специфического связывания. В некоторых вариантах осуществления vIgD имеет до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, или 20 аминокислотных модификаций (например, замен) в IgC домене или его фрагменте специфического связывания. В некоторых вариантах осуществления vIgD имеет по меньшей мере примерно 85%, 86%, 86%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичности последовательности с диким типом или немодифицированным IgD или его фрагментом специфического связывания.

Неограничивающие примеры TIM в предоставленных мультидоменных иммуномодулирующих белках описаны в следующих подразделах. Любая из описанных в настоящей заявке TIM может быть объединена с BIM, как описано в Разделе III.A.

1. Лиганд-связывающая TIM, например, CTLA-4

В настоящей заявке представлены иммуномодулирующие белки, содержащие молекулу, стимулирующую Т-клетки (TIM), которая связывается с лигандом рецептора, стимулирующего Т-клетки. В некоторых аспектах рецептором, стимулирующим Т-клетки,

является CD28, например, человеческий CD28, и/или лигандом рецептора, стимулирующего Т-клетки, является CD80 или CD86, например, человеческий CD80 или человеческий CD86. В некоторых вариантах осуществления TIM из иммуномодулирующего белка связывается с внеклеточной частью или эктодоменом CD80 или CD86. В некоторых вариантах осуществления TIM связывается с CD80 или CD86 на поверхности клетки, например, на поверхности антигенпрезентирующих клеток.

В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой антитело, которое связывает CD80 или CD86, или представляет собой его антигенсвязывающий фрагмент (например, Fab или scFv). В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела связывает человеческий CD80 или человеческий CD86. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (например, scFv), содержащий VH и VL антитела против CD80, или антигенсвязывающего фрагмента, или антитела против CD86 или антигенсвязывающего фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой или содержит IgD (например, IgV) или его фрагмент специфического связывания, такой как немодифицированный IgD или IgD дикого типа, или vIgD или его фрагмент специфического связывания, член семейства IgSF, который связывает CD80 или CD86, такой как человеческий CD80 или человеческий CD86. В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой или содержит один или несколько IgD, который представляет собой IgD, или его vIgD, из полипептида CTLA-4, такого как CTLA-4 дикого типа, например, CTLA-4 человека. В некоторых аспектах TIM содержит один или несколько IgD (например, IgV), который представляет собой vIgD, содержащий одну или несколько аминокислотных модификаций (например, замены, делеции или добавления) по сравнению с IgD из дикого типа или немодифицированного CTLA-4, которые, в некоторых аспектах, приводят к повышенному связыванию TIM с CD80 или CD86. Описаны примерные IgD или vIgD партнеров по связыванию CTLA-4 для включения в качестве TIM в предоставленные иммуномодулирующие белки. В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой или содержит полипептид vIgD, который проявляет повышенную активность связывания, такую как аффинность связывания, с CD80 или CD86, по сравнению с соответствующим IgD дикого типа или немодифицированным IgD. Примерные IgD или vIgD CTLA-4 для использования в качестве TIM в предоставленных мультидоменных иммуномодулирующих белках включают молекулы, описанные в Международной публикации PCT № WO2019/074983.

CTLA-4 использовали в качестве терапевтического препарата для лечения

аутоиммунных заболеваний путем ослабления активации Т-клеток посредством модуляции взаимодействий CD80 и/или CD86. В частности, абатацепт и белатацепт являются одобренными FDA терапевтическими препаратами для применения при ревматоидном артрите и при трансплантации, соответственно. Абатацепт представляет собой домен IgSF CTLA-4 дикого типа, гибридизованный с Fc-частью антитела. Последовательность CTLA-4 части абатацепта изложена в SEQ ID NO:1. Белатацепт представляет собой модифицированный вариант домена IgSF CTLA-4, содержащий замену аланина на тирозин в положении 31 и глутаминовой кислоты на лейцин в положении 106 (A31Y/L106E), соответствующую положениям 31 и 106 эталонной последовательности ECD CTLA-4 дикого типа, изложенной в SEQ ID NO:1, для обеспечения повышенной аффинности к лигандам CD80 и CD86 (Kremer et al., N Engl J Med. 2003;349(20):1907-1915; Larsen et al, Am J Transplant. 2005;5(3):443-453). Последовательность CTLA-4 части белатацепта указана в SEQ ID NO:672.

В некоторых вариантах осуществления TIM не является полноразмерной последовательностью CTLA-4. В некоторых аспектах TIM является растворимым полипептидом, не экспрессируется на мембранах и/или не имеет трансмембранного и/или цитоплазматического домена CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления TIM содержит только внеклеточный домен (ECD) или его фрагмент специфического связывания, содержащий IgD или vIgD, такой, который содержит только домен IgV или домен IgC или его фрагмент специфического связывания, или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой или содержит последовательность ECD, указанную в SEQ ID NO:1, или является ее фрагментом специфического связывания. В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой или содержит последовательность ECD, указанную в SEQ ID NO:2, или является ее фрагментом специфического связывания. В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой или содержит последовательность IgD (например, IgV) CTLA-4, такого как CTLA-4 человека. В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой или содержит последовательность IgD (например, IgV), указанную в SEQ ID NO:191, или является ее фрагментом специфического связывания.

KAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAAT YMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYYLGIGNGT QIYVIDPEPCPDSD (SEQ ID NO:1)

KAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAAT YMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYYLGIGNGT QIYVIDPEPCPDSDQ (SEQ ID NO:2)

HVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMM GNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYY (SEQ ID NO:191)

В некоторых вариантах осуществления TIM содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:1, (ii) последовательность аминокислот, которая проявляет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO:1 и которая связывается с CD80 или CD86, или (iii) является фрагментом или частью (i) или (ii), содержащей IgD (например, IgV), где часть связывается с CD80 или CD86. В некоторых вариантах осуществления TIM содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой последовательность CTLA-4, которая состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:1.

В некоторых вариантах осуществления TIM содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:2, (ii) последовательность аминокислот, которая проявляет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO:2, и которая связывается с CD80 или CD86, или (iii) является фрагментом или частью (i) или (ii), содержащей IgD (например, IgV), где часть связывается с CD80 или CD86. В некоторых вариантах осуществления TIM содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой последовательность CTLA-4, которая состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:2.

В некоторых вариантах осуществления TIM содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:191, (ii) последовательность аминокислот, которая проявляет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO:191, и которая связывается с CD80 или CD86, или (iii) является фрагментом или частью (i) или (ii), содержащей IgD (например, IgV), где часть связывается с CD80 или CD86. В некоторых вариантах осуществления TIM содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:191. В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой последовательность CTLA-4, которая состоит по существу или состоит из последовательности, изложенной в SEQ ID NO:191.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок включает TIM, который является или содержит vIgD, включающий одну или несколько

аминокислотных модификаций, например, замен, в IgD из дикого типа или немодифицированного CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления модификации, представленные в настоящей заявке, могут быть в TIM, содержащей немодфицированный IgD, указанный в SEQ ID NO:1, 2 или 191, или в последовательности, которая имеет 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO:1, 2 или 191. В некоторых вариантах осуществления TIM, содержащая vIgD CTLA-4, имеет по меньшей мере примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичности с последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO:1, 2 или 191.

В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой или содержит vIgD, который представляет собой модифицированный по аффинности домен IgSF, который обладает повышенной активностью связывания, такой как аффинность связывания, для CD80 или CD86, относительно активности связывания для дикого типа или немодифицированного IgD с CD80 или CD86. В некоторых вариантах осуществления увеличение связывающей активности, например, аффинности связывания, для CD80 или CD86 повышается по меньшей мере примерно на 5%, например, по меньшей мере примерно на 10%, 15%, 20%, 25%, 35%, 50%, 75%, 100%, 200% или более. В некоторых вариантах осуществления увеличение связывающей активности, например, аффинности связывания осуществляется более чем в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, или в 50 раз. В таких примерах IgD дикого типа или немодифицированный IgD имеет ту же последовательность, что и vIgD, за исключением того, что он не содержит одной или нескольких аминокислотных модификаций (например, замен).

В некоторых вариантах осуществления равновесная константа диссоциации (K_d) TIM с CD80 или CD86 может составлять менее чем 1×10^{-5} M, 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M или 1×10^{-11} M, или 1×10^{-12} M, или менее. В некоторых вариантах осуществления TIM связывается с CD80 или CD86 с K_d точно или примерно от 100 пМ до 5000 пМ, от 100 пМ до 2000 пМ, от 100 пМ до 1500 пМ, от 100 пМ до 1000 пМ, от 100 пМ до 800 пМ, от 100 пМ до 500 пМ, от 100 пМ до 400 пМ, от 400 пМ до 4000 пМ, от 400 пМ до 2000 пМ, от 400 пМ до 1500 пМ, от 400 пМ до 1000 пМ, от 400 пМ до 800 пМ, от 400 пМ до 500 пМ, от 500 пМ до 5000 пМ, от 500 пМ до 2000 пМ, от 500 пМ до 1500 пМ, от 500 пМ до 1000 пМ, от 500 пМ до 800 пМ, от 800 пМ до 5000 пМ, от 800 пМ до 2000 пМ, от 800 пМ до 1500 пМ, от 800 пМ до 1000 пМ, от 1000 пМ до 5000 пМ, от 1000 пМ до 2000 пМ, от 1000 пМ до 1500 пМ, от 1500 пМ до 5000 пМ, от 1500 до 2000 пМ, от 2000 пМ до 50000 пМ. В некоторых вариантах осуществления TIM связывается с CD80 или

CD86 с K_d менее 200 пМ, 300 пМ, 400 пМ, 500 пМ. В некоторых вариантах осуществления TIM связывается с CD80 или CD86 с K_d более чем или более чем примерно 500 пМ, но менее чем или менее чем примерно 2000 пМ, например, точно или примерно от 500 пМ до 1500 пМ, от 500 пМ до 1250 пМ, от 500 пМ до 1000 пМ, от 500 пМ до 750 пМ, от 750 пМ до 1500 пМ, от 750 пМ до 1250 пМ, от 750 пМ до 1000 пМ, от 1000 пМ до 2000 пМ, от 1000 пМ до 1500 пМ или от 1500 пМ до 2000 пМ.

Если не указано иное, аминокислотная модификация (модификации), присутствующая в vIgD ECD CTLA-4 или его IgD (например, IgV), обозначается номером аминокислотного положения, соответствующим нумерации положений немодифицированной последовательности ECD, указанной в SEQ ID NO:1 или 2. Специалист в данной области техники может идентифицировать соответствующее положение модификации, например, аминокислотной замены, в ECD или его части, содержащей домен IgSF (например, IgV), например, путем выравнивания эталонной последовательности с SEQ ID NO:1 или 2. В перечне модификаций по всему настоящему раскрытию положение аминокислоты указано в середине, при этом соответствующая немодифицированная (например, дикого типа) аминокислота указана перед номером, а идентифицированный вариант аминокислотной замены указан после номера. Если модификация представляет собой делецию положения, указывается «del», а если модификация представляет собой вставку в положение, указывается «ins». В некоторых случаях вставка указана с положением аминокислоты, указанным в середине, с соответствующим неизмененной (например, дикого типа) аминокислотой, указанной до и после номера, и идентифицированной вставкой вариантной аминокислоты, указанной после немодифицированной (например, дикого типа) аминокислоты.

В некоторых вариантах осуществления TIM содержит vIgD, который имеет до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, или 20 аминокислотных модификаций, например, замен. Одна или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, могут находиться в эктодомене (внеклеточном домене) дикого типа или немодифицированного CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, находится в домене ECD CTLA-4 или его фрагменте специфического связывания. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, находится в домене IgV CTLA-4 или его фрагменте специфического связывания. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, находится в IgC-домене CTLA-4 или его фрагменте специфического связывания. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных

модификаций, например, замен, находится в домене IgV CTLA-4 или его фрагменте специфического связывания, и в домене IgC или доменах CTLA-4 или его фрагменте специфического связывания.

В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой или содержит vIgD, который имеет одну или несколько аминомодификаций, например, замен, в немодифицированном IgD CTLA-4 или его фрагменте специфического связывания, соответствующих положению (положениям) 6, 10, 12, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 33, 35, 37, 38, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 63, 64, 65, 67, 69, 71, 72, 73, 75, 76, 82, 85, 86, 87, 89, 91, 93, 95, 96, 97, 98, 99, 105, 106, 108, 110, 113, 115, 116, 117, I18, 119, 120, 121, 122, 124, 125 и/или 126 со ссылкой на положения, указанные в SEQ ID NO:1.

В некоторых вариантах осуществления TIM содержит vIgD, который имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, в немодифицированном CTLA-4 или его фрагменте специфического связывания, соответствующих положению (положениям) 12, 18, 26, 29, 31, 53, 56, 58, 63, 72, 98, 99, 105, 106 и/или 117 со ссылкой на положения, указанные в SEQ ID NO:1 или 2. В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой или содержит vIgD CTLA-4, который имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, выбранных из L12F, L12H, L12P, I18A, I18F, I18N, I18T, I18V, A26D, A26S, A26T, G29R, G29W, A31Y, T53S, M56K, M56L, M56R, M56T, M56V, N58D, N58S, L63H, L63P, S72G, S72T, L98Q, L98R, M99I, M99L, Y105F, Y105L, L106E, L106I, L106R, I117E, I117L, I117M и/или I117T, или их консервативной аминокислотной замены.

В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой или содержит vIgD CTLA-4, который имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, выбранных из A6T, V10A, L12F, L12H, L12I, L12P, S14N, S15P, R16C, R16G, R16H, I18A, I18F, I18N, I18T, I18V, A19V, S20N, V22A, V22I, E24Q, A26D, A26S, A26T, S27P, P28L, G29R, G29W, K30R, A31Y, E33M, E33V, R35K, T37S, V38I, Q41L, A42S, A42T, A42V, D43N, Q45H, V46E, T47A, E48R, T53S, Y54F, M55R, M55T, M55V, M56K, M56L, M56R, M56T, M56V, N58D, N58S, E59D, E59G, T61A, T61I, T61N, T61R, T61S, L63H, L63P, D64E, D64N, D64V, D65G, I67N, I67T, I67V, T69A, T69I, T69S, T71A, T71I, S72G, S72T, S73R, N75D, Q76R, Q82H, Q82R, R85G, A86T, M87A, M87K, M87T, M87V, T89A, T89M, T89S, L91R, I93L, I93V, K95R, V96I, E97Q, L98Q, L98R, M99I, M99L, Y105F, Y105L, L106E, L106I, L106N, L106R, L106V, I108F, I108V, N110K, N110S, N110Y, Q113H, Y115H, Y115N, V116A, I117E, I117K, I117L, I117M, I117T, P119H, E120D, P121S, C122P, D124P, D124I, S125I, S125P, D126P и/или D126T, или их консервативной аминокислотной замены. В некоторых

вариантах осуществления TIM представляет собой или содержит vIgD, который имеет одну или несколько аминокислотных модификаций из L12F, L12H, L12I, L12P, I18A, I18F, I18N, I18T, I18V, A26D, A26S, A26T, G29R, G29W, E33M, E33V, T53S, M55R, M55T, M55V, M56K, M56L, M56R, M56T, M56V, N58D, N58S, L63H, L63P, S72G, S72T, M87A, M87K, M87T, M87V, L98Q, L98R, M99I, M99L, Y105F, Y105L, L106I, L106N, L106R, L106V, I117E, I117K, I117L, I117M и/или I117T, или их консервативной аминокислотной замены. В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой или содержит vIgD, который имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, выбранных из I12F, L12P, I18T, A26T, G29W, T53S, M55T, M56K, M56T, N58S, S72G, M99L, L63P, L98Q, Y105L, L106I и/или I117L, или их консервативной аминокислотной замены. В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой или содержит vIgD, имеющий одну или несколько аминокислотных модификаций, выбранных из L12P, I18T, A26T, G29W, A31Y, T53S, M55T, M56K, N58S, S72G, M99L, L63P, L98Q, Y105L, L106E, L106I и/или I117L, или их консервативной аминокислотной замены. В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой или содержит vIgD, который имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, выбранных из A26T, G29W, L63P, S72G, L98Q, M99L, Y105L и/или L106I, или их консервативной аминокислотной замены.

В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой или содержит vIgD, который имеет две или более аминокислотных модификаций, выбранных из A6T, V10A, L12F, L12H, L12I, L12P, S14N, S15P, R16C, R16G, R16H, I18A, I18F, I18N, I18T, I18V, A19V, S20N, V22A, V22I, E24Q, A26D, A26S, A26T, S27P, P28L, G29R, G29W, K30R, A31Y, E33M, E33V, R35K, T37S, V38I, Q41L, A42S, A42T, A42V, D43N, Q45H, V46E, T47A, E48R, T53S, Y54F, M55R, M55T, M55V, M56K, M56L, M56R, M56T, M56V, N58D, N58S, E59D, E59G, T61A, T61I, T61N, T61R, T61S, L63H, L63P, D64E, D64N, D64V, D65G, I67N, I67T, I67V, T69A, T69I, T69S, T71A, T71I, S72G, S72T, S73R, N75D, Q76R, Q82H, Q82R, R85G, A86T, M87A, M87K, M87T, M87V, T89A, T89M, T89S, L91R, I93L, I93V, K95R, V96I, E97Q, L98Q, L98R, M99I, M99L, Y105F, Y105L, L106E, L106I, L106N, L106R,L106V, I108F, I108V, N110K, N110S, N110Y, Q113H, Y115H, Y115N, V116A, I117E, I117K, I117L, I117M, I117T, P119H, E120D, P121S, C122P, D124P, D124I, S125I, S125P, D126P и/или D126T.

В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой или содержит vIgD CTLA-4, который имеет аминокислотную замену в немодифицированном полипептиде CTLA-4 или полипептиде дикого типа или его фрагменте специфического связывания, соответствующую A26T, G29W, T53S, L63P, S72G, L98Q, M99L, Y105L и/или L106I. В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой или содержит vIgD CTLA-4,

который включает аминокислотные замены A26T/G29W, A26T/T53S, A26T/L63P, A26T/S72G, A26T/L98Q, A26T/M99L, A26T/Y105L, A26T/L106I, A26T/G29W, G29W/T53S, G29W/L63P, G29W/S72G, G29W/L98Q, G29W/M99L, G29W/Y105L, G29W/L106I, A26T/T53S, G29W/T53S, T53S/L63P, T53S/S72G, T53S/L98Q, T53S/M99L, T53S/Y105L, or T53S/L106I, A26T/L63P, G29W/L63P, T53S/L63P, L63P/S72G, L63P/L98Q, L63P/M99L, L63P/Y105L, or L63P/L106I, A26T/S72G, G29W/S72G, T53S/S72G, L63P/S72G, S72G/L98Q, S72G/M99L, S72G/Y105L or S72G/L106I, A26T/L98Q, G29W/L98Q, T53S/L98Q, L63P/L98Q, S72G/L98Q, L98Q/M99L, L98Q/Y105L or L98Q/L106I, A26T/M99L, G29W/M99L, T53S/M99L, L63P/M99L, S72G/M99L, L98Q/M99L, M99L/Y105L, M99L/L106I, A26T/Y105L, G29W/Y105L, T53S/Y105L, L63P/Y105L, S72G/Y105L, L98Q/Y105L, M99L/Y105L, Y105L/L106I, A26T/L106I, G29W/L106I, T53S/L106IL63P/L106I, S72G/L106I, L98Q/L106I, M99L/L106I, Y105L/L106I. Вариантный полипептид CTLA-4 может включать дополнительные аминокислотные модификации (например, замены), такие как любые, описанные в настоящей заявке, в соответствии с предоставленными вариантами осуществления.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная модификация (модификации), например, замена (замены), представляет собой A31Y/L106E, A6T/A26T/M55T/M99L/Y105L, V10A/G29W/T53S/M56K/L63P/L98Q/Y105L/P121S, V10A/L63P/D64V/S72G/L98Q/M99L/Y105L, V10A/L63P/L98Q/Y105L, L12F/R16H/G29W/M56T/L98Q/Y105L, L12F/A26T/L63P/L98Q/Y105L/L106R, L12F/K30R/S72G/Q82R/L98Q/M99L/Y105L, L12H/I18V/A42T/M55T/N58D/L98R/Y105L/L106I/P121S, L12H/E33M/L98Q/Y105L, L12H/M55T/E59D/L63P/M99L, L12H/L63P/S72G/L98Q/Y105L, L12I/M55T/M56V/I67T/M99L/L106R/I108F, L12P/R16H/A26T/T61S/L63P/M87V/L98Q/M99L/Y105L/L106I/I117L, L12P/I18T/A26T/M55T/T69S/S72G/M99L/Y105L, L12P/A26T, L12P/A26T/L63P, L12P/A26T/L63P/S72G/T89M/L98Q/M99L/Y105L, L12P/G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L, L12P/G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106I, L12P/A26T/L63P/L98Q/M99L/Y105L, L12P/A26T/L63P/L98Q/Y105L, L12P/A26T/L63P/L98Q/Y105L/L106I, L12P/G29W/D43N/N58S/L63P/L98Q/M99L/Y105L, L12P/M56V/L63P/V96I/L98Q/M99L/Y105L/Y115H, L12P/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L, L12P/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L/L106N, L12P/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L/L106N/I117L, S14N/R16C/I18T/M56K/T61A/L63P/A86T/M99L, S15P/I18V/M56T/L98Q/M99L/Y105L, R16C/G29W/E33V/M55T/L63P/L98Q/Y105L, I18A/L63P/S72G/L98Q/Y105L,

I18F/L63P/L98Q/M99L/Y105L/P121S, I18N/A26T/L63H/T89A/L98Q/M99L/Y105L, I18N/L63P/S72T/M87T/L98Q/Y105L/N110S, I18T/A26S/M55T/M56V/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L/I117K, I18T/A26T/L63P/S72G/L98Q/Y105L, I18T/A26T/L63P/Q82R/L98Q/Y105L, I18T/G29R/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L, I18T/G29W/L63P/L98Q/Y105L, I18T/E48R/L63P/T69S/L98Q/Y105L/N110Y, I18T/T61R/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L, I18T/L63P/S72G/M87K/L98Q/M99L/Y105L, I18T/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L, I18T/L63P/S72G/L98Q/Y105L/I108V, I18V/A26T/L63P/D64E/L98Q/Y105L/L106R/N110K, I18V/G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L, A19V/G29W/R35K/L63P/L98Q/M99L/Y105L, S20N/A26T/L63P/L98Q/M99L/Y105L, V22A/L63P/L98Q/M99L/Y105L/P119H, V22I/L63P/L98Q/Y105L/I117M, E24Q/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L, A26D/S72G/L98Q/M99L/Y105L, A26T/A42V/Q45H/I67N/M87K/E97Q/M99L, A26T/V46E/L63P/D65G/L98Q, A26T/T47A/M56K/L63P/S72G/Q82R/L98Q/M99L/Y105L, A26T/T53S/M56K/L63P/L98Q/Y105L, A26T/T53S/L63P/L98Q/Y105L/L106I/I117L, A26T/Y54F/M56K/M99L/Y105L, A26T/M55R/L98Q/M99L/Y105L, A26T/M55T/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L, A26T/M55T/L63P/L98Q/M99L/Y105L, A26T/L63P/D65G/L98Q/M99L/Y105L, A26T/L63P/M87V/N110K/I117E, A26T/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L, A26T/L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106I/I117L, A26T/L63P/L98Q/M99L/Y105L, A26T/I67N/S72G/L98Q/M99L/Y105L, S27P/M56K/L63P/S72G/S73R/T89A/M99L/Y105L/I117M, P28L/E33V/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L, P28L/E33V/L63P/S72G/L98R/M99L/Y105L, G29W/T53S/M56K/N58S/L63P/M87V/L98Q/Y105L, G29W/T53S/M56K/N58S/L63P/M87V/L98Q/Y105L/I108V, G29W/T53S/M56K/N58S/L63P/M87V/L98Q/Y105L/P121S, G29W/T53S/M56K/T61N/L63P/L98Q/Y105L, G29W/T53S/M56K/L63P/Q82H/L98Q/M99I/Y105L, G29W/T53S/M56K/L63P/L98Q/Y105L, G29W/T53S/L63P/S72G/L98Q/Y105L, G29W/M55V/E59G/L63P/L98Q/Y105L, G29W/M56T/L63P/L98Q/Y105L/L106I/I117L, G29W/N58D/I67V/L98Q/M99L/Y105L, G29W/N58S/L63P/D64N/L98Q/M99L/Y105L, G29W/N58S/L63P/T69I/L98Q/M99L/Y105L, G29W/N58S/L63P/S72G/L98Q/Y105L, G29W/N58S/L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106I, G29W/N58S/L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106V, G29W/N58S/L63P/S72G/M87V/L98Q/Y105L, G29W/N58S/L63P/Q82R/L98Q/Y105L, G29W/N58S/L63P/M87T/L98Q/M99L/Y105L, G29W/N58S/L63P/L98Q/Y105L, G29W/E59G/L63P/L98Q/Y105L, G29W/T61I/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L, G29W/L63P/D65G/S72G/L98Q/Y105L, G29W/L63P/I67V/S72G/L98Q/Y105L, G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106I,

G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106I/I117L, G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L/I117L, G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L/P121S,G29W/L63P/L98Q/M99L/Y105L, G29W/S72G/Q76R/L98Q/Y105L/L106I/Q113H, G29W/M87K/T89S/L98Q/M99L/Y105L/I108V/I117L, G29W/M87K/I93V/L98Q/M99L/Y105L, G29W/L98Q/M99L/Y105L, E33M/A42T/L98Q/Y105L, E33M/L63P/S72G/L98Q/Y105L, E33M/L63P/S72G/L98Q/Y105L/I108F, E33M/L63P/S72G/L98Q/Y105L/I117L, E33M/Q82H/L98Q/M99L/Y105L, E33V/A42S/M55T/L98Q/M99L/Y105L, T37S/M56V/L98Q/Y105L, V38I/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L, Q41L/Y54F/M56K/M99L/I108F, T53S/M56V/L98Q/Y105L, M55T/L63P/T71I/M99L/Y105L, M55T/S72G/L98Q/M99L/Y105L, M55T/E97Q/M99L/Y105F, M56K/L63P/N75D/V96I/M99L/Y105L/L106I, M56L/L63P/L98Q/Y105L/L106I/I117L, M56R/L63P/L98Q/M99L/Y105L, M56T/L91R/L98Q/Y105L, M56V/E59G/L63P/S72G/M87K/I93V/L98Q/M99L/Y105L/I117E, T61A/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L, L63P/T69A/L98Q/M99L/Y105L/L106R/V116A, L63P/S72G/M87A/L98Q/Y105L, L63P/S72G/I93L/L98Q/M99L/Y105L, L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L, L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L/L106I/I117L, L63P/S72G/L98Q/Y105L, L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106I/I117L, L63P/S72G/Y105L, L63P/M87K/M99L/L106R, L63P/Q82H/L98Q/M99L/Y105L, L63P/K95R, L63P/L98Q, L63P/L98Q/M99L/Y105L, L63P/L98Q/M99L/Y105L/L106I, L63P/L98Q/M99L/Y105L/I108V, L63P/L98Q/M99L/Y105L/I117M, L63P/L98Q/Y105L, L63P/L98Q/V116A, L63P/L98R/N110K, L63P/M99L/Y105L/I108F, I67V/S72G/Q82H/T89A/L98Q/M99L/Y105L, S72G/R85G/L98Q/M99L/Y105L/L106I, S72G/L98Q/M99L/Y105L/I117T, L98Q/M99L/Y105L, L98Q/M99L/Y105L/L106I/I117T, L98Q/M99L/Y105L/L106I/Y115N, L98Q/Y105L и L98R/N110K.

В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой или содержит vIgD CTLA-4, который дополнительно включает аминокислотные модификации C122S со ссылкой на положения, указанные в SEQ ID NO:1 или 2.

В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой или содержит vIgD CTLA-4, который включает аминокислотные модификации C122S со ссылкой на положения, указанные в SEQ ID NO:1 или 2. В некоторых вариантах осуществления TIM имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:668.

В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой или содержит IgD (например, IgV) CTLA-4 дикого типа, указанный в Таблице 3, или его vIgD, содержащий любую из модификаций (например, замен), перечисленных в Таблице 3. В Таблице 3

также приведены примерные последовательности со ссылкой на SEQ ID NO для внеклеточного домена (ECD) или домена IgV CTLA-4. Как указано, точный локус или остатки, соответствующие данному домену, могут варьировать, например, в зависимости от методов, используемых для идентификации или классификации домена. Также, в некоторых случаях, соседние N- и/или C-концевые аминокислоты данного домена (например, IgV) также могут быть включены в последовательность TIM, например, для обеспечения надлежащего фолдинга домена при экспрессии. Таким образом, понятно, что примеры SEQ ID NO в Таблице 3 не следует толковать как ограничивающие. Например, конкретный домен, такой как домен IgV, вариантного полипептида CTLA-4 может быть на несколько аминокислот длиннее или короче, например, на 1-10, например, на 1, 2, 3, 4, 5, 6 или на 7 аминокислот длиннее или короче, чем аминокислотная последовательность, указанная в соответствующем SEQ ID NO.

В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой или содержит вариант ECD CTLA-4, указанный в любой из SEQ ID NO:3-190. В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой или содержит последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 91% идентичности, по меньшей мере 92% идентичности, по меньшей мере 93% идентичности, по меньшей мере 94% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, такую как по меньшей мере 96% идентичности, 97% идентичности, 98% идентичности или 99% идентичности с любой из SEQ ID NO:3-190, и содержит аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены), отсутствующую в диком типе или немодифицированном CTLA-4, например, отсутствующую в SEQ ID NO:1 или 2. В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой или содержит фрагмент специфического связывания любой из последовательностей ECD, изложенных в любом из SEQ ID NO:3-190, и который содержит аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены), отсутствующую в диком типе или немодифицированном CTLA-4, например, отсутствующую в SEQ ID NO:1 или 2.

В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой или содержит вариантную последовательность IgV, изложенную в любой из SEQ ID NO:192-355. В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой или содержит последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 91% идентичности, по меньшей мере 92% идентичности, по меньшей мере 93% идентичности, по меньшей мере 94% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, такую как по меньшей мере 96% идентичности, 97% идентичности, 98% идентичности или 99% идентичности с любой из последовательностей IgV, изложенных в

любой из SEQ ID NO:192-355, и содержит аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены), отсутствующую в диком типе или немодифицированном CTLA-4, например, отсутствующую в SEQ ID NO:191. В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой фрагмент специфического связывания любой из последовательностей IgV, указанных в любой из SEQ ID NO:192-355, и который содержит аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены), отсутствующую в диком типе или немодифицированном CTLA-4, например, указанную в SEQ ID NO:191.

В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой вариантный полипептид CTLA-4, который содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:92. В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой вариантный полипептид CTLA-4, который состоит по существу из последовательности, указанной в SEQ ID NO:92. В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой вариантный полипептид CTLA-4, который состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:92.

В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой вариантный полипептид CTLA-4, который содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:113. В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой вариантный полипептид CTLA-4, который состоит по существу из последовательности, указанной в SEQ ID NO:113. В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой вариантный полипептид CTLA-4, который состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:113.

В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой вариантный полипептид CTLA-4, который содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:165. В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой вариантный полипептид CTLA-4, который состоит по существу из последовательности, указанной в SEQ ID NO:165. В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой вариантный полипептид CTLA-4, который состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:165.

В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой вариантный полипептид CTLA-4, который содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:186. В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой вариантный полипептид CTLA-4, который состоит по существу из последовательности, указанной в SEQ ID NO:186. В некоторых вариантах осуществления TIM представляет собой вариантный полипептид CTLA-4, который состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:186.

ТАБЛИЦА 3: Примерный вариант TIM CTLA-4, содержащих IgD или vIgD		
Мутация (мутации)	**ECD SEQ ID NO**	**IgV SEQ ID NO**
Дикий тип	1,2	191
C122S	668	
L12P/A26T/L63P/L98Q/Y105L	3	192
L63P/L98R/N110K	4	193
L12P/A26T	5	194
L12P/A26T/L63P	6	195
L63P/L98Q/Y105L	7	196
L98Q/Y105L	8	197
L63P	9	198
L98R/N110K	10	199
L12P/A26T/L63P/L98Q/M99L/Y105L	11	200
E33M/Q82H/L98Q/M99L/Y105L	12	201
L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	13	202
S14N/R16C/I18T/M56K/T61A/L63P/A86T/M99L	14	203
S27P/M56K/L63P/S72G/S73R/T89A/M99L/Y105L/I117M	15	204
M56K/L63P/N75D/V96I/M99L/Y105L/L106I	16	205
L63P/S72G/Y105L	17	206
L63P/L98Q/M99L/Y105L/I117M	18	207
L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L/L106I/I117L	19	202
A26T/L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106I/I117L	20	208
L63P/L98Q/V116A	21	209
G29W/L98Q/M99L/Y105L	22	210
T37S/M56V/L98Q/Y105L	23	211
A26T/Y54F/M56K/M99L/Y105L	24	212
L12P/I18T/A26T/M55T/T69S/S72G/M99L/Y105L	25	213
V22I/L63P/L98Q/Y105L/I117M	26	214
A26T/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	27	215
E33M/A42T/L98Q/Y105L	28	216
M55T/E97Q/M99L/Y105F	29	217
M55T/S72G/L98Q/M99L/Y105L	30	218
R16C/G29W/E33V/M55T/L63P/L98Q/Y105L	31	219
L12P/A26T/L63P/L98Q/Y105L/L106I	32	192
M56L/L63P/L98Q/Y105L/L106I/I117L	33	220
S15P/I18V/M56T/L98Q/M99L/Y105L	34	221
I18T/G29W/L63P/L98Q/Y105L	35	222
L63P/Q82H/L98Q/M99L/Y105L	36	223
L98Q/M99L/Y105L/L106I/I117T	37	224
L98Q/M99L/Y105L/L106I/Y115N	38	224
M55T/L63P/T71I/M99L/Y105L	39	225
A26T/T53S/M56K/L63P/L98Q/Y105L	40	226
I18T/A26T/L63P/Q82R/L98Q/Y105L	41	227
L12H/M55T/E59D/L63P/M99L	42	228
I18T/L63P/S72G/L98Q/Y105L/I108V	43	229
I18T/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	44	230
T61A/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	45	231
V38I/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	46	232

ТАБЛИЦА 3: Примерный вариант TIM CTLA-4, содержащих IgD или vIgD		
Мутация (мутации)	**ECD SEQ ID NO**	**IgV SEQ ID NO**
L63P/S72G/I93L/L98Q/M99L/Y105L	47	233
L12I/M55T/M56V/I67T/M99L/L106R/I108F	48	234
I18N/A26T/L63H/T89A/L98Q/M99L/Y105L	49	235
I18T/E48R/L63P/T69S/L98Q/Y105L/N110Y	50	236
I18N/L63P/S72T/M87T/L98Q/Y105L/N110S	51	237
G29W/M56T/L63P/L98Q/Y105L/L106I/I117L	52	238
G29W/N58S/L63P/M87T/L98Q/M99L/Y105L	53	239
G29W/N58S/L63P/D64N/L98Q/M99L/Y105L	54	240
I18T/L63P/S72G/M87K/L98Q/M99L/Y105L	55	241
M56V	56	242
L63P/K95R	57	243
L63P/L98Q	58	209
L98Q/M99L/Y105L	59	224
L63P/M87K/M99L/L106R	60	244
L63P/M99L/Y105L/I108F	61	245
V10A/L63P/L98Q/Y105L	62	246
M56T/L91R/L98Q/Y105L	63	247
A26T/L63P/M87V/N110K/I117E	64	248
G29W/L63P/L98Q/M99L/Y105L	65	249
A26T/V46E/L63P/D65G/L98Q	66	250
G29W/N58S/L63P/L98Q/Y105L	67	251
G29W/E59G/L63P/L98Q/Y105L	68	252
L12H/L63P/S72G/L98Q/Y105L	69	253
A6T/A26T/M55T/M99L/Y105L	70	254
A26T/L63P/D65G/L98Q/M99L/Y105L	71	255
V10A/L63P/D64V/S72G/L98Q/M99L/Y105L	72	256
L12P/G29W/D43N/N58S/L63P/L98Q/M99L/Y105L	73	257
I18V/A26T/L63P/D64E/L98Q/Y105L/L106R/N110K	74	258
A19V/G29W/R35K/L63P/L98Q/M99L/Y105L	75	259
L12P/A26T/L63P/S72G/T89M/L98Q/M99L/Y105L	76	260
P28L/E33V/L63P/S72G/L98R/M99L/Y105L	77	261
E24Q/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	78	262
I18T/G29R/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	79	263
L63P/L98Q/M99L/Y105L	80	207
Q41L/Y54F/M56K/M99L/I108F	81	264
S72G/L98Q/M99L/Y105L/I117T	82	265
M56R/L63P/L98Q/M99L/Y105L	83	266
E33M/L63P/S72G/L98Q/Y105L	84	267
L63P/L98Q/M99L/Y105L/L106I	85	207
A26T/M55R/L98Q/M99L/Y105L	86	268
L63P/S72G/M87A/L98Q/Y105L	87	269
A26D/S72G/L98Q/M99L/Y105L	88	270
V22A/L63P/L98Q/M99L/Y105L/P119H	89	271
A26T/M55T/L63P/L98Q/M99L/Y105L	90	272
E33V/A42S/M55T/L98Q/M99L/Y105L	91	273
G29W/N58S/L63P/Q82R/L98Q/Y105L	92	274

ТАБЛИЦА 3: Примерный вариант TIM CTLA-4, содержащих IgD или vIgD		
Мутация (мутации)	**ECD SEQ ID NO**	**IgV SEQ ID NO**
E33M/L63P/S72G/L98Q/Y105L/I117L	93	267
A26T/I67N/S72G/L98Q/M99L/Y105L	94	275
L12F/A26T/L63P/L98Q/Y105L/L106R	95	276
S20N/A26T/L63P/L98Q/M99L/Y105L	96	277
G29W/T61I/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	97	278
G29W/N58S/L63P/T69I/L98Q/M99L/Y105L	98	279
L12P/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L/L106N	99	280
L63P/T69A/L98Q/M99L/Y105L/L106R/V116A	100	281
G29W/N58S/L63P/S72G/L98Q/Y105L	101	282
G29W/L63P/D65G/S72G/L98Q/Y105L	102	283
T53S/M56V/L98Q/Y105L	103	284
L63P/S72G/L98Q/Y105L	104	285
I18A/L63P/S72G/L98Q/Y105L	105	286
G29W/T53S/M56K/L63P/L98Q/Y105L	106	287
I18V/G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L	107	288
G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106I	108	289
G29W/L63P/I67V/S72G/L98Q/Y105L	109	290
G29W/M55V/E59G/L63P/L98Q/Y105L	110	291
G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L/I117L	111	289
L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106I/I117L	112	285
L12F/R16H/G29W/M56T/L98Q/Y105L	113	292
L12P/G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L	114	293
L12P/G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106I	115	293
G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106I/I117L	116	289
G29W/N58S/L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106I	117	283
A26T/T53S/L63P/L98Q/Y105L/L106I/I117L	118	294
G29W/N58S/L63P/S72G/M87V/L98Q/Y105L	119	295
G29W/S72G/Q76R/L98Q/Y105L/L106I/Q113H	120	296
G29W/N58S/L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106V	121	283
A26T/L63P/L98Q/M99L/Y105L	122	297
G29W/N58D/I67V/L98Q/M99L/Y105L	123	298
I67V/S72G/Q82H/T89A/L98Q/M99L/Y105L	124	299
S72G/R85G/L98Q/M99L/Y105L/L106I	125	300
A26T/T47A/M56K/L63P/S72G/Q82R/L98Q/M99L/Y105L	126	301
A26T/M55T/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	127	302
L12H/I18V/A42T/M55T/N58D/L98R/Y105L/L106I/P121S	128	303
I18T/A26T/L63P/S72G/L98Q/Y105L	129	304
L12F/K30R/S72G/Q82R/L98Q/M99L/Y105L	130	305
L12P/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L/L106N/I117L	131	316
G29W/M87K/I93V/L98Q/M99L/Y105L	132	306
P28L/E33V/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	133	307
G29W/T53S/M56K/L63P/Q82H/L98Q/M99I/Y105L	134	308
I18F/L63P/L98Q/M99L/Y105L/P121S	135	309
L63P/L98Q/M99L/Y105L/I108V	136	207
A26T/A42V/Q45H/I67N/M87K/E97Q/M99L	137	310
M56V/E59G/L63P/S72G/M87K/I93V/L98Q/M99L/Y105L/I117E	138	311

ТАБЛИЦА 3: Примерный вариант TIM CTLA-4, содержащих IgD или vIgD		
Мутация (мутации)	**ECD SEQ ID NO**	**IgV SEQ ID NO**
G29W/M87K/T89S/L98Q/M99L/Y105L/I108V/I117L	139	278
L12P/M56V/L63P/V96I/L98Q/M99L/Y105L/Y115H	140	312
G29W/T53S/M56K/T61N/L63P/L98Q/Y105L	141	313
I18T/A26S/M55T/M56V/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L/I117K	142	314
I18T/T61R/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	143	315
L12P/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	144	316
E33M/L63P/S72G/L98Q/Y105L/I108F	145	267
L12P/R16H/A26T/T61S/L63P/M87V/L98Q/M99L/Y105L/L106I/I117L	146	317
G29W/T53S/M56K/N58S/L63P/M87V/L98Q/Y105L/P121S	147	318
G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L/P121S	148	289
G29W/T53S/M56K/N58S/L63P/M87V/L98Q/Y105L	149	318
G29W/T53S/M56K/N58S/L63P/M87V/L98Q/Y105L/I108V	150	318
G29W/T53S/L63P/S72G/L98Q/Y105L	151	319
V10A/G29W/T53S/M56K/L63P/L98Q/Y105L/P121S	152	320
A31Y/L106E	153, 154	321
A31Y/L106E/C122S	155, 156	321
T89A/L98Q/M99L/Y105L/L106I/Y115N/E120D/C122P/D124P/S125I/D126P	157	322
N58S/L63P/T71A/S72G/L98Q/M99L/Y105L/D124I/S125P/D126T	158	323
R16G/E33M/N58S/E59G/L63P/L98Q/Y105L/E120D/C122P/D124P/S125I/D126P	159	324
G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L/P121S/D126T	160	325
L12H/E33M/L98Q/Y105L	161	326
T53S/M56K/N58S/L63P/M87V/L98Q/Y105L	162	327
I18T/A26T/M55T/M56K/L63P/L98Q/M99L/Y105L	163	328
I18T/A26T/M56K/L63P/L98Q/Y105L	164	329
T53S/L63P/L98Q	165	330
T53S/L63P/Y105L	166	331
T53S/M56K/N58S/L63P/M87V/L98Q	167	332
T53S/M56K/N58S/L63P/M87V/Y105L	168	333
T53S/M56K/N58S/L63P/L98Q/Y105L	169	334
T53S/M56K/N58S/M87V/L98Q/Y105L	170	335
T53S/M56K/L63P/M87V/L98Q/Y105L	171	336
T53S/N58S/L63P/M87V/L98Q/Y105L	172	337
M56K/N58S/L63P/M87V/L98Q/Y105L	173	338
E33V/L98Q/Y105L	174	339
E33V/M99L/Y105L	175	340
E33V/L98Q/M99L	176	341
E33V/M99L	177	342
L12F/R16H/G29W/M56T/L98Q	178	343
L12F/R16H/G29W/M56T/Y105L	179	344
L12F/R16H/G29W/L98Q/Y105L	180	345
L12F/R16H/M56T/L98Q/Y105L	181	346
G29W/M56T/L98Q/Y105L	182	347
L12F/G29W/L98Q/Y105L	183	348
L12F/L98Q/Y105L	184	349
R16H/L98Q/Y105L	185	350
G29W/L98Q/Y105L	186	351

ТАБЛИЦА 3: Примерный вариант TIM CTLA-4, содержащих IgD или vIgD		
Мутация (мутации)	**ECD SEQ ID NO**	**IgV SEQ ID NO**
M56T/L98Q/Y105L	187	352
L12F/R16H/G29W/M56T/S72G/L98Q/Y105L	188	353
G29W/M56T/S72G/L98Q/Y105L	189	354
I18T/T61R/L63P/S72G/L98Q/M99L/P102L/Y105L	190	355

C. ФОРМАТЫ

Представленные в настоящей заявке мультидоменные иммуномодулирующие белки, содержащие одну или несколько BIM и одну или несколько TIM, могут быть отформатированы различными способами, в том числе в виде гибридов полипептидов с одной цепью или в виде мультимерных (например, димерных, тримерных, тетрамерных или пентамерных) молекул. Конкретный формат выбран таким образом, чтобы BIM иммуномодулирующего белка специфически связывалась с лигандом рецептора, стимулирующего В-клетки, а TIM специфически связывалась с рецептором, стимулирующим Т-клетки, или лигандом рецептора, стимулирующего Т-клетки. В некоторых аспектах конкретный формат выбирают для осуществления ослабления активности рецептора, стимулирующего Т-клетки, и рецептора, стимулирующего В-клетки, например, для уменьшения или ослабления иммунного ответа, опосредуемого Т-клетками и В-клетками, соответственно. В некоторых вариантах модульный формат предоставленных иммуномодулирующих белков обеспечивает гибкость для разработки или генерации иммуномодулирующих белков для модуляции активности в иммунном синапсе, включающем взаимодействия между рецептором, стимулирующим В-клетки, и рецептором, стимулирующим Т-клетки, и их лигандами.

В некоторых вариантах осуществления формат мультидоменного иммуномодулирующего белка выбирают таким образом, чтобы избежать сшивки или вовлечения рецептора, стимулирующего Т-клетки. Таким образом, в некоторых аспектах предоставленные иммуномодулирующие белки не проявляют поливалентного связывания с рецептором, стимулирующим Т-клетки. Например, для генерируемых иммуномодулирующих белков, в которых TIM связывается с рецептором, стимулирующим Т-клетку, например, CD28, предполагается относительно меньшая молекулярная масса, мономерный и/или одноцепочечный полипептидный гибрид иммуномодулирующего белка.

В некоторых вариантах осуществления предоставленные мультидоменные иммуномодулирующие белки могут включать одну или несколько BIM и одну или

несколько TIM. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок может включать одну или несколько BIM, описанных в настоящей заявке, и любую одну или несколько TIM, описанных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок содержит ровно 1, 2, 3, 4, 5 BIM, которые в некоторых аспектах являются одинаковыми или имеют идентичную последовательность, когда включено множество. В некоторых вариантах осуществления каждая из множества, например, 2, 3, 4 или 5, связана прямо или опосредованно через линкер с другой BIM. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующие белки содержат ровно 1, 2, 3, 4, 5 TIM, которые в некоторых аспектах являются одинаковыми или имеют идентичную последовательность, когда включено множество. В некоторых вариантах осуществления каждая из множества TIM, например, 2, 3, 4 или 5, связана прямо или опосредованно через линкер с другой TIM.

В некоторых вариантах осуществления мультидоменный иммуномодулирующий белок содержит полипептид, который включает по меньшей мере одну BIM и по меньшей мере одну TIM. В некоторых аспектах по меньшей мере одна из одной или нескольких молекул BIM связана прямо или опосредованно через линкер по меньшей мере с одной из одной или несколькими молекулами TIM. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок включает полипептид, содержащий BIM, связанный прямо или опосредованного через линкер с TIM, в любом порядке. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна BIM является аминоконцевой по меньшей мере к одной TIM в полипептиде. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна BIM является карбоксиконцевой по меньшей мере к одной TIM в полипептиде.

В дополнение к вариантам осуществления с одной полипептидной цепью, в некоторых вариантах осуществления два, три, четыре или более полипептидов, содержащих одну или несколько BIM и/или одну или несколько TIM, могут быть ковалентно или нековалентно присоединены друг к другу. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна полипептидная цепь содержит одну или несколько BIM, и по меньшей мере одна полипептидная цепь содержит одну или несколько TIM. В некоторых вариантах осуществления каждая из по меньшей мере двух полипептидных цепей содержит по меньшей мере одну BIM и по меньшей мере одну TIM. Таким образом, в настоящей заявке представлены мономерные, димерные и мультимерные белки более высокого порядка (например, 3, 4, 5 или более). Например, в некоторых вариантах осуществления ровно два полипептида, каждый из которых содержит одну или несколько BIM и/или одну или несколько TIM, могут быть ковалентно или нековалентно присоединены друг к другу с образованием димера. В некоторых вариантах

осуществления два полипептида могут быть присоединены через домен мультимеризации, в котором, в некоторых аспектах, одна или обе из BIM и TIM связаны прямо или опосредованного через линкер с доменом мультимеризации. В таких вариантах осуществления область мультимеризации может быть одной и той же или отличаться. В некоторых вариантах осуществления домен мультимеризации, такой как Fc-область, облегчает присоединение двух полипептидных цепей посредством межцепочечной цистеиновой дисульфидной связи. Композиции, содержащие два или более полипептида, могут иметь идентичную последовательность или по существу идентичную последовательность полипептида (например, гомодимер) или неидентичную последовательность полипептидов (например, гетеродимер).

В некоторых вариантах осуществления мультидоменный иммуномодулирующий белок может дополнительно включать метку или фрагмент.

Неограничивающие примеры фрагментов для включения в предоставленные форматы дополнительно описаны в следующих подразделах. Примеры форматов Fc-гибридизации предоставленных мультидоменных иммуномодулирующих белков показаны на Фиг.16.

1. ЛИНКЕРЫ

Для мультидоменных иммуномодулирующих белков, представленных в настоящей заявке, линкеры (взаимозаменяемо используемые с термином «спейсеры») могут быть использованы для соединения фрагментов полипептида, таких как любая BIM и/или TIM, представленные в настоящей заявке. В некоторых случаях линкер представляет собой пептид или полипептидную последовательность (например, синтетический пептид или полипептидную последовательность) или представляет собой непептидный линкер, способный соединять две части. В некоторых аспектах линкер используют или выбирают для поддержания структурной гибкости и других конформационных характеристик отдельных остатков или на вторичных, третичных или четвертичных структурных уровнях доменов полипептидного гибридного белка, например, для поддержания функциональных свойств иммуномодулирующего белка. Линкеры могут также обеспечивать дополнительные полезные свойства белка, такие как повышенная экспрессия белка в системах экспрессии млекопитающих, улучшенные биофизические свойства, такие как стабильность и растворимость, улучшенная очистка и детекция белка и/или повышенная ферментативная активность. В некоторых примерах два или более линкера могут быть связаны в тандеме.

В некоторых аспектах линкеры могут быть пептидными линкерами. В других аспектах линкер включает химические связующие агенты и гетеробифункциональные

связующие агенты. В некоторых случаях линкер не поддается расщеплению. В других случаях линкер может содержать один или несколько расщепляемых протеазой сайтов, которые могут быть расположены внутри последовательности линкера или фланкировать линкер на любом конце последовательности линкера.

Когда в иммуномодулирующем белке присутствуют множественные линкеры между BIM, TIM или другими фрагментами, каждый из линкеров может быть одинаковым или отличаться. Как правило, линкеры или множество линкеров обеспечивают гибкость полипептидной молекулы.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько «пептидных линкеров» связывают BIM, TIM или другие фрагменты иммуномодулирующего белка. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер может представлять собой один аминокислотный остаток или более по длине. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер имеет по меньшей мере один аминокислотный остаток, но не более 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, или 1 аминокислотного остатка по длине. В некоторых вариантах осуществления линкер является гибким линкером. Линкерные фрагменты описаны, например, в Huston et al. (1988) PNAS 85:5879-5883, Whitlow et al. (1993) Protein Engineering 6:989-995, и Newton et al, (1996) Biochemistry 35:545-553. Другие подходящие пептидные линкеры включают любые из тех, которые описаны в патентах США № 4,751,180 или 4,935,233.

В некоторых примерах пептидный линкер включает пептиды (или полипептиды) (например, натуральные или ненатуральные пептиды), которые включают аминокислотную последовательность, связывающую или генетически гибридизующую первую линейную последовательность аминокислот со второй линейной последовательностью аминокислот, с которой она не связана естественным образом. или генетически гибридизована по своей природе. Например, пептидный линкер может включать ненатуральные полипептиды, которые являются модифицированными формами натуральных полипептидов (например, которые включают мутацию, такую как добавление, замена или делеция). В другом примере пептидный линкер может включать ненатуральные аминокислоты. В другом примере пептидный линкер может включать натуральные аминокислоты, расположенные в линейной последовательности, которая не встречается в природе. В еще одном примере пептидный линкер может включать натуральную полипептидную последовательность. Связующие фрагменты могут также включать производные и аналоги натуральных аминокислот, а также различные ненатуральные аминокислоты (D- или L-), гидрофобные или негидрофобные, известные в данной области техники.

Примерными пептидными линкерами являются линкеры с формулой $Ser(Gly_4Ser)_n$ (или $(Gly\text{-}Ser)_n$ остатков с некоторыми остатками Gly или Lys, диспергированными повсюду для повышения растворимости, где n может быть целым числом от 1 до 20, таким как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, или 20. Другие примерные линкеры включают пептидные линкеры с формулой $[(Gly)_x\text{-}Ser_y]_z$, где x составляет от 1 до 4, y составляет от 0 или 1, а z составляет от 1 до 50. В других примерах пептидный линкер включает последовательность G_n, где n может быть целым числом от 1 до 100. В другом примере последовательность пептидного линкера может быть $(GA)_n$ или $(GGS)_n$.

В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой (в однобуквенном аминокислотном коде): GGGGS («4GS»; SEQ ID NO:593) или мультимеры линкера 4GS, такие как повторы 2, 3, 4 или 5 линкеров 4GS. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой пептидный линкер $(GGGGS)_2$ (SEQ ID NO:594), $(GGGGS)_3$ (SEQ ID NO:595), $(GGGGS)_4$ (SEQ ID NO:600) или $(GGGGS)_5$ (SEQ ID NO:671). В некоторых вариантах осуществления линкер также может включать ряд остатков аланина отдельно или в дополнение к другому пептидному линкеру (такому как линкер 4GS или его мультимер). В некоторых вариантах осуществления количество остатков аланина в каждом ряду составляет 2, 3, 4, 5 или 6 аланинов. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой жесткий линкер. Например, линкер представляет собой α-спиральный линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой (в однобуквенном аминокислотном коде) EAAAK (SEQ ID NO:711) или мультимеры линкера EAAAK, такие как повторы 2, 3, 4, 5 или 6 линкеров EAAAK, таких как указанные в SEQ ID NO:712 (2×EAAAK), SEQ ID NO:713 (3×EAAAAK), SEQ ID NO:714 (4×EAAAK), SEQ ID NO:715 (5×EAAAK) или SEQ ID NO:665 (6×EAAAK). В некоторых вариантах осуществления линкер может дополнительно включать аминокислоты, введенные путем клонирования и/или из сайта рестрикции, например, линкер может включать аминокислоты GS (в однобуквенном аминокислотном коде), введенные с использованием сайта рестрикции BAMHI. В некоторых вариантах осуществления линкером (в однобуквенном аминокислотном коде) является GSGGGGS (SEQ ID NO:590) или GGGGSSA (SEQ ID NO:596). В некоторых примерах линкер представляет собой 2×GGGGS, за которыми следуют три аланина (GGGGSGGGGSAAA; SEQ ID NO:721).

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий необходимый пептидный линкер, может быть вставлен между, и в ту же рамку считывания, что и полинуклеотид, кодирующий любую TIM, BIM или другой фрагмент в предоставленном

иммуномодулирующем белке, и между другим фрагментом, используя любую подходящую традиционную методику.

2. ДОМЕН МУЛЬТИМЕРИЗАЦИИ

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок, содержащий одну или несколько BIM и/или TIM, является мультимерным, таким как димерный, тримерный, тетрамерный или пентамерный. Для димерного формата иммуномодулирующий белок содержит первый полипептид и второй полипептид. В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй полипептид представляет собой BIM, TIM или содержит обе молекулы. В аспектах BIM и/или TIM связаны, прямо или опосредованно, через линкер, с доменом мультимеризации. В некоторых аспектах домен мультимеризации увеличивает период полужизни молекулы. Линкер может включать любой, как описано выше.

В одном примере иммуномодулирующий белок, представленный в настоящей заявке, является димером. В некоторых случаях иммуномодулирующий белок представляет собой гомодимер, который содержит первую и вторую полипептидные субъединицы, которые являются одинаковыми, т.е. каждая из них имеет одинаковую аминокислотную последовательность, содержащую идентичные BIM и TIM. Гомодимер может быть получен путем трансформации молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей вариантный полипептид, в клетке, что при секреции приводит к ковалентному или нековалентному взаимодействию между остатками полипептидных субъединиц для опосредования образования димера.

В другом примере иммуномодулирующий белок представляет собой гетеродимер, который содержит первую и вторую полипептидные субъединицы, которые отличаются. В таком примере одна или обе из первой или второй полипептидной субъединицы содержат последовательность аминокислот BIM и TIM. В некоторых случаях как первая, так и вторая полипептидная субъединица могут содержать последовательность аминокислот BIM и последовательность аминокислот TIM. Гетеродимер может быть образован путем трансформации в клетке как первой молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей первую полипептидную субъединицу, так и второй молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую другую полипептидную субъединицу. В некоторых аспектах гетеродимер образуется при экспрессии и секреции из клетки в результате ковалентного или нековалентного взаимодействия между остатками двух полипептидных субъединиц для опосредования образования димера. В таких процессах обычно образуется смесь димерных молекул, включая гомодимеры и гетеродимеры. Для получения гетеродимеров могут потребоваться дополнительные стадии очистки.

Например, первый и второй полипептиды могут быть сконструированы таким образом, чтобы включать метку с хелатами металлов или другим эпитопом, где метки отличаются. Меченые домены могут быть использованы для быстрой очистки с помощью металл-хелатной хроматографии и/или с помощью антител, чтобы обеспечить детекцию с помощью вестерн-блоттинга, иммунопреципитации или снижения/блокирования активности в биологических анализах.

Взаимодействие двух или более полипептидов иммуномодулирующих белков может быть облегчено их связыванием, либо прямо, либо косвенно, с любым фрагментом или другим полипептидом, которые сами по себе способны взаимодействовать с образованием стабильной структуры. Например, отдельные кодируемые полипептидные цепи могут быть соединены посредством мультимеризации, при этом мультимеризация полипептидов опосредуется доменом мультимеризации. Как правило, домен мультимеризации обеспечивает образование стабильного белок-белкового взаимодействия между первым полипептидом и вторым полипептидом.

В некоторых вариантах осуществления два или более индивидуальных полипептида иммуномодулирующих белков могут быть соединены путем мультимеризации, например, соединены в виде димерных, тримерных, тетрамерных или пентамерных молекул. В некоторых случаях отдельные полипептиды являются одинаковыми. Например, тримерная молекула может быть образована из трех копий одного и того же индивидуального полипептида. В других примерах тетрамерная молекула образуется из четырех копий одних и тех же отдельных полипептидов. В дальнейших примерах пентамерная молекула генерируется из пяти копий одних и тех же индивидуальных полипептидов. В некоторых вариантах осуществления конфигураций отдельные полипептиды иммуномодулирующих белков, содержащих BIM и/или TIM, гибридизованы с доменом мультимеризации. Домен мультимеризации может быть доменом, который обеспечивает димеризацию, тримеризацию, тетрамеризацию или пентамеризацию полипептидных цепей.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок образует мультимер, например, димер. В некоторых вариантах осуществления димер представляет собой гомодимер, в котором два полипептида иммуномодулирующего белка являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления димер представляет собой гетеродимер, в котором два полипептида иммуномодулирующего белка являются различными.

В некоторых вариантах осуществления домен мультимеризации включает любой домен, способный формировать стабильное белок-белковое взаимодействие. Домены

мультимеризации могут взаимодействовать через последовательность иммуноглобулина (например, домен Fc; см., например, Международные патентные публикации WO 93/10151 и WO 2005/063816 США; патент США 2006/0024298; патент США 5,457,035); лейциновую молнию (например, из ядерно-трансформирующих белков fos и jun или протоонкогена c-myc или из общего контроля азота (GCN4)) (см., например, Busch and Sassone-Corsi (1990) Trends Genetics, 6:36-40; Gentz et al., (1989) Science, 243:1695-1699); гидрофобную область; гидрофильную область; или свободный тиол, который образует межмолекулярную дисульфидную связь между химерными молекулами гомо- или гетеромультимера. Кроме того, домен мультимеризации может включать аминокислотную последовательность, содержащую выступ, комплементарный аминокислотной последовательности, содержащей впадину, такой, как описано, например, в патенте США № 5,731,168; Международных патентных публикациях WO 98/50431 и WO 2005/063816; Ridgway et al. (1996) Protein Engineering, 9:617-621. Такая область мультимеризации может быть сконструирована таким образом, что стерические взаимодействия не только способствовали стабильному взаимодействию, но и дополнительно способствовали образованию гетеродимеров из гомодимеров из смеси химерных мономеров. Как правило, выступы конструируют путем замены небольших боковых цепей аминокислот на границе раздела первого полипептида более крупными боковыми цепями (например, тирозином или триптофаном). Компенсационные полости идентичного или сходного размера с выступами при необходимости создают на границе раздела второго полипептида путем замены больших боковых цепей аминокислот на меньшие (например, аланин или треонин). Примерные домены мультимеризации описаны ниже.

BIM и/или TIM могут быть присоединены где угодно, но обычно через свой N- или C-конец, к N- или C-концу домена мультимеризации с образованием химерного полипептида. Связь может быть прямой или опосредованной через линкер. Кроме того, химерный полипептид может быть гибридным белком или может быть образован путем химической связи, например, посредством ковалентных или нековалентных взаимодействий. Например, при получении химерного полипептида, содержащего домен мультимеризации, нуклеиновая кислота, кодирующая всю или часть BIM и/или TIM, может быть функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей последовательность домена мультимеризации, прямо или опосредованно, или при необходимости через линкерный домен. В некоторых случаях конструкция кодирует химерный белок, в котором C-конец BIM и/или TIM соединен с N-концом домена мультимеризации. В некоторых случаях конструкция может кодировать химерный белок, где N-конец BIM и/или TIM присоединен к N- или C-концу домена мультимеризации.

Полипептидный мультимер содержит два химерных белка, созданных путем прямого или опосредованного связывания двух одинаковых или разных BIM и/или TIM прямо или опосредованно с доменом мультимеризации. В некоторых примерах, где домен мультимеризации представляет собой полипептид, гибрид генов, кодирующих BIM и/или TIM и домен мультимеризации, вставляют в соответствующий вектор экспрессии. Полученный химерный или гибридный белок может быть экспрессирован в клетках-хозяевах, трансформированных с помощью рекомбинантного вектора экспрессии, и может собираться в мультимеры, где домены мультимеризации взаимодействуют с образованием поливалентных полипептидов. Химическое связывание доменов мультимеризации с BIM и/или TIM может быть осуществлено с использованием гетеробифункциональных линкеров.

Полученные химерные полипептиды, такие как гибридные белки, и мультимеры, образованные из них, могут быть очищены любым подходящим способом, таким как, например, аффинная хроматография на колонках с белком A или белком G. Там, где две молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие разные полипептиды, трансформируются в клетки, происходит образование гомо- и гетеродимеров. Условия для экспрессии могут быть скорректированы таким образом, чтобы образование гетеродимера было предпочтительнее образования гомодимера.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок содержит BIM и/или TIM, присоединенную к Fc иммуноглобулина (что приводит к «иммуномодулирующему гибриду Fc»). В некоторых вариантах осуществления присоединение BIM и/или TIM осуществляют на N-конце Fc. В некоторых вариантах осуществления присоединение BIM и/или TIM осуществляют на C-конце Fc. В некоторых вариантах осуществления две или более BIM и/или TIM (одинаковые или разные) независимо присоединены на N-конце и на C-конце. Таким образом, гомо- или гетеромультимерные полипептиды могут быть получены в результате совместной экспрессии отдельных BIM и/или TIM, содержащих полипептиды. Первый и второй полипептиды могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах осуществления каждый из первого и/или второго полипептидов содержит две или более BIM и/или TIM, связанных с последовательностью Fc. В некоторых вариантах осуществления каждый из первого и/или второго полипептидов содержит три TIM и одну BIM, связанный с последовательностью Fc. Примеры форматов Fc-гибридизации предоставленных мультидоменных иммуномодулирующих белков показаны на Фиг.16.

В некоторых вариантах осуществления Fc является мышиной или человеческим Fc. В некоторых вариантах осуществления Fc представляет собой области Fc IgGl, lgG2, lgG3

или lgG4 млекопитающих или человека.

В некоторых вариантах осуществления Fc является производной от IgG1, такого как человеческий IgG1. В некоторых вариантах осуществления Fc представляет собой Fc IgG1, указанный в SEQ ID NO:586, имеющую аллотип, содержащий остатки Глу (E) и Мет (M) в положениях 356 и 358 по нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления Fc содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:586, или последовательность аминокислот, которая проявляет по меньшей мере примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO:586. В других вариантах осуществления Fc представляет собой Fc IgG1, включающую аминокислоты человеческого аллотипа G1m1, такие как остатки, содержащие Asp (D) и Leu (L) в положениях 356 и 358, например, как указано в SEQ ID NO:597. Таким образом, в некоторых случаях Fc, представленная здесь, может содержать аминокислотные замены E356D и M358L для восстановления остатков аллотипа G1m1. В некоторых вариантах осуществления Fc содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:597, или последовательность аминокислот, которая проявляет по меньшей мере примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO:597.

В некоторых вариантах осуществления область Fc имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:597.

EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:597).

В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO:755. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:756. В некоторых вариантах осуществления Fc-область, используемая в конструкции, представленной в настоящей заявке, может дополнительно не содержать С-концевого остатка лизина.

В некоторых вариантах осуществления Fc является производной от IgG2, такого как человеческий IgG2. В некоторых вариантах осуществления Fc содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:726, или последовательность аминокислот, которая проявляет по меньшей мере 85%, 86%, 87%,

88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO:726. В некоторых вариантах осуществления область Fc представляет собой область Fc IgG2, которая имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:726. В некоторых вариантах осуществления область Fc представляет собой область Fc IgG2, которая имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:822.

В некоторых вариантах осуществления Fc является производной от IgG4, такого как человеческий IgG4. В некоторых вариантах осуществления Fc содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:727, или последовательность аминокислот, которая проявляет по меньшей мере примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO:727. В некоторых вариантах осуществления Fc IgG4 представляет собой стабилизированную Fc, в которой домен CH3 человеческого IgG4 заменен доменом CH3 человеческого IgG1, и которая проявляет ингибированное образование агрегатов, антитело, в котором домены CH3 и CH2 человеческого IgG4 заменены доменами CH3 и CH2 человеческого IgG1, соответственно, или антитело, в котором аргинин в положении 409, указанном по нумерации EU, предложенной Kabat et al., из человеческого IgG4 замещен лизином, и который проявляет ингибированное образование агрегатов (см., например, патент США № 8,911,726. В некоторых вариантах осуществления Fc представляет собой IgG4, содержащий мутацию S228P, которая, как было показано, предотвращает рекомбинацию между терапевтическим антителом и эндогенным IgG4 путем обмена Fab-плеча (см., например, Labrijin et al. (2009) Nat. Biotechnol., 27(8): 767-71). В некоторых вариантах осуществления Fc содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:728, или последовательность аминокислот, которая проявляет по меньшей мере примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO:728. В некоторых вариантах осуществления область Fc представляет собой область Fc IgG4, указанную в SEQ ID NO:728. В некоторых вариантах осуществления область Fc представляет собой область Fc IgG4, указанную в SEQ ID NO:823.

В некоторых вариантах осуществления область Fc содержит еще одну модификацию для изменения (например, уменьшения) ее одной или нескольких нормальных функций. В целом, Fc-область отвечает за эффекторные функции, такие как комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC) и антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), в дополнение к антигенсвязывающей способности, которая является основной функцией иммуноглобулинов. Кроме того, последовательность FcRn,

присутствующая в области Fc, играет роль в регулировании уровня IgG в сыворотке крови путем увеличения периода полужизни in vivo путем конъюгации с рецептором FcRn in vivo. В некоторых вариантах осуществления такие функции могут быть уменьшены или изменены в Fc для использования с предоставленными Fc гибридными белками.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных модификаций могут быть введены в Fc-область, тем самым создавая вариант Fc-области. В некоторых вариантах вариант Fc-области имеет пониженную эффекторную функцию. Существует много примеров изменений или мутаций Fc-последовательностей, которые могут изменять эффекторную функцию. Например, WO 00/42072, WO2006019447, WO2012125850, WO2015/107026, US2016/0017041 и Shields et al. J Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001) описывают примерные варианты Fc с улучшенным или уменьшенным связыванием с FcR. Содержание этих публикаций специально включено в настоящий документ путем ссылки.

В некоторых вариантах осуществления предоставленные иммуномодулирующие белки содержат Fc-область, которая проявляет пониженные эффекторные функции, что делает ее желательным кандидатом для применений, в которых период полужизни иммуномодулирующего белка in vivo важен, но определенные эффекторные функции (такие как CDC и ADCC) являются ненужными или вредными. Для подтверждения снижения/истощения активности CDC и/или ADCC могут быть проведены анализы цитотоксичности in vitro и/или in vivo. Например, анализы связывания Fc-рецептора (FcR) могут быть проведены, чтобы гарантировать, что иммуномодулирующий белок не связывается с FcyR (следовательно, вероятно, не обладает активностью ADCC), но сохраняет способность связывать FcRn. Первичные клетки, опосредующие ADCC, NK-клетки, экспрессируют только FcyRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcyRI, FcyRIII и FCYRIIII. Экспрессия FcR на гемопоэтических клетках суммирована в Таблице 2 на стр.464 из Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991). Неограничивающие примеры анализов in vitro для оценки активности ADCC представляющей интерес молекулы описаны в патенте США № 5500362 (см., например, Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)) и Hellstrom, I et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); U.S. Pat. No. 5,821,337 (см. Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)). В качестве альтернативы могут быть использованы нерадиоактивные методы анализа (см., например, анализ нерадиоактивной цитотоксичности ACTI™ для проточной цитометрии (CellTechnology, Inc. Маунтин-Вью, Калифорния; и анализ нерадиоактивной цитотоксичности CytoTox 96™ (Promega, Мэдисон, Висконсин). Полезные эффекторные клетки для таких анализов включают мононуклеарные клетки периферической крови

(PBMC) и клетки натуральные киллеры (NK). Альтернативно или дополнительно, активность ADCC представляющей интерес молекулы может быть оценена in vivo, например, на животной модели, такой как описанная в Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998). Анализы связывания C1q также могут быть проведены для подтверждения того, что иммуномодулирующий белок n неспособен связывать C1q и, следовательно, не обладает активностью CDC. См., например, ELISA, связывающий C1q и C3c, в WO 2006/029879 и WO 2005/100402. Для оценки активации комплемента может быть проведен анализ CDC (см., например, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M. S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003); и Cragg, M. S. and M. J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)). Связывание FcRn и определение клиренса/периода полужизни in vivo также может быть выполнено с использованием методов, известных в данной области техники (см., например, Petkova, S. B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)).

Иммуномодулирующий белок со сниженной эффекторной функцией включает белки с заменой одного или нескольких остатков Fc-области 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 по нумерации EU (патент США № 6,737,056). Такие Fc-мутанты включают Fc-мутанты с заменами в двух или более аминокислотных положениях 265, 269, 270, 297 и 327 по нумерации EU, включая так называемый Fc-мутант «DANA» с заменой остатков 265 и 297 на аланин (Патент США № 7,332,581).

В некоторых аспектах Fc дикого типа модифицируют одной или несколькими аминокислотными заменами, чтобы снизить эффекторную активность или обеспечить инертность Fc для эффекторной функции Fc. Примеры безэффекторных или инертных мутаций включают мутации, описанные в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления Fc-область иммуномодулирующих белков включает Fc-область, в которой любая одна или несколько аминокислот в положениях 234, 235, 236, 237, 238, 239, 270, 297, 298, 325, и 329 (обозначены нумерацией EU) заменены различными аминокислотами по сравнению нативной Fc-областью. Такие изменения Fc-области не ограничиваются вышеописанными изменениями и включают, например, такие изменения, как дегликозилированные цепи (N297A и N297Q), IgG1-N297G, IgG1-N297G, IgG1-L234A/L235A, IgG1-L234A/L235E/G237A, IgG1-A325A/A330S/P331S, IgG1-C226S/C229S, IgG1-C226S/C229S/E233P/L234V/L235A, IgG1- E233P/L234V/L235A/G236del/ S267K, IgG1-L234F/L235E/P331S, IgG1-S267E/L328F, IgG2-V234A/G237A, IgG2-H268Q/V309L/A330S/A331S, IgG4-L235A/G237A/E318A, и IgG4-L236E, описанные в Current Opinion in Biotechnology (2009) 20 (6), 685-691; изменения, такие как G236R/L328R, L235G/G236R, N325A/L328R и N325LL328R, описанные в WO

2008/092117; вставки аминокислот в положениях 233, 234, 235 и 237 (обозначены нумерацией EU); и изменения в сайтах, описанных в WO 2000/042072. Описаны некоторые варианты Fc с улучшенным или уменьшенным связыванием с FcR. (См., например, патент США № 6,737,056; WO 2004/056312, WO2006019447 и Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)).

В некоторых вариантах осуществления предложен иммуномодулирующий белок, включающий вариант Fc-области, содержащий одну или несколько аминокислотных замен, которые увеличивают период полужизни и/или улучшают связывание с неонатальным Fc-рецептором (FcRn). Антитела с увеличенным периодом полужизни и улучшенным связыванием с FcRn описаны в US2005/0014934A1 (Hinton et al.) или WO2015107026. Эти антитела содержат Fc-область с одной или несколькими заменами в ней, которые улучшают связывание Fc-области с FcRn. Такие варианты Fc включают варианты с заменами в одном или нескольких остатках области Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434 по нумерации EU, например, замену остатка области Fc 434 (патент США № 7,371,826).

В некоторых вариантах осуществления Fc-область иммуномодулирующего белка содержит одну или несколько аминокислотных замен C220S, C226S и/или C229S по нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления Fc-область иммуномодулирующего белка содержит одну или несколько аминокислотных замен R292C и V302C. См. также Duncan & Winter, Nature 322: 738-40 (1988); патент США № 5,648,260; патент США № 5,624,821; и WO 94/29351 относительно других примеров вариантов Fc-области.

В некоторых вариантах осуществления в Fc-области производятся изменения, которые приводят к снижению связывания C1q и/или комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), например, как описано в патенте США № 6,194,551, WO 99/51642, и Idusogie et al., J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

В некоторых вариантах осуществления предложен иммуномодулирующий белок, содержащий вариантную Fc-область, включающую одну или несколько аминокислотных модификаций, причем вариантная Fc-область получена из IgG1 дикого типа, такого как IgG1 человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления Fc IgG1 дикого типа может быть Fc, указанной в SEQ ID NO:586, имеющей аллотип, содержащий остатки Глу (E) и Мет (M) в положениях 356 и 358 по нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc-область получена из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:586. В других вариантах осуществления Fc IgG1 дикого типа содержит аминокислоты человеческого аллотипа G1m1, такие как остатки, содержащие

Asp (D) и Leu (L) в положениях 356 и 358, например, как указано в SEQ ID NO:597. Таким образом, в некоторых случаях вариантная Fc является производной от аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:597.

В некоторых вариантах осуществления в Fc-области отсутствует С-концевой лизин, соответствующий положению 232 дикого типа или немодифицированной Fc, указанной в SEQ ID NO:586 или 597 (соответствует K447del по нумерации EU).

В некоторых вариантах осуществления Fc содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, которая является N82G по нумерации SEQ ID NO:586 (соответствует N297G по нумерации EU). В некоторых вариантах осуществления Fc дополнительно содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, которая является R77C или V87C по нумерации SEQ ID NO:586 (соответствует R292C или V302C по нумерации EU). В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc область дополнительно содержит модификацию аминокислоты C5S по нумерации SEQ ID NO:586 (соответствует C220S по нумерации EU). Например, в некоторых вариантах осуществления вариантная Fc область содержит следующие модификации аминокислот: N297G и одну или несколько из следующих модификаций аминокислот C220S, R292C или V302C по нумерации EU (соответствует N82G и одной или нескольким из следующих модификаций аминокислот C5S, R77C или V87C со ссылкой на SEQ ID NO:586), например, область Fc содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:598.

В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc содержит аминокислотные замены L234A/L235E/G237A, по нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc содержит аминокислотные замены A330S/P331S по нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc содержит аминокислотные замены L234A/L235E/G237A/A330S/P331S (Gross et al. (2001), Immunity 15:289). В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:757. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:758. В некоторых вариантах осуществления Fc-область, используемая в конструкции, представленной в настоящей заявке, может дополнительно не содержать С-концевого остатка лизина.

В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc, используемая в представленных в настоящей заявке иммуномодулирующих белковых конструкциях, может включать безэффекторные мутации L234A, L235E и G237A по нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления Fc дикого типа дополнительно модифицируют путем удаления одного или нескольких остатков цистеина, такого как замена остатков цистеина на остаток серина в положении 220 (C220S) по нумерации EU. Примеры инертных Fc-

областей, имеющих пониженную эффекторную функцию, приведены в SEQ ID NO:599 и SEQ ID NO:591, которые основаны на аллотипах, изложенных в SEQ ID NO:586 или SEQ ID NO:597, соответственно. В некоторых вариантах осуществления Fc-область, используемая в конструкции, представленной в настоящей заявке, может дополнительно не содержать С-концевого остатка лизина. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc-область содержит одну или несколько аминокислотных модификаций C220S, L234A, L235E или G237A, например, Fc-область содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:589, 591, 599 или 724. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:589. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:591. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:599. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:724.

В некоторых вариантах осуществления область Fc представляет собой вариантную Fc, который имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:589.

EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:589)

В некоторых вариантах осуществления Fc область представляет собой вариант Fc, который имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:824.

DKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:824)

В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc-область содержит одну или несколько аминокислотных модификаций C220S, L235P, L234V, L235A, G236del или S267K, например, Fc-область содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:722. В некоторых вариантах осуществления в Fc-области отсутствует С-концевой лизин, соответствующий положению 232 дикого типа или немодифицированного Fc, указанного в SEQ ID NO:586 (соответствует K447del по нумерации EU).

В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc область содержит одну или несколько аминокислотных модификаций C220S, R292C, N297G, V302C. В некоторых

вариантах осуществления в Fc-области отсутствует С-концевой лизин, соответствующий положению 232 дикого типа или немодифицированного Fc, указанного в SEQ ID NO:586 (соответствует K447del по нумерации EU). Примерная вариантная Fc-область для использования в иммуномодулирующих белковых конструкциях изложен в SEQ ID NO:723.

В некоторых вариантах осуществления вариантная область Fc содержит одну или несколько аминокислотных модификаций C220S/E233P/L234V/L235A/G236del/S267K. В некоторых вариантах осуществления в Fc-области отсутствует С-концевой лизин, соответствующий положению 232 дикого типа или немодифицированной Fc, указанной в SEQ ID NO:586 (соответствует K447del по нумерации EU). Примерный вариант Fc-области для использования в иммуномодулирующих белковых конструкциях изложен в SEQ ID NO:725.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок представляет собой гомодимер, который содержит первый иммуномодулирующий Fc-гибридный полипептид и второй иммуномодулирующий Fc-гибридный полипептид, где первый и второй полипептиды являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-гибридный полипептид содержит Fc-область и одну или несколько BIM и/или TIM, а второй гибрид полипептидов содержит ту же Fc-область и ту же одну или несколько BIM и/или TIM. В таких вариантах осуществления Fc область может быть любой, как описано выше.

Примеры таких Fc-областей для включения в иммуномодулирующий полипептид приведены в Таблице 4.

Таблица 4: Примерные Fc области, дикого типа или вариантные (безэффекторные)

Fc мутации (нумерация EU)	**356E/358M аллотип SEQ ID NO**	**356D/358L аллотип SEQ ID NO**
(Дикий тип)	586	597 (с C220S, K447del
C220S, R292C, N297G, V302C	598	
C220S, R292C, N297G, V302C, K447del	726	
C220S, L234A, L235E, G237A	599	591
C220S, L234A, L235E, G237A, K447del	724	589
L234A, L235E, G237A, K447del, с делецией шарнира		824
C220S, L235P, L234V, L235A, G236del,S267K	722	
C220S/E233P/L234V/L235A/G236del/S267K/K447del	725	
L234A, L235E, G237A, A330S, P331S		758
L234A, L235E, G237A, A330S, P331S, с делецией шарнира		757

В некоторых вариантах осуществления предусмотрен иммуномодулирующий белок, содержащий по меньшей мере одну BIM (например, как описано в Разделе III.A),

по меньшей мере одну TIM (например, любую, указанную в Разделе III.B), и вариантную Fc-область, которая проявляет пониженную эффекторную активность по сравнению с IgG1 дикого типа, указанным в SEQ ID NO:586 или 597. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc содержит последовательность аминокислот, указанную в любой из SEQ ID NO:591, 598, 599, 722, 589, 723, 724, 725, 757, 758 или 824, или последовательность аминокислот, которая проявляет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:591, 598, 599, 722, 589, 723, 724, 725, 757, 758 или 824. Например, здесь представлен иммуномодулирующий белок, содержащий по меньшей мере одну BIM (например, как описано в Разделе III.A), по меньшей мере одну TIM (например, любую, указанную в Разделе III.B), и вариантную Fc область, указанную в SEQ ID NO:589. В вариантах осуществления, при продукции и экспрессии из клеток, предлагаемый иммуномодулирующий белок представляет собой гомодимер, содержащий две идентичные полипептидные цепи.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок содержит первый иммуномодулирующий Fc-гибридный полипептид и второй иммуномодулирующий Fc-гибридный полипептид, в котором первый и второй полипептиды являются различными. В некоторых вариантах осуществления первый гибрид Fc полипептидов содержит Fc область и одну или несколько BIM и/или TIM, а второй гибриде полипептидов содержит Fc область и одну или несколько BIM и/или TIM. В таких вариантах осуществления Fc-область может быть областью, которая стимулирует или облегчает образование гетеродимеров.

В некоторых вариантах осуществления Fc-домен одного или обоих из первого и второго иммуномодулирующих Fc-гибридных полипептидов содержит модификацию (например, замену) таким образом, что интерфейс молекулы Fc модифицируется для облегчения и/или стимуляции гетеродимеризации. Способы, способствующие гетеродимеризации Fc-цепей, включают мутагенез Fc-области, такой как включение набора мутаций типа «выступ во впадину» или включение мутаций для осуществления электростатического взаимодействия Fc, способствующего притягивающим взаимодействиям между различными полипептидными цепями. В некоторых вариантах осуществления Fc-область гетеродимерной молекулы дополнительно может содержать одну или несколько других Fc-мутаций, таких как любая из описанных выше. В некоторых вариантах осуществления молекула гетеродимера содержит Fc-область с мутацией, которая снижает эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления такие Fc-области содержат мутации C220S, L234A, L235E и/или G237A по

нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любая из вышеуказанных мутаций в Fc-каркасе может быть произведена в аллотипе, содержащем остатки Глу (E) и Мет (M) в положениях 356 и 358 по нумерации EU. В других вариантах осуществления любая из вышеуказанных мутаций в Fc-каркасе может быть произведена в аллотипе, содержащем остаток Asp (D) и Leu (L) в положениях 356 и 358 по нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления модификации включают введение выступа (ручки) в первый Fc-полипептид и впадины (отверстия) во второй Fc-полипептид таким образом, что выступ может располагаться во впадине для содействия комплексообразованию первого и второго Fc-содержащих полипептидов. Аминокислоты, предназначенные для замены и/или модификации для создания выступов или впадин в полипептиде, обычно представляют собой интерфейсные аминокислоты, которые взаимодействуют или контактируют с одной или несколькими аминокислотами на интерфейсе второго полипептида.

В некоторых вариантах осуществления первый полипептид, который модифицирован, чтобы содержать аминокислоты выступа (ручки), включает замену нативной или исходной аминокислоты аминокислотой, которая имеет по меньшей мере одну боковую цепь, которая выступает из границы раздела первого полипептида и, следовательно, может располагаться в компенсационной полости (впадине) в смежном интерфейсе второго полипептида. Чаще всего заменяющей аминокислотой является та, которая имеет больший объем боковой цепи, чем исходный аминокислотный остаток. Специалист в данной области техники знает, как определить и/или оценить свойства аминокислотных остатков, чтобы идентифицировать те, которые являются идеальной заменой аминокислот для создания выступа. В некоторых вариантах осуществления замещающие остатки для образования выступа представляют собой натуральные аминокислотные остатки и включают, например, аргинин (R), фенилаланин (F), тирозин (Y) или триптофан (W). В некоторых примерах исходный остаток, идентифицированный для замены, представляет собой аминокислотный остаток, который имеет небольшую боковую цепь, такую как, например, аланин, аспарагин, аспарагиновая кислота, глицин, серин, треонин или валин.

В некоторых вариантах осуществления второй полипептид, который модифицирован, чтобы содержать полость (впадину), представляет собой такой полипептид, который включает замену нативной или исходной аминокислоты аминокислотой, которая имеет по меньшей мере одну боковую цепь, которая углублена от границы раздела второго полипептида и, таким образом, способна вмещать соответствующий выступ от границы раздела первого полипептида. Чаще всего

заменяющей аминокислотой является та, которая имеет меньший объем боковой цепи, чем исходный аминокислотный остаток. Специалист в данной области техники знает, как определить и/или оценить свойства аминокислотных остатков, чтобы идентифицировать те, которые являются идеальными заменяющими остатками для образования полости. Как правило, замещающие остатки для образования полости представляют собой натуральные аминокислоты и включают, например, аланин (A), серин (S), треонин (T) и валин (V). В некоторых примерах исходная аминокислота, идентифицированная для замены, представляет собой аминокислоту, имеющую большую боковую цепь, такую как, например, тирозин, аргинин, фенилаланин или триптофан.

Интерфейс CH3 человеческого IgG1, например, включает шестнадцать остатков в каждом домене, расположенных на четырех антипараллельных β-цепях, которые углублены на 1090 Å2 от каждой поверхности (см., например, Deisenhofer et al. (1981) Biochemistry, 20:2361-2370; Miller et al., (1990) J Mol. Biol., 216, 965-973; Ridgway et al., (1996) Prot. Engin., 9: 617-621; U.S. Pat. No. 5,731,168). Модификации домена CH3 для создания выступов или полостей описаны, например, в патенте США № 5,731,168; Международных патентных заявках WO98/50431 и WO 2005/063816; и and Ridgway et al., (1996) Prot. Engin., 9: 617-621. В некоторых примерах модификации домена CH3 для создания выступов или полостей обычно нацелены на остатки, расположенные на двух центральных антипараллельных β-цепях. Цель состоит в том, чтобы свести к минимуму риск того, что образующиеся выступы будут выдвинуты в окружающий растворитель, а не в компенсационную полость в партнерском домене CH3.

В некоторых вариантах осуществления гетеродимерная молекула содержит мутацию T366W в домене CH3 «цепи выступа» и мутации T366S, L368A, Y407V в домене CH3 «цепи впадины». В некоторых случаях также может быть использован дополнительный межцепочечный дисульфидный мостик между доменами CH3 (Merchant, A. M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681), например, путем введения мутации Y349C в домен CH3 цепи «выступов» или «впадин» и мутации E356C или мутации S354C в домен CH3 другой цепи. В некоторых вариантах гетеродимерная молекула содержит мутации S354C, T366W в одном из двух доменов CH3 и мутации Y349C, T366S, L368A, Y407V в другом из двух доменов CH3. Например, выступ Fc может включать последовательность, указанную в SEQ ID NO:669, содержащую S354C и T366W, и впадину Fc, указанную в SEQ ID NO:670, содержащую мутации Y349C, T366S, L368A и Y407V). В некоторых вариантах осуществления гетеродимерная молекула содержит мутации E356C, T366W в одном из двух доменов CH3 и мутации Y349C, T366S, L368A, Y407V в другом из двух доменов CH3. В некоторых вариантах осуществления

гетеродимерная молекула содержит мутации Y349C, T366W в одном из двух доменов CH3 и мутации E356C, T366S, L368A, Y407V в другом из двух доменов CH3. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерная молекула содержит мутации Y349C, T366W в одном из двух доменов CH3 и мутации S354C, T366S, L368A, Y407V в другом из двух доменов CH3. Примеры других технологий «выступ-во-впадину» в отверстия известны в данной области техники, например, как описано в EP 1 870 459 A1.

В некоторых вариантах осуществления вариант Fc, содержащий модификации выступа (ручки) или полости (впадины) CH3, может быть присоединен к мультидоменному иммуномодулирующему полипептиду в любом месте, но обычно через его N- или C-конец, к N- или C-концу одного или нескольких BIM или ТИМ, например, с образованием гибридного полипептида. Связь может быть прямой или опосредованной через линкер. Как правило, молекулу «выступ-во-впадину» генерируют путем совместной экспрессии первого сложенного иммуномодулирующего полипептида, связанного с вариантом Fc, содержащим модификацию (модификации) впадины CH3, со вторым сложенным иммуномодулирующим полипептидом, связанным с вариантом Fc, содержащим модификацию (модификации) полости CH3.

Примерные последовательности для выступа во впадину полипептидов Fc приведены в SEQ ID NO:716 и 717, соответственно. В некоторых вариантах осуществления выступ во впадину Fc области не имеет C-концевого лизина, соответствующего положению 232 дикого типа или немодифицированного Fc, указанного в SEQ ID NO:586 (соответствует K447del по нумерации EU). Примерные последовательности для полипептидов Fc выступа во впадину приведены в SEQ ID NO:669 и 670, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрен иммуномодулирующий белок, включающий первый полипептид, содержащий по меньшей мере одну BIM (например, как описано в Разделе III.A) и/или по меньшей мере одну TIM (например, любую, указанную в Разделе III. B), и первую вариантную Fc, указанную в SEQ ID NO:716; и второй полипептид, содержащий по меньшей мере одну BIM (например, как описано в Разделе III.A) и/или по меньшей мере одну TIM (например, любую, указанную в Разделе III. B), и вторую вариантную Fc, указанную в SEQ ID NO:717. В некоторых вариантах осуществления предусмотрен иммуномодулирующий белок, включающий первый полипептид, содержащий по меньшей мере одну BIM (например, как описано в Разделе III.A) и/или по меньшей мере одну TIM (например, любую, указанную в Разделе III.B), и первую вариантную Fc, указанную в SEQ ID NO:669; и второй полипептид, содержащий по меньшей мере одну BIM (например, как описано в Разделе III.A) и/или по

меньшей мере одну TIM (например, любую, указанную в Разделе III. B), и вторую вариантную Fc, указанную в SEQ ID NO:670. В некоторых вариантах осуществления, при получении и экспрессии из клеток предлагаемый иммуномодулирующий белок представляет собой гетеродимер, содержащий две различные полипептидные цепи. Например, один из полипептидов может экспрессировать TIM, а один из полипептидов может экспрессировать BIM.

В некоторых вариантах осуществления Fc-область каждого полипептида гетеродимера включает мутацию с измененной полярностью заряда на интерфейсе Fc-димера, так что совместная экспрессия электростатически подобранных Fc-цепей поддерживает благоприятные притягивающие взаимодействия, тем самым способствуя необходимому образованию Fc-гетеродимера, тогда как неблагоприятные взаимодействия с отталкивающим зарядом подавляют нежелательное образование Fc-гомодимера (Guneskaran et al. (2010) JBC, 285: 19637-19646). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один полипептид, содержащий BIM и/или TIM, связан прямо или опосредованно с Fc, содержащей мутации в положительно заряженных остатках (например, E356K, E357K и/или D399K по нумерации EU; обозначается цепью K), такой как указано в SEQ ID NO:729. В таких вариантах осуществления другой полипептид гетеродимера, содержащий BIM и/или TIM, связан прямо или опосредованно с Fc, содержащей мутации в отрицательно заряженных остатках (например, K370D, K392D и K409D по нумерации EU; обозначается цепью D), как указано в SEQ ID NO:730. При совместной экспрессии в клетке возможна ассоциация между цепями K и D, но цепи по существу не самоассоциируются из-за отталкивания заряда.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрен иммуномодулирующий белок, включающий первый полипептид, содержащий по меньшей мере одну BIM (например, как описано в Разделе III.A) и/или по меньшей мере одну TIM (например, любой, указанный в Разделе III. B), и первую вариантную Fc, указанную в SEQ ID NO:729; и второй полипептид, содержащий по меньшей мере одну BIM (например, как описано в Разделе III.A) и/или по меньшей мере одну TIM (например, любую, указанную в Разделе III.B), и вторую вариантную Fc, указанную в SEQ ID NO:730. В вариантах осуществления, при продукции и экспрессии из клеток, предлагаемый иммуномодулирующий белок представляет собой гетеродимер, содержащий две различные полипептидные цепи. Например, один из полипептидов может экспрессировать TIM, а один из полипептидов может экспрессировать BIM.

В некоторых вариантах осуществления отдельный полипептид мультидоменного полипептида или отдельные полипептиды однодоменного полипептида связаны с

доменом мультимеризации, который образует иммуномодулирующий белок, представляющий собой тример, тетрамер или пентамер. В некоторых вариантах осуществления отдельные полипептиды такой молекулы являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления такой домен мультимеризации представляет собой домен сборки белка олигомерного матрикса хряща (COMP), домен тетрамеризации фосфопротеина, стимулируемого вазодилататором (VASP), или домен ZymoZipper (ZZ) 12.6.

В некоторых вариантах осуществления домен мультимеризации представляет собой часть домена сборки белка олигомерного матрикса хряща (COMP) (Voulgaraki et al., Immunology (2005) 115(3):337-346). В некоторых примерах COMP представляет собой или содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:734 (например, аминокислоты 29-72 полноразмерного COMP, регистрационный номер Uniprot P49747) или последовательность, которая имеет 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO:734.

В некоторых вариантах осуществления домен мультимеризации представляет собой домен тетрамеризации фосфопротеина, стимулируемого вазодилататором (VASP) (Bachmann et al., J Biol Chem (1999) 274(33):23549-23557). В некоторых вариантах осуществления VASP представляет собой или содержит аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO:735 (например, аминокислоты 343-375 полноразмерного VASP; регистрационный номер Uniprot P50552) или последовательность, которая имеет 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO:735.

В некоторых вариантах осуществления домен мультимеризации представляет собой домен ZymoZipper (ZZ) 12.6. В некоторых вариантах осуществления домен ZZ представляет собой или содержит аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO:736 (см. патент США № 7,655,439), или последовательность, которая имеет 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO:736.

В некоторых конфигурациях первый и второй полипептиды гетеродимерного Fc-гибридного белка могут быть связаны с фрагментом для детекции и/или очистки. В некоторых аспектах первый и второй полипептиды связаны с различными метками или фрагментами. В некоторых аспектах метку или фрагмент первого и второго полипептида независимо выбирают из поли-гистидиновой метки (HHHHHH; SEQ ID NO:702), FLAG-маркера (DYKDDDDK; SEQ ID NO:588), Myc-метки или флуоресцентных белковых меток

(например, EGFP, указанной в SEQ ID NO:731, 732 или 733). В некоторых примерах первый полипептид, содержащий BIM, и второй полипептид, содержащий TIM, каждый дополнительно содержат фрагмент для детекции и/или очистки, такой как поли-гистидиновая метка (HHHHHH; SEQ ID NO:702) и/или FLAG-маркера (DYKDDDDK; SEQ ID NO:588).

В некоторых вариантах осуществления BIM и/или TIM напрямую связаны с последовательностью Fc. В некоторых вариантах осуществления BIM и/или TIM опосредованно связаны с последовательностью Fc, например, через линкер. В некоторых вариантах осуществления один или несколько «пептидных линкеров» связывают BIM и/или TIM и Fc-домен. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер может представлять собой один аминокислотный остаток или более по длине. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер имеет по меньшей мере один аминокислотный остаток, но не более 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, или 1 аминокислотных остатков по длине. Примеры линкеров приведены в подразделе «Линкер».

В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой (в однобуквенном аминокислотном коде): GGGGS («4GS»; SEQ ID NO:593) или мультимеры линкера 4GS, такие как повторы 2, 3, 4 или 5 линкеров 4GS. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой пептидный линкер $(GGGGS)_2$ (SEQ ID NO:594), $(GGGGS)_3$ (SEQ ID NO:595), $(GGGGS)_4$ (SEQ ID NO:600) или $(GGGGS)_5$ (SEQ ID NO:671). В некоторых вариантах осуществления линкер также может включать ряд остатков аланина отдельно или в дополнение к другому пептидному линкеру (такому как линкер 4GS или его мультимер). В некоторых вариантах осуществления линкером (в однобуквенном аминокислотном коде) является GSGGGGS (SEQ ID NO:590) или GGGGSSA (SEQ ID NO:596). В некоторых примерах линкер представляет собой 2xGGGGS, за которыми следуют три аланина (GGGGSGGGGSAAA; SEQ ID NO:721).

Также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие иммуномодулирующий белок. В некоторых вариантах осуществления для получения иммуномодулирующего белка молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую иммуномодулирующий белок, вставляют в соответствующий вектор экспрессии. Полученный иммуномодулирующий белок может экспрессироваться в клетках-хозяевах, трансформированных с помощью экспрессии, где сборка между Fc-доменами происходит посредством межцепочечных дисульфидных связей, образующихся между Fc-фрагментами, с получением димерных, таких как двухвалентные, иммуномодулирующих белков.

Полученный иммуномодулирующий белок, содержащий BIM, TIM и Fc, может быть легко очищен аффинной хроматографией на колонках с белком A или белком G. Для получения гетеродимеров могут потребоваться дополнительные стадии очистки. Например, когда две нуклеиновые кислоты, кодирующие разные иммуномодулирующие белки, трансформируются в клетки, образование гетеродимеров должно быть достигнуто биохимически, поскольку иммуномодулирующий белок, несущий Fc-домен, также будет экспрессироваться в виде гомодимеров, связанных дисульфидом. Таким образом, гомодимеры могут быть восстановлены в условиях, способствующих разрушению межцепочечных дисульфидов, но не оказывающих влияния на внутрицепочечные дисульфиды. В некоторых случаях различные иммуномодулирующие белковые мономеры смешивают в эквимолярных количествах и окисляют с образованием смеси гомо- и гетеродимеров. Фрагменты этой смеси разделяют хроматографическими методами. Альтернативно, образование этого типа гетеродимера может быть смещено путем генной инженерии и экспрессии иммуномодулирующих белков, содержащих молекулы Fc-гибрида, которые содержат одну или несколько BIM и/или TIM, с использованием методов «выступ-во-впадину», описанных ниже.

3. МЕТКИ ИЛИ ФРАГМЕНТЫ

В некоторых вариантах осуществления один или несколько полипептидов, содержащих BIM и/или TIM в предоставленных иммуномодулирующих белках, могут дополнительно включать метку или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления дополнительная часть представляет собой белок, пептид, малую молекулу или нуклеиновую кислоту. В некоторых случаях иммуномодулирующий белок связан, прямо или опосредованно, с одним или несколькими дополнительными фрагментами, такими как 2, 3, 4, 5 или 6 дополнительных фрагментов.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент представляет собой молекулу, продлевающую период полужизни. Примеры таких молекул, продлевающих период полужизни, включают, без ограничения указанными, альбумин, альбуминсвязывающий полипептид, Pro/Ala/Ser (PAS), C-концевой пептид (CTP) бета-субъединицы человеческого хорионического гонадотропина, полиэтиленгликоль (PEG), длинные неструктурированные гидрофильные последовательности из аминокислот (XTEN), гидроксиэтилкрахмал (HES), малую молекулу, связывающую альбумин, или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий полипептид, содержащий BIM и/или TIM, может включать конформационно неупорядоченные полипептидные последовательности, состоящие из аминокислот Pro, Ala и Ser (см.,

например, WO2008/155134, SEQ ID NO:904). В некоторых случаях аминокислотный повтор составляет по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более аминокислотных остатков, где каждый повтор содержит остаток (остатки) Ala, Ser и Pro. Таким образом, представленный в настоящей заявке иммуномодулирующий белок представляет собой PAS-илированный белок, в котором BIM и/или TIM связаны, прямо или опосредованно через линкер, с Pro/Ala/Ser (PAS). В некоторых вариантах осуществления может быть использована одна или несколько дополнительных линкерных структур.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент облегчает детекцию или очистку иммуномодулирующего белка. В некоторых случаях иммуномодулирующий белок, такой как по меньшей мере один из или каждый из полипептидов мультимера (например, димера, тримера, тетрамера или пентамера), содержит связанную метку или фрагмент, например, аффинную или очищающую метку. В некоторых аспектах такая метка или фрагмент могут быть связаны прямо или опосредованно через линкер с N- и/или C-концом полипептида. Известны различные подходящие полипептидные метки и/или домены гибридизации, которые включают, без ограничения указанными, поли-гистидиновую (His) метку (SEQ ID NO:702), FLAG-маркер (SEQ ID NO:588), Myc-метку и флуоресцентные белковые метки (например, EGFP, указанный в SEQ ID NO:734, 735 или 736. В некоторых случаях метка представляет собой метку His, содержащую по меньшей мере шесть остатков гистидина (указано в SEQ ID NO:702).

В некоторых случаях иммуномодулирующий белок, содержащий BIM и TIM, дополнительно содержит различные комбинации фрагментов. Например, иммуномодулирующий белок, содержащий BIM или TIM, дополнительно содержит одну или несколько полигистидиновых меток и FLAG-маркеров. В некоторых случаях комбинация фрагментов, таких как два или более фрагментов, может быть включена в один и тот же полипептид. В некоторых случаях комбинация фрагментов, таких как два или более фрагментов, может быть включена в другой полипептид, например, в связи с вариантами осуществления, относящимися к гетеродимерным иммуномодулирующим полипептидам.

IV. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ, ВЕКТОРЫ И СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИПЕПТИДОВ ИЛИ КЛЕТОК

Представленные в настоящей заявке изолированные или рекомбинантные нуклеиновые кислоты совместно называются «нуклеиновыми кислотами», которые кодируют любой из представленных здесь иммуномодулирующих белков. В некоторых вариантах осуществления представленные здесь нуклеиновые кислоты, включая все

описанные ниже, пригодны для рекомбинантного получения (например, экспрессии) иммуномодулирующих белков, представленных здесь. В некоторых вариантах осуществления представленные в настоящей заявке нуклеиновые кислоты, включая все описанные ниже, полезны для экспрессии иммуномодулирующих белков, представленных здесь, таких как белки гибридизации BCMA или мультидоменные иммуномодулирующие белки, представленные здесь. Представленные здесь нуклеиновые кислоты могут быть в форме РНК или в форме ДНК, и включают мРНК, кРНК, рекомбинантные или синтетические РНК и ДНК и кДНК. Представленные в настоящей заявке нуклеиновые кислоты обычно представляют собой молекулы ДНК, и обычно двухцепочечные молекулы ДНК. Однако также предусмотрены одноцепочечная ДНК, одноцепочечная РНК, двухцепочечная РНК и гибридные нуклеиновые кислоты ДНК/РНК или их комбинации, содержащие любую из нуклеотидных последовательностей по изобретению.

В некоторых случаях к нуклеиновой кислоте, кодирующей иммуномодулирующий белок, может быть добавлен гетерологичный (ненативный) сигнальный пептид. Это может быть необходимо, например, в случае экспрессии гибридных белков BCMA или предоставляемых мультидоменных иммуномодулирующих белков, которые не содержат аминоконцевой сигнальной последовательности. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид представляет собой сигнальный пептид из иммуноглобулина (такого как тяжелая цепь IgG или легкая цепь IgG-каппа), цитокина (такого как интерлейкин-2 (IL-2) или CD33), белка сывороточного альбумина (например, HSA или альбумин), сигнальную последовательность препротеина азуроцидина человека, люциферазу, трипсиноген (например, химотрипсиноген или трипсиноген) или другой сигнальный пептид, способный эффективно экспрессировать и, в некоторых аспектах, секретировать белок из клетки. Примеры сигнальных пептидов включают любые, описанные в Таблице 5.

Таблица 5. Примерные сигнальные пептиды

SEQ ID NO	Сигнальный пептид	Пептидная последовательность
SEQ ID NO:737	HSA сигнальный пептид	MKWVTFISLLFLFSSAYS
SEQ ID NO:738	Ig каппа легкая цепь	MDMRAPAGIFGFLLVLFPGYRS
SEQ ID NO:739	Сигнальная последовательность препротеина азуроцидина человека	MTRLTVLALLAGLLASSRA
SEQ ID NO:740	Сигнальный пептид тяжелой цепи IgG	MELGLSWIFLLAILKGVQC
SEQ ID NO:741	Сигнальный пептид тяжелой цепи IgG	MELGLRWVFLVAILEGVQC
SEQ ID NO:742	Сигнальный пептид тяжелой цепи IgG	MKHLWFFLLLVAAPRWVLS
SEQ ID NO:743	Сигнальный пептид тяжелой цепи IgG	MDWTWRILFLVAAATGAHS
SEQ ID NO:744	Сигнальный пептид тяжелой цепи IgG	MDWTWRFLFVVAAATGVQS
SEQ ID NO:745	Сигнальный пептид тяжелой цепи IgG	MEFGLSWLFLVAILKGVQC
SEQ ID NO:746	Сигнальный пептид тяжелой цепи IgG	MEFGLSWVFLVALFRGVQC
SEQ ID NO:747	Сигнальный пептид тяжелой цепи IgG	MDLLHKNMKHLWFFLLLVAAPR WVLS

SEQ ID NO:748	Сигнальная последовательность легкой цепи IgG каппа	MDMRVPAQLLGLLLLWLSGARC
SEQ ID NO:749	Сигнальная последовательность легкой цепи IgG каппа	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA
SEQ ID NO:750	Люцифераза Gaussia	MGVKVLFALICIAVAEA
SEQ ID NO:751	Альбумин человека	MKWVTFISLLFLFSSAYS
SEQ ID NO:752	Химитрипсиноген человека	MAFLWLLSCWALLGTTFG
SEQ ID NO:753	Интерлейкин-2 человека	MQLLSCIALILALV
SEQ ID NO:754	Трипсиноген-2 человека	MNLLLILTFVAAAVA

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок содержит сигнальный пептид при экспрессии, и сигнальный пептид (или его часть) отщепляется от иммуномодулирующего белка при секреции.

В настоящей заявке также представлены рекомбинантные векторы экспрессии и рекомбинантные клетки-хозяева, пригодные для продукции иммуномодулирующих белков, таких как гибридные белки BCMA или мультидоменные иммуномодулирующие белки, представленные в настоящей заявке.

В любом из вышеописанных вариантов осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие представленные здесь иммуномодулирующие полипептиды, могут быть введены в клетки с использованием рекомбинантной ДНК и методов клонирования. Для этого получают рекомбинантную молекулу ДНК, кодирующую иммуномодулирующий полипептид. Способы получения таких молекул ДНК хорошо известны в данной области техники. Например, последовательности, кодирующие пептиды, могут быть вырезаны из ДНК с использованием подходящих ферментов рестрикции. Альтернативно, молекула ДНК может быть синтезирована с использованием методов химического синтеза, таких как фосфорамидитный метод. Кроме того, можно использовать комбинацию этих методов. В некоторых случаях рекомбинантная или синтетическая нуклеиновая кислота может быть получена с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Вставка ДНК, кодирующая иммуномодулирующий белок, может быть клонирована в соответствующий вектор трансдукции/трансфекции, как известно специалистам в данной области техники. Также предоставляются векторы экспрессии, содержащие молекулы нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления векторы экспрессии способны экспрессировать иммуномодулирующие белки в соответствующей клетке в условиях, подходящих для экспрессии белка. В некоторых аспектах молекула нуклеиновой кислоты или вектор экспрессии содержат молекулу ДНК, которая кодирует иммуномодулирующий белок, функционально связанный с соответствующими последовательностями, контролирующими экспрессию. Способы осуществления этого функционального

связывания либо до, либо после введения молекулы ДНК в вектор хорошо известны. Последовательности, контролирующие экспрессию, включают промоторы, активаторы, энхансеры, операторы, сайты связывания с рибосомами, стартовые сигналы, стоп-сигналы, сигналы кэпирования, сигналы полиаденилирования и другие сигналы, связанные с контролем транскрипции или трансляции.

В некоторых вариантах осуществления экспрессия иммуномодулирующего белка контролируется промотором или энхансером для контроля или регуляции экспрессии. Промотор функционально связан с частью молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей вариантный полипептид или иммуномодулирующего белка.

Полученный рекомбинантный экспрессионный вектор, содержащий молекулу ДНК, используют для трансформации соответствующего хозяина. Эта трансформация может быть выполнена с использованием методов, хорошо известных в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления представленная в настоящей заявке нуклеиновая кислота дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует секреторный или сигнальный пептид, функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей иммуномодулирующий полипептид, так что полученный растворимый иммуномодулирующий полипептид извлекают из культуральной среды, клетки-хозяина или периплазмы клетки-хозяина. В других вариантах осуществления соответствующие сигналы управления экспрессией выбирают для обеспечения мембранной экспрессии иммуномодулирующего полипептида. Кроме того, коммерчески доступные наборы, а также компании-производители по контракту также могут быть использованы для получения инженерных клеток или рекомбинантных клеток-хозяев, представленных в настоящей заявке.

В некоторых вариантах осуществления результирующий вектор экспрессии, содержащий молекулу ДНК на нем, используют для трансформации, такой как трансдукция, соответствующей клетки. Введение может быть выполнено с использованием способов, хорошо известных в данной области техники. Примеры способов включают способы переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рецепторы, в том числе посредством вирусной, например, ретровирусной или лентивирусной, трансдукции, транспозонов и электропорации. В некоторых вариантах осуществления вектор экспрессии является вирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту переносят в клетки с помощью методов лентивирусной или ретровирусной трансдукции.

Любая из большого числа общедоступных и хорошо известных клеток-хозяев млекопитающих, включая Т-клетки млекопитающих или APC, может быть использована

при получении полипептидов или сконструированных клеток. Выбор клетки зависит от ряда факторов, признанных в данной области техники. Они включают, например, совместимость с выбранным вектором экспрессии, токсичность пептидов, кодируемых молекулой ДНК, скорость трансформации, легкость извлечения пептидов, характеристики экспрессии, биологическую безопасность и затраты. Необходимо соблюдать баланс этих факторов с пониманием того, что не все клетки могут быть одинаково эффективны для экспрессии определенной последовательности ДНК.

В некоторых вариантах клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего. Примеры подходящих клеток-хозяев млекопитающих включают клетки почек африканской зеленой мартышки (Vero; ATCC CRL 1587), клетки эмбриональной почки человека (293-HEK; ATCC CRL 1573), клетки почек хомячка (BHK-21, BHK-570; ATCC CRL 8544, ATCC CRL 10314), клетки почек собаки (MDCK; ATCC CCL 34), клетки яичников китайского хомячка (CHO-K1; ATCC CCL61; CHO DG44 (Chasin et al., Som. Клетка. Молек. Genet. 12:555, 1986)), клетки гипофиза крысы (GH1; ATCC CCL82), клетки HeLa S3 (ATCC CCL2.2), клетки гепатомы крысы (H-4-II-E; ATCC CRL 1548), SV40-трансформированные клетки почек обезьяны (COS-1; ATCC CRL 1650) и эмбриональные клетки мыши (NIH-3T3; ATCC CRL 1658).

В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева могут представлять собой различные эукариотические клетки, такие как клетки дрожжей, или клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомяка (CHO) или клетки HEK293. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой суспензионную клетку, и полипептид сконструирован или продуцируется в культивируемой суспензии, такой как в культивируемых суспензионных клетках CHO, например, клетках CHO-S. В некоторых примерах клеточная линия представляет собой клеточную линию CHO с дефицитом DHFR (DHFR-), такую как DG44 и DUXB11. В некоторых вариантах осуществления клетка является дефицитной по глутаминсинтазе (GS), например, клетки CHO-S, клетки CHOK1 SV и клетки CHOZN((R)) GS-/-. В некоторых вариантах осуществления клетки CHO, такие как суспензионные клетки CHO, могут быть клетками CHO-S-2H2, клетками CHO-S-клон 14 или клетками ExpiCHO-S.

В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева также могут быть прокариотическими клетками, такими как E. coli. Трансформированного рекомбинантного хозяина культивируют в условиях экспрессии полипептида, а затем очищают для получения растворимого белка. Рекомбинантные клетки-хозяева можно культивировать в обычных условиях ферментации таким образом, чтобы экспрессировались необходимые полипептиды. Такие условия ферментации хорошо известны в данной области техники.

Наконец, представленные здесь полипептиды могут быть выделены и очищены из рекомбинантных клеточных культур любым из ряда методов, хорошо известных в данной области техники, включая осаждение сульфатом аммония или этанолом, кислотную экстракцию, анионную или катионообменную хроматографию, фосфоцеллюлозную хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия и аффинную хроматографию. Стадии рефолдинга белка могут быть использованы, при необходимости, для завершения конфигурации зрелого белка. Наконец, на заключительных стадиях очистки можно использовать высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ).

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор является вирусным вектором. Примеры рекомбинантных вирусных векторов включают лентивирусный векторный геном, поксвирусный векторный геном, векторный геном вируса осповакцины, векторный геном аденовируса, векторный геном аденоассоциированного вируса, векторный геном вируса герпеса и векторный геном альфа-вируса. Вирусные векторы могут быть живыми, аттенуированными, с условной репликацией или с дефицитом репликации, непатогенными (дефектными), репликационно-компетентными вирусными векторами и/или модифицированными для экспрессии гетерологичного генного продукта, например, вариантных иммуномодулирующих полипептидов, представленных в настоящей заявке. Векторы для генерации вирусов также могут быть модифицированы для изменения аттенуации вируса, что включает любой способ увеличения или уменьшения транскрипционной или трансляционной нагрузки.

Примеры вирусных векторов, которые могут быть использованы, включают модифицированные векторы вируса осповакцины (см., например, Guerra et al., J. Virol. 80:985-98 (2006); Tartaglia et al., AIDS Research and Human Retroviruses 8: 1445-47 (1992); Gheradi et al., J. Gen. Virol. 86:2925-36 (2005); Mayr et al., Infection 3:6-14 (1975); Hu et al., J. Virol. 75: 10300-308 (2001); Патенты США № 5,698,530, 6,998,252, 5,443,964, 7,247,615 и 7,368,116); аденовирусный вектор или аденовирус-ассоциированные вирусные векторы (см., например, Molin et al., J. Virol. 72:8358-61 (1998); Narumi et al., Am J. Respir. Cell Mol. Biol. 19:936-41 (1998); Mercier et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:6188-93 (2004); патенты США № 6,143,290; 6,596,535; 6,855,317; 6,936,257; 7,125,717; 7,378,087; 7,550,296); ретровирусные векторы, включая векторы на основе вируса лейкоза мыши (MuLV), вируса лейкоза гиббона (GaLV), экотропных ретровирусов, вируса иммунодефицита обезьян (SIV), вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и комбинации (см., например, Buchscher et al., J. Virol. 66:2731-39 (1992); Johann et al., J. Virol. 66: 1635-40 (1992); Sommerfelt et al., Virology 176:58-59 (1990); Wilson et al., J. Virol. 63:2374-78 (1989); Miller et al., J. Virol. 65:2220-24 (1991); Miller et al., Mol. Cell Biol. 10:4239 (1990); Kolberg, NIH

Res. 4:43 1992; Cornetta et al., Hum. Gene Ther. 2:215 (1991)); лентивирусные векторы, включая векторы на основе вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1), ВИЧ-2, вируса иммунодефицита кошек (FIV), вируса инфекционной анемии лошадей, вируса иммунодефицита обезьян (SIV) и вируса Маеди/висна (см., например, Pfeifer et al., Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2: 177-211 (2001); Zufferey et al., J. Virol. 72: 9873, 1998; Miyoshi et al., J. Virol. 72:8150, 1998; Philpott and Thrasher, Human Gene Therapy 18:483, 2007; Engelman et al., J. Virol. 69: 2729, 1995; Nightingale et al., Mol. Therapy, 13: 1121, 2006; Brown et al., J. Virol. 73:9011 (1999); WO 2009/076524; WO 2012/141984; WO 2016/011083; McWilliams et al., J. Virol. 77: 11150, 2003; Powell et al., J. Virol. 70:5288, 1996) или любые их варианты и/или векторы, которые могут быть использованы для генерации любого из вирусов, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор может включать регуляторные последовательности, такие как промоторные или энхансерные последовательности, которые могут регулировать экспрессию вирусного генома, например, в случае РНК-вирусов, в упаковочной клеточной линии (см., например, патенты США №5,385,839 и 5168 062).

В некоторых аспектах нуклеиновые кислоты или вектор экспрессии содержат последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует иммуномодулирующий белок, функционально связанный с соответствующими последовательностями контроля экспрессии. Способы осуществления этого функционального связывания либо до, либо после введения в вектор последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуномодулирующий белок, хорошо известны. Последовательности, контролирующие экспрессию, включают промоторы, активаторы, энхансеры, операторы, сайты связывания с рибосомами, стартовые сигналы, стоп-сигналы, сигналы кэпирования, сигналы полиаденилирования и другие сигналы, связанные с контролем транскрипции или трансляции. Промотор может быть функционально связан с частью последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуномодулирующий белок.

Транскрипционные регуляторные последовательности включают промоторную область, достаточную для направления инициации синтеза РНК. Подходящие эукариотические промоторы включают промотор гена металлотионеина I мыши (Hamer et al., J. Molec. Appl Genet. 1:273 (1982)), промотор TK вируса герпеса (McKnight, Cell 31:355 (1982)), ранний промотор SV40 (Benoist et al., Nature 290:304 (1981)), промотор вируса саркомы Payca (Gorman et al, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 79:6777 (1982)), промотор цитомегаловируса (Foecking et al., Gene 45:101 (1980)) и промотор вируса опухоли молочной железы мыши (см., в общем, Etcheverry, "Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture," in Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland et al. (eds.),

pages 163-181 (John Wiley & Sons, Inc. 1996)). Одна полезная комбинация промотора и энхансера обеспечивается промотором вируса миелопролиферативной саркомы и энхансером вируса цитомегаловируса человека.

Альтернативно, прокариотический промотор, такой как промотор РНК-полимеразы бактериофага Т3, может быть использован для контроля продукции иммуномодулирующего белка в клетках млекопитающих, если прокариотический промотор регулируется эукариотическим промотором (Zhou et al., Mol Cell. Biol. 10:4529 (1990), и Kaufman et al, Nucl. Acids Res. 19:4485 (1991)).

Вектор экспрессии может быть введен в клетки-хозяева с использованием множества стандартных методик, включая трансфекцию фосфатом кальция, трансфекцию, опосредованную липосомами, доставку, опосредованную микроинъекцией, электропорацию и тому подобное. Трансфицированные клетки могут быть отобраны и размножены для получения рекомбинантных клеток-хозяев, которые содержат вектор экспрессии, стабильно интегрированный в геном клетки-хозяина. Методы введения векторов в эукариотические клетки и методы отбора таких стабильных трансформантов с использованием доминантного селектируемого маркера описаны, например, в Ausubel (1995) и Murray (ред.), Gene Transfer and Expression Protocols (Humana Press 1991).

Например, одним подходящим селектируемым маркером является ген, который обеспечивает устойчивость к антибиотику неомицину. В этом случае отбор проводят в присутствии лекарственного средства типа неомицина, такого как G-418 или подобного. Системы отбора также могут быть использованы для повышения уровня экспрессии интересующего гена, в процессе, называемом «амплификацией». Амплификацию осуществляют путем культивирования трансфектантов в присутствии низкого уровня селективного агента и последующего увеличения количества селективного агента для отбора клеток, которые продуцируют высокие уровни продуктов введенных генов. Подходящим амплифицируемым селектируемым маркером является дигидрофолатредуктаза, которая придает устойчивость к метотрексату. Также могут быть использованы другие гены лекарственной устойчивости (например, устойчивости к гигромицину, множественной лекарственной устойчивости, пуромицин-ацетилтрансферазы). Альтернативно, маркеры, которые вводят измененный фенотип, такие как зеленый флуоресцентный белок, или белки клеточной поверхности, такие как CD4, CD8, MHC класса I, плацентарная щелочная фосфатаза, могут быть использованы для сортировки трансфицированных клеток от нетрансфицированных клеток с помощью таких средств, как сортировка FACS или технология разделения магнитных гранул.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды, представленные в настоящей

заявке, также могут быть получены синтетическими способами. Твердофазный синтез является предпочтительным методом получения индивидуальных пептидов, поскольку это наиболее экономичный метод получения небольших пептидов. Например, хорошо известные методы твердофазного синтеза включают использование защитных групп, линкеров и твердофазных носителей, а также специфические условия реакции защиты и снятия защиты, условия расщепления линкера, использование поглотителей и другие аспекты твердофазного пептидного синтеза. Затем пептиды могут быть собраны в полипептиды, как предусмотрено в настоящей заявке.

V. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ

Представленные в настоящей заявке композиции, содержащие любой из представленных иммуномодулирующих белков, описанных здесь. Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. Например, фармацевтическая композиция может содержать одно или несколько вспомогательных веществ для модификации, поддержания или консервации, например, pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникновения композиции. Такие композиции могут содержать буферы, такие как нейтральный забуференный физиологический раствор, фосфатный забуференный физиологический раствор и т.п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннитол; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия); и консерванты.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция представляет собой твердое вещество, такое как порошок, капсула или таблетка. Например, фрагменты фармацевтической композиции могут быть лиофилизированы. В некоторых вариантах твердую фармацевтическую композицию восстанавливают или растворяют в жидкости перед введением.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция представляет собой жидкость, например, иммуномодулирующие белки, растворенные в водном растворе (таком как физиологический раствор или раствор Рингера). В некоторых вариантах осуществления pH фармацевтической композиции находится между примерно 4,0 и примерно 8,5 (например, между примерно 4,0 и примерно 5,0, между примерно 4,5 и примерно 5,5, между примерно 5,0 и примерно 6,0, между примерно 5,5 и примерно 6,5, между примерно 6,0 и примерно 7,0, между примерно 6,5 и примерно 7,5, между примерно 7,0 и примерно 8,0, или между примерно 7,5 и примерно 8,5).

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, например, наполнитель, связующий агент, покрытие, консервант, любрикант, ароматизатор, подсластитель, краситель, растворитель, буферный агент, хелатирующий агент или стабилизатор. Примеры фармацевтически приемлемых наполнителей включают целлюлозу, двухосновный фосфат кальция, карбонат кальция, микрокристаллическую целлюлозу, сахарозу, лактозу, глюкозу, маннитол, сорбитол, мальтол, прежелатинизированный крахмал, кукурузный крахмал или картофельный крахмал. Примеры фармацевтически приемлемых связующих агентов включают поливинилпирролидон, крахмал, лактозу, ксилитол, сорбитол, мальтитол, желатин, сахарозу, полиэтиленгликоль, метилцеллюлозу или целлюлозу. Примеры фармацевтически приемлемых покрытий включают гидроксипропилметилцеллюлозу (HPMC), шеллак, зеин кукурузного белка или желатин. Примеры фармацевтически приемлемых дезинтегрантов включают поливинилпирролидон, карбоксиметилцеллюлозу или натрия крахмалгликолят. Примеры фармацевтически приемлемых любрикантов включают полиэтиленгликоль, стеарат магния или стеариновую кислоту. Примеры фармацевтически приемлемых консервантов включают метилпарабены, этилпарабены, пропилпарабен, бензойную кислоту или сорбиновую кислоту. Примеры фармацевтически приемлемых подсластителей включают сахарозу, сахарин, аспартам или сорбитол. Примеры фармацевтически приемлемых буферных агентов включают карбонаты, цитраты, глюконаты, ацетаты, фосфаты или тартраты.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит средство для контролируемого или пролонгированного высвобождения продукта, такое как вводимые микросферы, биодеградируемые частицы, полимерные соединения (полимолочная кислота, полигликолевая кислота), гранулы или липосомы.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция является стерильной. Стерилизация может быть осуществлена путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны или облучения. Если композиция лиофилизирована, стерилизацию с использованием этого способа можно проводить либо до, либо после лиофилизации и восстановления. Композиция для парентерального введения может храниться в лиофилизированной форме или в растворе. Кроме того, парентеральные композиции обычно помещают в контейнер, имеющий стерильное отверстие для доступа, например, пакет для раствора для внутривенного введения или флакон, имеющий пробку, прокалываемую иглой для подкожных инъекций.

Фармацевтически приемлемым носителем может быть фармацевтически приемлемый материал, композиция или растворитель. Например, носителем может быть жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, вспомогательное вещество, растворитель или инкапсулирующий материал, или какая-либо их комбинация. Каждый компонент носителя должен быть «фармацевтически приемлемым» в том смысле, что он должен быть совместим с другими ингредиентами композиции. Он также должен быть пригоден для контакта с любой тканью, органом или частью тела, с которыми он может контактировать, что означает, что он не должен нести риск токсичности, раздражения, аллергической реакции, иммуногенности или любых других осложнений, которые чрезмерно перевешивают его терапевтические преимущества.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят субъекту. Как правило, дозы и пути введения фармацевтической композиции определяются в соответствии с размером и состоянием субъекта, в соответствии со стандартной фармацевтической практикой. Например, терапевтически эффективная доза может быть первоначально оценена либо в анализах клеточной культуры, либо на животных моделях, таких как мыши, крысы, кролики, собаки, свиньи или обезьяны. Модель на животных также может быть использована для определения соответствующего диапазона концентраций и способа введения. Такая информация затем может быть использована для определения полезных доз и путей введения у людей. Точная дозировка будет определена в свете факторов, связанных с субъектом, нуждающимся в лечении. Дозировку и способ введения подбирают таким образом, чтобы обеспечить достаточный уровень активного соединения или поддерживать необходимый эффект. Факторы, которые могут быть приняты во внимание, включают тяжесть патологического состояния, общее состояние здоровья субъекта, возраст, массу тела и пол субъекта, время и частоту введения, комбинацию (комбинации) лекарственных средств, аллергические реакции и ответ на терапию.

Фармацевтические композиции длительного действия можно вводить каждые 3-4 дня, каждую неделю или раз в две недели в зависимости от периода полужизни и скорости выведения конкретной композиции. Частота введения будет зависеть от фармакокинетических параметров вещества в используемом препарате. Обычно композицию вводят до тех пор, пока не будет достигнута доза, которая обеспечивает необходимый эффект. Следовательно, композицию можно вводить в виде однократной дозы или в виде многократных доз (в одинаковых или различных концентрациях/дозировках) с течением времени или в виде непрерывной инфузии. Обычно производят дальнейшее уточнение соответствующей дозировки. Подходящие

дозы могут быть установлены с помощью соответствующих данных о зависимости ответа от дозы.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят субъекту любым путем, в том числе перорально, трансдермально, путем ингаляции, внутривенно, внутриартериально, внутримышечно, прямым нанесением на место раны, нанесением на место операции, интраперитонеально, с помощью суппозитория, подкожно, внутрикожно, чрескожно, путем распыления, интраплевральным, интравентрикулярным, внутрисуставным, внутриглазным или интраспинальным путем.

Предоставленная фармацевтическая композиция может, например, быть в форме, подходящей для внутривенной инфузии.

В некоторых вариантах осуществления дозировка фармацевтической композиции представляет собой однократную дозу или повторную дозу. В некоторых вариантах осуществления дозы вводят субъекту один раз в сутки, два раза в сутки, три раза в сутки или четыре или более раз в сутки. В некоторых вариантах осуществления примерно 1 или более (например, примерно 2 или более, примерно 3 или более, примерно 4 или более, примерно 5 или более, примерно 6 или более, или примерно 7 или более) доз вводят в неделю. В некоторых вариантах осуществления вводят многократные дозы в течение дней, недель, месяцев или лет. В некоторых вариантах осуществления курс лечения составляет примерно 1 или более доз (например, примерно 2 или более доз, примерно 3 или более доз, примерно 4 или более доз, примерно 5 или более доз, примерно 7 или более доз, примерно 10 или более доз, примерно 15 или более доз, примерно 25 или более доз, примерно 40 или более доз, примерно 50 или более доз или примерно 100 или более доз).

В некоторых вариантах осуществления вводимая доза фармацевтической композиции составляет примерно 1 мкг белка на кг массы тела субъекта или более (например, примерно 2 мкг белка на кг массы тела субъекта или более, примерно 5 мкг белка на кг массы тела субъекта или более, примерно 10 мкг белка на кг массы тела субъекта или более, примерно 25 мкг белка на кг массы тела субъекта или более, примерно 50 мкг белка на кг массы тела субъекта или более, примерно 100 мкг белка на кг массы тела субъекта или более, примерно 250 мкг белка на кг массы тела субъекта или более, примерно 500 мкг белка на кг массы тела субъекта или более, примерно 1 мг белка на кг массы тела субъекта или более, примерно 2 мг белка на кг массы тела субъекта или более, или примерно 5 мг белка на кг массы тела субъекта или более).

VI. СПОСОБЫ ОЦЕНКИ АКТИВНОСТИ И ИММУНОМОДУЛЯЦИИ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ БЕЛКОВ

В некоторых вариантах осуществления предоставленные иммуномодулирующие

белки, такие как гибридные белки BCMA или представленные в настоящей заявке мультидоменные иммуномодулирующие белки, проявляют иммуномодулирующую активность. Предоставленные иммуномодулирующие белки, такие как гибридные белки BCMA или мультидоменные иммуномодулирующие белки, могут модулировать активность B-клеток, такую как одна или несколько из пролиферации, дифференцировки или выживания B-клеток. В некоторых случаях предоставленные иммуномодулирующие белки, такие как мультидоменные иммуномодулирующие белки, могут дополнительно модулировать активацию или ответ T-клеток. В некоторых вариантах осуществления активация или ответ T-клеток снижаются, уменьшаются или ослабляются.

Функция иммуномодулирующих белков может быть исследована с использованием различных подходов для оценки способности белков связываться с когнатными партнерами по связыванию. Например, гибридные белки BCMA могут быть оценены на связывание с APRIL или BAFF. В случае мультидоменных иммуномодулирующих белков эти белки могут быть оценены на связывание с когнатным партнером по связыванию, таким как лиганд рецептора, стимулирующего T-клетки (например, CD80 или CD86), или непосредственно с рецептором, стимулирующим T-клетки (например, CD28), и/или с лигандом рецептора, стимулирующего B-клетки (например, APRIL или BAFF). Известно множество анализов для оценки аффинности связывания и/или определения того, специфически ли связывающая молекула (например, иммуномодулирующий белок) связывается с конкретным партнером по связыванию. Специалист в данной области техники может определить аффинность связывания связывающей молекулы, например, иммуномодулирующего белка, для партнера по связыванию, например, APRIL или BAFF, например, с использованием любого из ряда анализов связывания, которые хорошо известны в данной области техники. Известны различные анализы связывания, которые включают, без ограничения указанными, например, ELISA K_D, KinExA, проточную цитометрию и/или анализ поверхностного плазмонного резонанса), включая описанные в настоящей заявке. Такие способы включают, без ограничения указанными, методы, включающие BIAcore®, Octet® или проточную цитометрию. Например, в некоторых вариантах осуществления прибор BIAcore® может быть использован для определения кинетики связывания и констант комплекса между двумя белками с использованием анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (см., например, Scatchard et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660, 1949; Wilson, Science 295:2103, 2002; Wolff et al., Cancer Res. 53:2560, 1993; и патенты США № 5,283,173, 5,468,614 или эквивалентные). SPR определяет изменения концентрации молекул на поверхности датчика по мере того, как молекулы связываются с поверхностью или диссоциируют от нее. Изменение сигнала SPR

прямо пропорционально изменению массовой концентрации вблизи поверхности, что позволяет оценивать кинетику связывания между двумя молекулами. Константу диссоциации для комплекса можно определить, отслеживая изменения показателя преломления во времени при пропускании буфера через чип. Другие подходящие анализы для измерения связывания одного белка с другим включают, например, иммуноанализы, такие как иммуноферментный анализ (ELISA) и радиоиммуноанализ (РИА), или определение связывания путем мониторинга изменения спектроскопических или оптических свойств белков посредством флуоресценции, поглощения УФ-излучения, кругового дихроизма или ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Другие примеры анализов включают, без ограничения указанными, вестерн-блоттинг, ELISA, аналитическое ультрацентрифугирование, спектроскопию, проточную цитометрию, секвенирование и другие методы для обнаружения экспрессируемых полинуклеотидов или связывания белков.

Предоставленные иммуномодулирующие белки также могут быть оценены любым из множества способов для оценки модуляции активности Т-клеток или В-клеток. Одним из таких анализов является анализ клеточной пролиферации. Клетки культивируют в присутствии или отсутствии тестируемого соединения (например, иммуномодулирующего белка), и пролиферацию клеток определяют, например, путем измерения включения тритиевого тимидина или с помощью колориметрического анализа, основанного на метаболическом распаде 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромида (MTT) (Mosman, J. Immunol. Meth. 65: 55-63, 1983). Альтернативный формат анализа использует клетки, которые дополнительно сконструированы для экспрессии репортерного гена. Репортерный ген связан с промоторным элементом, который реагирует на связанный с рецептором путь, и анализ обнаруживает активацию транскрипции репортерного гена. Многочисленные репортерные гены, которые легко анализируются в клеточных экстрактах, известны в данной области техники, например, E. coli lacZ, хлорамфениколацетилтрансфераза (CAT) и сывороточный чувствительный элемент (SRE) (см., например, Shaw et al., Cell 56:563-72, 1989). Примером репортерного гена является ген люциферазы (de Wet et al., Mol. Cell. Biol. 7:725, 1987). Экспрессию гена люциферазы выявляют с помощью люминесценции с использованием методов, известных в данной области техники (например, Baumgartner et al., J. Biol. Chem. 269:29094-101, 1994; Schenborn and Goiffin, Promega Notes 41:11, 1993). Наборы для анализа активности люциферазы имеются в продаже, например, у Promega Corp., Мэдисон, Висконсин.

Предоставленные иммуномодулирующие белки могут быть охарактеризованы по

способности ингибировать стимуляцию В-клеток человека растворимым APRIL или BAFF, как описано Gross et al., международная публикация № WO00/40716. Вкратце, В-клетки человека выделяют из мононуклеарных клеток периферической крови, например, с использованием разделения с магнитными гранулами CD19 (например, Miltenyi Biotec, Оберн, Калифорния). Очищенные В-клетки можно инкубировать в условиях стимуляции, например, в присутствии растворимого белка APRIL, и дополнительно в присутствии титрованной концентрации иммуномодулирующего белка. В-клетки могут быть помечены красителем для пролиферации, или могут быть помечены 1 мкКи ^{3}H-тимидина для измерения пролиферации. Количество В-клеток может быть определено с течением времени.

Могут быть получены репортерные клеточные линии, экспрессирующие репортерный ген под функциональным контролем фактора транскрипции, такого как NF-κB, NFAT-1 и AP-1, которые экспрессируют TACI или BCMA. Например, репортерная клетка может включать Jurkat и другие клеточные линии В-лимфомы. Инкубация этих клеток с растворимыми лигандами BAFF или APRIL дает сигнал через репортерные гены в этих конструкциях. Можно оценить влияние предоставленных иммуномодулирующих белков на модуляцию этой передачи сигналов.

Имеются хорошо зарекомендовавшие себя модели на животных для тестирования in vivo эффективности предоставленных иммуномодулирующих белков при определенных патологических состояниях, в том числе при аутоиммунных или воспалительных состояниях. Например, модели аутоиммунного заболевания на животных включают, например, MRL-lpr/lpr или NZB×NZW F1 конгенные мышиные штаммы, которые служат моделью СКВ (системной красной волчанки). Такие модели на животных известны в данной области техники, см., например, Autoimmune Disease Models A Guidebook, Cohen and Miller eds. Academic Press. У потомства от скрещивания новозеландских черных (NZB) и новозеландских белых (NZW) мышей развивается спонтанная форма СКВ, которая очень напоминает СКВ у людей. У мышей-потомков, известных как NZBW, аутоантитела IgM против Т-клеток начинают вырабатываться в возрасте 1 месяца, а к 5-7 месяцам аутоантитела Ig против ДНК являются доминантным иммуноглобулином. Гиперактивность поликлональных В-клеток приводит к избыточной продукции аутоантител. Отложение этих аутоантител, особенно направленных против одноцепочечной ДНК, связано с развитием гломерулонефрита, который клинически проявляется протеинурией, азотемией и смертью от почечной недостаточности. Почечная недостаточность является основной причиной смерти у мышей, пораженных спонтанной СКВ, а у штамма NZBW этот процесс является хроническим и облитерирующим.

Заболевание протекает быстрее и тяжелее у самок, чем у самцов, при этом средняя выживаемость составляет всего 245 дней по сравнению с 406 днями у самцов. В то время как у многих самок мышей симптомы (протеинурия) проявляются к 7-9-месячному возрасту, некоторые могут быть намного моложе или старше, когда у них развиваются симптомы. Смертельный иммунный нефрит, наблюдаемый у мышей NZBW, очень похож на гломерулонефрит, наблюдаемый у человека при СКВ, что делает эту спонтанную мышиную модель очень привлекательной для тестирования потенциальных методов лечения СКВ (Putterman and Naparstek, Murine Models of Spontaneous Systemic Lupus Erythematosus, Autoimmune Disease Models: A Guidebook, chapter 14, pp. 217-34, 1994; Mohan et al., J. Immunol. 154:1470-80, 1995; и Daikh et al., J. Immunol. 159:3104-08, 1997). Можно оценить введение предоставленных иммуномодулирующих белков этим мышам для определения эффективности по улучшению симптомов и изменений в течении заболевания.

Другой мышиной моделью воспаления и волчаночноподобного заболевания является мышиная модель СКВ, индуцируемой bm12 (Klarquist and Janssen, 2015. J. Vis. Exp. (105), e53319). Суспензии спленоцитов от самок мышей I-Abm12B6(C)-H2-Ab1bm12/KhEgJ («bm12») адоптивно переносят самкам мышей-реципиентов C57BL/6NJ. H2-Ab1bm12 отличается от H2-Ab1b на 3 нуклеотида, что приводит к изменению 3 аминокислот в β-цепи молекулы I-A MHC II класса. Аллоактивация bm12 CD4+ Т-клеток донора антигенпрезентирующими клетками реципиента приводит к хронической РТПХ с симптомами, очень похожими на СКВ, включая выработку аутоантител, изменения в субпопуляциях иммунных клеток и умеренное заболевание почек. На поздних стадиях модели развивается гломерулонефрит с отложением иммунных комплексов, в основном состоящих из аутоантител, связанных с антителами IgG1, IgG2b, IgG2c и IgG3. Конечные точки этой модели могут включать концентрации антител к дцДНК, отдельные изотипы IgG, азот мочевины крови (BUN) и креатинин в сыворотке, состав субпопуляций иммунных клеток в селезенке и шейных лимфоузлах, и гистологию почек.

В некоторых вариантах осуществления могут быть использованы мышиные модели синдрома Шегрена (SjS). Заболевание SjS, а также ускоренное начало диабета могут быть индуцированы у самок мышей, склонных к диабету, не страдающих ожирением, с использованием повторного введения анти-мышиного антитела (m) PD-L1, на основе модифицированной версии протокола, опубликованного Zhou et al., 2016 Sci. Rep. 6, 39105. Начиная с 6-недельного возраста, мышам вводят интраперитонеально (IP) в дни исследования 0, 2, 4 и 6 по 100 мкг антитела против PD-L1 и в разные дни лечат предоставленными иммуномодулирующими белками. Интактные мыши включены в

качестве контроля для анализа конечных точек. Всех мышей обычно умерщвляют на 10-й день исследования, и подчелюстные железы (SMG) и поджелудочную железу у каждой мыши отбирают для гистопатологической оценки, чтобы определить признаки и тяжесть сиаладенита и инсулита. Уровень глюкозы в крови можно измерять в разные дни.

В некоторых вариантах осуществления могут быть использованы мышиные модели экспериментального аллергического энцефаломиелита (EAE). Модели напоминают рассеянный склероз человека и вызывают демиелинизацию в результате активации Т-клеток нейропротеинами, такими как основной белок миелина (MBP) или протеолипидный белок (PLP). Инокуляция антигеном приводит к индукции CD4+, MHC-рестриктированных по антигенам MHC II класса (Th1) Т-клеток. Изменения в протоколе для EAE позволяют получить острый, хронический рецидивирующий или пассивно-переносимый варианты модели (Weinberg et al., J. Immunol. 162:1818-26, 1999; Mijaba et al., Cell. Immunol. 186:94-102, 1999; and Glabinski, Meth. Enzym. 288:182-90, 1997). Можно оценить введение предоставленных иммуномодулирующих белков для улучшения симптомов и изменений в течении заболевания.

В некоторых вариантах осуществления может быть использована модель коллаген-индуцированного артрита (CIA), в которой у мышей развивается хронический воспалительный артрит, очень похожий на человеческий ревматоидный артрит (RA). Поскольку CIA имеет сходные иммунологические и патологические особенности с RA, это делает его идеальной моделью для скрининга потенциальных противовоспалительных соединений у человека. Еще одним преимуществом использования модели CIA является то, что известны механизмы патогенеза. Были идентифицированы Т- и В-клеточные эпитопы на коллагене II типа, и были определены различные иммунологические (гиперчувствительность замедленного типа и антитела против коллагена) и воспалительные (цитокины, хемокины и ферменты, разрушающие матрикс) параметры, относящиеся к иммуно-опосредованному артриту, и могут быть использованы для оценки эффективности тестируемого соединения на моделях (Wooley, Curr. Opin. Rheum. 3:407-20, 1999; Williams et al., Immunol. 89:9784-788, 1992; Myers et al., Life Sci. 61:1861-78, 1997; и Wang et al., Immunol. 92:8955-959, 1995). Можно оценить применение предоставленных иммуномодулирующих белков для улучшения симптомов и изменений в течении заболевания.

В некоторых вариантах осуществления модели бронхиальной инфекции, такой как астма, могут быть созданы, когда мышам вводят овальбумин и повторно стимулируют назально антигеном, который вызывает астматическую реакцию в бронхах, подобную астме. Можно оценить применение предоставленных иммуномодулирующих белков для

улучшения симптомов и изменений в течении заболевания.

В некоторых вариантах осуществления миастения гравис (MG) является другим аутоиммунным заболеванием, для которого доступны модели на мышах. MG - это расстройство нервно-мышечной передачи, включающее выработку аутоантител, направленных против никотинового ацетилхолинового рецептора (AChR). MG развивается или наследуется с клиническими признаками, включая аномальную слабость и утомляемость при физической нагрузке. Была создана мышиная модель MG. (Christadoss et al., Establishment of a Mouse Model of Myasthenia Gravis Which Mimics Human Myasthenia Gravis Pathogenesis for Immune Intervention, in Immunobiology of Proteins and Peptides VIII, Atassi and Bixler, eds., 1995, pp. 195-99). Экспериментальная аутоиммунная миастения гравис (EAMG) - это заболевание, опосредованное антителами, характеризующееся наличием антител к AChR. Эти антитела разрушают рецептор, вызывая дефектные нервно-мышечные электрические импульсы, что приводит к мышечной слабости. На модели EAMG мышей иммунизируют никотиновым ацетилхолиновым рецептором. Клинические признаки MG становятся очевидными через несколько недель после второй иммунизации. EAMG оценивают несколькими методами, включая измерение сывороточных уровней антител к AChR с помощью радиоиммунологического анализа (Christadoss and Dauphinee, J. Immunol. 136:2437-40, 1986; и Lindstrom et al., Методы Enzymol. 74:432-60, 1981), измерение мышечного AChR или электромиографию (Wu et al. Protocols in Immunology. Vol. 3, Eds. Coligen, Kruisbeak, Margulies, Shevach, and Strober. John Wiley and Sons, New York, p. 15.8.1, 1997).

Другое применение для моделей in vivo включает заражение животного антигеном с последующим введением иммуномодулирующих белков и измерением ответа Т- и В-клеток. Т-клеточно-зависимый и Т-клеточно-независимый иммунный ответ может быть измерен, как описано в Perez-Melgosa et al., J. Immunol. 163: 1123-7, 1999. Иммунный ответ у животных, подвергнутых регулярному воздействию антигена (например, гемоцианина лимфы улитки (KLH), эритроцитов овцы (SRBC), овальбумина или коллагена) с последующим введением предоставленных иммуномодулирующих белков, может быть оценен для измерения влияния на В-клеточный ответ.

Фармакокинетические исследования могут быть использованы в сочетании с радиоактивно мечеными иммуномодулирующими белками для определения распределения и периода полужизни таких полипептидов in vivo.

Также могут быть проведены анализы для оценки активности Т-клеточных ответов. Могут быть использованы анализы активации Т-клеток, в которых измеряют IFN-γ или другой эффекторный цитокин. Иммуномодулирующие белки могут быть оценены на их

способность к подавлению или уменьшению секреции эффекторных цитокинов после активации Т-клеток. Анализы для определения усиления или подавления иммунологической активности включают анализы MLR (реакцию смешанной культуры лимфоцитов), измеряющие уровни цитокина интерферона-гамма в надосадочной жидкости культуры (Wang et al., Cancer Immunol Res. 2014 Sep: 2(9): 846-56), SEB (стафилококкового энтеротоксина B), анализы стимуляции Т-клеток (Wang et al., Cancer Immunol Res. 2014 Sep: 2(9): 846-56) и анализы анти-CD3 Т-клеточной стимуляции (Li and Kurlander, J Transl Med. 2010; 8: 104). Поскольку активация Т-клеток связана с секрецией цитокина IFN-γ, определение уровней IFN-γ в надосадочной жидкости культур из этих анализов Т-клеток человека in vitro может быть проведено с использованием коммерческих наборов ELISA (Wu et al, Immunol Lett 2008 Apr 15; 117(1): 57-62). Анализы также включают тесты для оценки цитотоксичности, включая стандартный анализ высвобождения ^{51}Cr (см., например, Milone et al., (2009) Molecular Therapy 17: 1453-1464) или анализы цитотоксичности на основе потока, или анализ цитотоксичности на основе импеданса (Peper et al. (2014) Journal of Immunological Methods, 405:192-198). В некоторых вариантах осуществления используемый анализ представляет собой анализ совместной иммобилизации анти-CD3. В этом анализе первичные Т-клетки стимулируют анти-CD3, иммобилизованным с дополнительными рекомбинантными белками или без них. Надосадочную жидкость культуры собирают в определенные моменты времени, обычно через 24-72 часа. В другом варианте осуществления используемый анализ представляет собой реакцию смешанной культуры лимфоцитов (MLR). В этом анализе первичные Т-клетки стимулируют с помощью аллогенных APC. Надосадочную жидкость от культуры собирают в определенные моменты времени, обычно через 24-72 часа. Уровни IFN-γ человека измеряют в надосадочных жидкостях культуры стандартными методами ELISA. В некоторых случаях коммерческие наборы доступны у поставщиков, и анализ может быть выполнен в соответствии с рекомендациями производителя.

В некоторых вариантах осуществления при анализе способности иммуномодулирующего белка к модуляции, например, увеличению или уменьшению экспрессии IFN-γ, может быть использован Т-клеточный репортерный анализ. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой линию Т-клеток Jurkat или является производной от линий Т-клеток Jurkat. В репортерных анализах репортерную клеточную линию (например, репортерную клетку Jurkat) также генерируют для сверхэкспрессии рецептора, который является когнатным партнером по связыванию иммуномодулирующего белка. В некоторых вариантах осуществления репортерные Т-клетки также включают репортерную конструкцию, содержащую индуцируемый

промотор, реагирующий на активацию Т-клеток, функционально связанный с репортером. В некоторых вариантах осуществления репортер представляет собой флуоресцентный или люминесцентный репортер. В некоторых вариантах осуществления репортером является люцифераза. В некоторых вариантах осуществления промотор чувствителен к передаче сигналов CD3. В некоторых вариантах осуществления промотор является промотором NFAT. В некоторых вариантах осуществления промотор чувствителен к костимулирующей передаче сигналов, например, к костимулирующей передаче сигналов CD28. В некоторых вариантах осуществления промотором является промотор IL-2. В некоторых аспектах репортерного анализа стимулируют репортерную клеточную линию, например, путем совместной инкубации с антигенпрезентирующими клетками (APC), экспрессирующими лиганд дикого типа костимулирующего рецептора Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления APC являются искусственными APC. Искусственные APC хорошо известны специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления искусственные APC получены из одной или нескольких клеточных линий млекопитающих, таких как клетки K562, CHO или 293.

VII. ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ

Фармацевтические композиции, описанные в настоящей заявке (включая фармацевтическую композицию, содержащую иммуномодулирующий белок, описанный здесь), могут быть использованы в различных терапевтических приложениях, таких как лечение заболевания. Например, в некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию используют для лечения воспалительных или аутоиммунных расстройств, рака, трансплантации органов, вирусных инфекций и/или бактериальных инфекций у млекопитающего. Фармацевтическая композиция может модулировать (например, снижать) иммунный ответ для лечения заболевания.

Такие способы и применения включают терапевтические способы и применения, например, использующие введение молекул или композиций, содержащих их, субъекту, имеющему заболевание, состояние или расстройство. В некоторых случаях, таких как описанные, заболевание или расстройство является аутоиммунным или воспалительным заболеванием, состоянием или расстройством. В некоторых вариантах осуществления молекулу или сконструированную клетку вводят в эффективном количестве для осуществления лечения заболевания, состояния или расстройства. Области применения включают применение молекул, содержащих иммуномодулирующий белок, и при приготовлении лекарственного средства для осуществления таких терапевтических способов. В некоторых вариантах осуществления способы осуществляют путем введения предоставленного иммуномодулирующего белка или композиций, содержащих его,

субъекту, страдающему или предположительно имеющему заболевание или состояние. В некоторых вариантах осуществления способы, таким образом, лечат заболевание или состояние, или расстройство у субъекта.

Примерные субъекты включают млекопитающих субъектов, таких как сельскохозяйственные животные, домашние животные и пациенты-люди. В конкретных вариантах осуществления субъект является человеческим субъектом.

Фармацевтические композиции, описанные в настоящей заявке, могут быть использованы в различных терапевтических применениях, таких как лечение заболевания. Например, в некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию используют для лечения воспалительных или аутоиммунных расстройств, трансплантации органов, вирусных инфекций и/или бактериальных инфекций у млекопитающего. Фармацевтическая композиция может модулировать иммунный ответ для лечения заболевания. В некоторых вариантах фармацевтическая композиция подавляет иммунный ответ, что может быть полезным при лечении воспалительных или аутоиммунных расстройств, или трансплантации органов.

Полагают, что предложенные способы применимы в различных приложениях, в том числе, без ограничения указанным, например, в профилактических или терапевтических способах лечения различных заболеваний или состояний иммунной системы у млекопитающего, при которых модуляция или регуляция иммунной системы и ответов иммунной системы является полезной. Например, супрессия иммунного ответа может быть полезной в профилактических и/или терапевтических способах для ингибирования отторжения ткани, клетки или органа, пересаженного от донора реципиенту. В терапевтическом контексте млекопитающим субъектом обычно является субъект с заболеванием или состоянием иммунной системы, и введение проводят для предотвращения дальнейшего прогрессирования заболевания или состояния.

Предоставленные иммуномодулирующие белки, включая гибридные белки BCMA и мультидоменные иммуномодулирующие белки, могут быть использованы для лечения аутоиммунных заболеваний, В-клеточного рака, иммуномодуляции, EBD и любых патологий, опосредованных антителами (например, ITCP, миастении гравис и т.п.), заболеваний почек, непрямого Т-клеточного иммунного ответа, отторжения трансплантата и болезни «трансплантат против хозяина». Введение иммуномодулирующих белков может специфически регулировать реакции В-клеток во время иммунного ответа. Кроме того, введение предоставленных иммуномодулирующих белков может быть использовано для модуляции развития В-клеток, развития других клеток, выработки антител и продукции цитокинов. Введение или использование

предоставленных иммуномодулирующих белков может также модулировать Т- и В-клеточную коммуникацию, например, путем нейтрализации пролиферативных эффектов только BAFF или APRIL или, в случае предоставленных мультидоменных иммуномодулирующих белков, также путем нейтрализации пролиферативных эффектов, опосредованных молекулами, стимулирующими Т-клетки, такой как нейтрализация пролиферативных эффектов CD80/CD86 в отношении CD28.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция подавляет иммунный ответ, что может быть полезным при лечении воспалительных или аутоиммунных расстройств или трансплантации органов. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит иммуномодулирующий белок, который проявляет антагонистическую активность в отношении рецептора, стимулирующего В-клетки, и/или рецептора, стимулирующего Т-клетки, тем самым уменьшая или ослабляя иммунный ответ.

В некоторых вариантах осуществления композиции могут быть использованы для лечения аутоиммунного заболевания. В некоторых вариантах осуществления введение терапевтической композиции, содержащей иммуномодулирующий белок, представленный в настоящей заявке, субъекту, страдающему заболеванием иммунной системы (например, аутоиммунным заболеванием), может привести к подавлению или ингибированию такой атаки иммунной системы или связанных с ней биологических реакций. Подавляя эту атаку иммунной системы на здоровые ткани организма, можно уменьшить или облегчить возникающие в результате физические симптомы (например, боль, воспаление суставов, отек или болезненность суставов), возникающие в результате или связанные с такой атакой на здоровые ткани, и биологический и физический ущерб, возникающий в результате или связанный с атакой иммунной системы, может быть уменьшен, замедлен или остановлен. В профилактическом контексте субъект может быть человеком с заболеванием, расстройством или состоянием иммунной системы, восприимчивым к нему или предположительно имеющим его, и введение обычно проводят для предотвращения прогрессирования заболевания, расстройства или состояния, подавления или облегчения симптомов, признаков или биологических реакций, связанных с ними, предотвращения телесных повреждений. потенциально возникающих в результате, и/или поддержки или улучшения физического функционирования субъекта.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояния, которые можно лечить описанной в настоящей заявке фармацевтической композицией, представляют собой любое заболевание, опосредованное отложением иммунных комплексов (например, волчаночный нефрит, васкулит); прямым вмешательством в путь (например,

катастрофический синдром антифосфолипидных антител, криз при миастении гравис; заболевание анти-Jo-1); опсонизацией или прямым повреждением клеток (например, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, аутоиммунную гемолитическую анемию); опосредованное антителами отторжение аллотрансплантата (например, у высокочувствительных пациентов с трансплантацией почки); или антилекарственными антителами к биологическим факторам замещения, векторам (например, анти-Фактор 8).

В некоторых вариантах осуществления воспалительные и аутоиммунные расстройства, которые можно лечить описанной здесь фармацевтической композицией, представляют собой системную красную волчанку (СКВ), включая профилактику вспышек без глюкокортикоидов; синдром Шегрена; первичный билиарный цирроз (ПБЦ); системную склеродермию; полимиозит; профилактику диабета; IgA-нефропатию; IgA-васкулит; В-клеточный рак, например, миелому; рассеянный склероз или неврит зрительного нерва.

В некоторых вариантах осуществления предоставленные иммуномодулирующие белки могут быть использованы для лечения пре-В- или В-клеточных лейкозов, таких как плазмоклеточный лейкоз, хронический или острый лимфоцитарный лейкоз, миелом, таких как множественная миелома, плазмоклеточная миелома, эндотелиальная миелома и гигантоклеточная миелома, и лимфом, таких как неходжкинская лимфома.

В некоторых вариантах осуществления предоставленные иммуномодулирующие белки могут быть использованы в качестве иммунодепрессантов для избирательного блокирования действия В-лимфоцитов для использования при лечении заболевания. Например, некоторые аутоиммунные заболевания характеризуются выработкой аутоантител, которые способствуют разрушению тканей и обострению заболевания. Аутоантитела также могут приводить к возникновению осложнений отложения иммунного комплекса и вызывать многие симптомы системной красной волчанки, включая почечную недостаточность, невралгические симптомы и смерть. Модулирование выработки антител независимо от клеточного ответа также было бы полезным при многих патологических состояниях. Было также показано, что В-клетки играют определенную роль в секреции артритогенных иммуноглобулинов при ревматоидном артрите. Способы и применение предоставленных иммуномодулирующих белков для ингибирования, блокирования или нейтрализации действия В-клеток, обеспечивающих подавление выработки антител, были бы полезными при лечении аутоиммунных заболеваний, таких как миастения гравис, ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит с полиартикулярным течением и псориатический артрит.

В некоторых вариантах осуществления предоставленные иммуномодулирующие

белки могут быть использованы для блокирования или нейтрализации эффектов В-клеток в связи с заболеваниями почек терминальной стадии, которые могут быть или не быть связаны с аутоиммунными заболеваниями. Такие способы также были бы полезны для лечения иммунологических заболеваний почек. Такие способы были бы полезны для лечения гломерулонефрита, связанного с такими заболеваниями, как мембранозная нефропатия, IgA-нефропатия или болезнь Бергера, IgM-нефропатия, IgA-васкулит, болезнь Гудпасчера, постинфекционный гломерулонефрит, мезангиопролиферативное заболевание, хронический лимфоидный лейкоз, нефротический синдром с минимальными изменениями. Такие способы также могли бы служить в качестве терапевтических приложений для лечения вторичного гломерулонефрита или васкулита, связанных с такими заболеваниями, как волчанка, полиартериит, болезнь Шенлейна-Геноха, склеродермия, заболевания, связанные с HTV, амилоидоз или гемолитико-уремический синдром. Предлагаемые способы также были бы полезны как часть терапевтического применения для лечения интерстициального нефрита или пиелонефрита, связанного с хроническим пиелонефритом, злоупотреблением анальгетиками, нефрокальциноза, нефропатии, вызванной другими агентами, нефролитиаза, или хронического или острого интерстициального нефрита. Способы, представленные в настоящей заявке, также включают использование предоставленных иммуномодулирующих белков при лечении гипертонической болезни или заболеваний крупных сосудов, включая стеноз или окклюзию почечной артерии и холестериновые эмболы или почечные эмболы. Предлагаемые способы и приложения также могут быть использованы для лечения почечных или урологических новообразований, множественных миелом, лимфом, невропатии легкой цепи или амилоидоза.

В некоторых вариантах осуществления предоставленные иммуномодулирующие белки также могут быть использованы для лечения астмы и других хронических заболеваний дыхательных путей, таких как бронхит и эмфизема. Предоставленные иммуномодулирующие белки также могут быть использованы для лечения синдрома Шегрена.

В некоторых вариантах осуществления способы и применения предоставленных иммуномодулирующих белков включают иммуносупрессию, в частности, для такого терапевтического применения, как при заболевании «трансплантат против хозяина» и отторжении трансплантата. В некоторых вариантах осуществления способы и применения предоставленных иммуномодулирующих белков включают лечение таких аутоиммунных заболеваний, как инсулинозависимый сахарный диабет (IDDM) и болезнь Крона. Способы, представленные в настоящей заявке, могут иметь дополнительную

терапевтическую ценность для лечения хронических воспалительных заболеваний, в частности, для уменьшения боли в суставах, отека, анемии и других сопутствующих симптомов, а также для лечения септического шока.

В некоторых вариантах осуществления воспалительные и аутоиммунные расстройства, которые можно лечить фармацевтической композицией, содержащей иммуномодулирующий белок, описанный в настоящей заявке, включают, без ограничения указанными, ахалазию; болезнь Аддисона; болезнь Стилла у взрослых; агаммаглобулинемию; очаговую алопецию; амилоидоз; анкилозирующий спондилоартрит; анти-GBM/анти-TBM нефрит; антифосфолипидный синдром; аутоиммунный адреналит (болезнь Аддисона); аутоиммунный ангионевротический отек; аутоиммунную дизавтономию; аутоиммунный энцефаломиелит; аутоиммунный гепатит; аутоиммунное заболевание внутреннего уха (AIED); аутоиммунный миокардит; аутоиммунный оофорит; аутоиммунный орхит; аутоиммунный панкреатит; аутоиммунный полигландулярный синдром II типа (APS II); аутоиммунную ретинопатию; аутоиммунное заболевание щитовидной железы (AITD), т.е. болезнь Хашимото; аутоиммунную крапивницу; аксональную и нейронную невропатию (AMAN); болезнь Бало; болезнь Бехчета; доброкачественный пемфигоид слизистой оболочки; буллезный пемфигоид; болезнь Каслмана (CD); целиакию; болезнь Шагаса; хроническую воспалительную демиелинизирующую полиневропатию (CIDP); хронический рецидивирующий мультифокальный остеомиелит (CRMO); синдром Чарга-Стросса (CSS) или эозинофильный гранулематоз (EGPA); рубцовый пемфигоид; синдром Когана; болезнь холодовых агглютининов; врожденную блокаду сердца; миокардит Коксаки; CREST синдром; болезнь Крона; герпетиформный дерматит; дерматомиозит; болезнь Девика (оптический нейромиелит); дискоидную волчанку; синдром Дресслера; эндометриоз; эозинофильный эзофагит (EoE); эозинофильный фасциит; узловатую эритему; эссенциальную смешанную криоглобулинемию; синдром Эванса; фибромиалгию; фиброзирующий альвеолит; гигантоклеточный артериит (височный артериит); гигантоклеточный миокардит; гломерулонефрит; синдром Гудпасчера; гранулематоз с полиангиитом; болезнь Грейвса; синдром Гийена-Барре; тиреоидит Хашимото; гемолитическую анемию; пурпуру Шенлейна-Геноха (HSP); гестационный герпес или пемфигоид беременных (PG); гнойный гидраденит (HS) (инверсное акне); гипогаммаглобулинемию; IgA нефропатию; IgA васкулит; склерозирующую болезнь, связанную с IgG4; иммунную тромбоцитопеническую пурпуру (ITP); миозит с тельцами включений (IBM); интерстициальный цистит (IC); ювенильный артрит; ювенильный диабет (диабет 1 типа); ювенильный миозит (JM); болезнь Кавасаки; синдром Ламберта-

Итона; лейкоцитокластический васкулит; красный плоский лишай; склерозирующий лишай; лигнозный конъюнктивит; IgA-зависимый линейный дерматоз (LAD); волчанку; хроническую болезнь Лайма; болезнь Меньера; микроскопический полиангиит (MPA); смешанное заболевание соединительной ткани (MCTD); язву Мурена; болезнь Муха-Габерманна; мультифокальную моторную невропатию (MMN) или MMNCB; рассеянный склероз; миастению гравис; миозит; нарколепсию; неонатальную волчанку; оптический нейромиелит; нейтропению; рубцовый пемфигоид глаза; неврит зрительного нерва; палиндромный ревматизм (PR); PANDAS; паранеопластическую дегенерацию мозжечка (PCD); пароксизмальную ночную гемоглобинурию (PNH); синдром Парри-Ромберга; парспланит (периферический увеит); синдром Персонейджа-Тернера; пузырчатку, вульгарную пузырчатку; периферическую невропатию; перивенозный энцефаломиелит; пернициозную анемию (ПА); POEMS синдром; узловатый полиартериит; полигландулярные синдромы I, II, III типа; ревматическую полимиалгию; полимиозит; постинфарктный синдром; постперикардиотомический синдром; первичный билиарный цирроз; первичный склерозирующий холангит; прогестероновый дерматит; псориаз; псориатический артрит; истинную эритроцитарную аплазию (PRCA); гангренозную пиодермию; синдром Рейно; реактивный артрит; рефлекторную симпатическую дистрофию; рецидивирующий полихондрит; синдром беспокойных ног (RLS); ретроперитонеальный фиброз; ревматическую лихорадку; ревматоидный артрит; саркоидоз; синдром Шмидта; склерит; склеродермию; синдром Шегрена; аутоиммунные реакции против антигенов спермы и яичек; синдром мышечной скованности (SPS); подострый бактериальный эндокардит (SBE); синдром Сусака; симпатическую офтальмию (SO); артериит Такаясу; височный артериит/гигантоклеточный артериит; тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП); синдром Толоса-Ханта (THS); поперечный миелит; диабет 1 типа; язвенный колит (UC); недифференцированное заболевание соединительной ткани (UCTD); увеит; васкулит; витилиго или болезнь Вогта-Коянаги-Гарада.

В некоторых вариантах осуществления предоставленные иммуномодулирующие белки, включая гибридные белки BCMA-Fc и предоставленные мультидоменные иммуномодулирующие (например, TIM-BIM) гибридные белки, могут быть использованы для лечения склеродермии, миастении гравис, РТПХ (включая острую РТПХ или хроническую РТПХ), иммунного ответа на трансплантацию; синдрома антифосфолипидных антител; рассеянного склероза; синдрома Шегрена; заболевания, связанного с IgG4; диабета I типа; ревматоидного артрита, включая терапию глюкокортикоидами (ГК) РА или острого волчаночного нефрита.

В некоторых вариантах осуществления предоставленные иммуномодулирующие белки, включая гибридне белки BCMA-Fc и предоставленные мультидоменные иммуномодулирующие (например, TIM-BIM) гибридные белки, могут быть использованы для лечения бокового амиотрофического склероза, оптического нейромиелита, поперечного миелита, аутоиммунитета ЦНС, синдрома Гийена-Барре, нейроцистеркоза, саркоидоза (Т/серонегативного), синдрома Черга-Стросса, тиреоидита Хашимото, болезни Грейвса, иммунной тромбоцитопении (ИТП), болезни Аддисона, полимиозита или дерматомиозита.

В некоторых вариантах осуществления предоставленные иммуномодулирующие белки, включая гибридные белки BCMA-Fc и предоставленные мультидоменные иммуномодулирующие (например, TIM-BIM) гибридные белки, могут быть использованы для лечения IgA-нефропатии, хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии (CIDP), антисинтетазного заболевания, такого как синдром Jo-1, или ANCA васкулита.

В некоторых вариантах осуществления предоставленные иммуномодулирующие белки, включая гибридные белки BCMA-Fc и предоставленные мультидоменные иммуномодулирующие (например, TIM-BIM) гибридные белки, могут быть использованы для лечения В-клеточного рака. В некоторых вариантах осуществления В-клеточный рак представляет собой рак, в котором BAFF и APRIL вовлечены или причастны к обеспечению аутокринной петли выживания В-клеток. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз, неходжкинскую лимфому или миелому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой миелому.

В некоторых вариантах осуществления вводят терапевтическое количество фармацевтической композиции. Как правило, точное количество вводимых композиций настоящего изобретения может быть определено врачом с учетом индивидуальных различий в возрасте, массе тела, степени инфекции и состоянии пациента (субъекта). Оптимальная дозировка и режим лечения для конкретного пациента могут быть легко определены специалистом в области медицины путем наблюдения за пациентом на предмет признаков заболевания и соответствующей корректировки лечения.

Введение рассматриваемых композиций может быть осуществлено любым удобным способом, в том числе путем вдыхания аэрозоля, инъекции, приема внутрь, трансфузии, имплантации или трансплантации. Композиции, описанные в настоящей заявке, могут быть введены пациенту подкожно, внутрикожно, внутриопухолево, интранодально, интрамедуллярно, внутримышечно, путем внутривенной (в/в) инъекции

или интраперитонеально. В одном варианте осуществления терапевтическую композицию вводят пациенту путем внутрикожной или подкожной инъекции. В другом варианте осуществления терапевтическую композицию вводят путем внутривенной инъекции.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят в качестве монотерапии (т.е. в качестве единственного средства) или в качестве комбинированной терапии (т.е. в комбинации с одним или несколькими дополнительными иммунодепрессантами). В некоторых вариантах осуществления дополнительным агентом является глюкокортикоид (например, преднизон, дексаметазон и гидрокортизон); цитостатический агент, такой как цитостатический агент, который влияет на пролиферацию Т-клеток и/или В-клеток (например, аналоги пурина, алкилирующие агенты или антиметаболиты); антитело (например, анти-CD20, анти-CD25 или анти-CD3 моноклональные антитела); циклоспорин, такролимус, сиролимус, эверолимус, интерферон, опиод, белок, связывающий TNF, микофенолат; низкомолекулярный биологический агент, такой как финголимод или мириоцин; цитокин, такой как интерферон бета-1а, агонист интегрина, или антагонист интегрина.

VIII. ИЗДЕЛИЯ И НАБОРЫ

В настоящей заявке также представлены изделия, которые содержат описанные здесь фармацевтические композиции в подходящей упаковке. Подходящая упаковка для композиций (таких как офтальмологические композиции), описанных здесь, известна в данной области техники и включает, например, флаконы (такие как герметичные флаконы), сосуды, ампулы, бутылки, банки, гибкую упаковку (например, герметичные майларовые или пластиковые пакеты) и тому подобное. Эти изделия могут быть дополнительно стерилизованы и/или герметично закрыты.

Дополнительно предоставляются наборы, содержащие фармацевтические композиции (или продукты производства), описанные в настоящей заявке, которые могут дополнительно содержать инструкцию (инструкции) по способам использования композиции, таким как описанные здесь виды применения. Наборы, описанные в настоящей заявке, могут также включать другие материалы, необходимые с коммерческой точки зрения и с точки зрения пользователя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши для упаковки с инструкциями по выполнению любых методов, описанных в настоящей заявке.

IX. ПРИМЕРНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Среди представленных вариантов осуществления указаны:

1. Иммуномодулирующий белок, включающий:

(1) по меньшей мере одну молекулу, ингибирующую Т-клетки (TIM), которая

связывается с (i) рецептором, стимулирующим Т-клетки, или (ii) лигандом рецептора, стимулирующего Т-клетки; и/или которая является антагонистом активности рецептора, стимулирующего Т-клетки; и

(2) по меньшей мере одну молекулу, ингибирующую В-клетки (BIM), которая связывается с лигандом рецептора, стимулирующего В-клетки, и/или является антагонистом активности рецептора, стимулирующего В-клетки.

2. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 1, где TIM связывается с лигандом рецептора, стимулирующего Т-клетки.

3. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 2, в котором:

- рецептором, стимулирующим Т-клетки, является CD28; и/или

- лигандом рецептора, стимулирующего Т-клетки, является CD80 или CD86.

4. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 1-3, в котором TIM представляет собой внеклеточный домен CTLA-4 или его связывающую часть, которая связывается с CD80 или CD86.

5. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 4, в котором внеклеточный домен CTLA-4 или его связывающая часть состоит из (i) последовательности аминокислот, указанной в SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2, (ii) вариантной последовательности аминокислот CTLA-4, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2; или (iii) ее части, содержащей домен IgV.

6. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 4 или 5, в котором внеклеточный домен CTLA-4 состоит из последовательности аминокислот, указанной в SEQ ID NO:1.

7. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 4 или 5, в котором внеклеточный домен CTLA-4 состоит из вариантной последовательности аминокислот CTLA-4, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO:1, или ее части, содержащей домен IgV, где вариантная последовательность содержит одну или несколько аминокислотных замен в SEQ ID NO:1 или ее части, содержащей домен IgV.

8. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 7, в котором вариантный CTLA-4 связывается с эктодоменом CD80 и CD86, при необходимости, где аффинность связывания с одним или обоими CD80 и CD86 повышена по сравнению с последовательностью, указанной в SEQ ID NO:1, или ее частью, включающей домен IgV.

9. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 8, в котором вариантный CTLA-4 состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:92, или ее

части, включающей домен IgV.

10. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 8, в котором вариантный CTLA-4 состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:113, или ее части, включающей домен IgV.

11. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 8, в котором вариантный CTLA-4 состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:165, или ее части, включающей домен IgV.

12. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 8, в котором вариантный CTLA-4 состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:186, или ее части, включающей домен IgV.

13. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 1-12, в котором:

- лигандом рецептора, стимулирующего B-клетки, является APRIL или BAFF; и/или

- рецептором, стимулирующим B-клетки, является TACI, BCMA или BAFF-рецептор.

14. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 1-13, в котором BIM представляет собой полипептид TACI, который состоит из внеклеточного домена TACI или его связывающей части, которая связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером BAFF/APRIL.

15. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 14, в котором полипептид TACI представляет собой укороченный внеклеточный домен TACI дикого типа или является его вариантом, где укороченный внеклеточный домен TACI дикого типа содержит богатый цистеином домен 2 (CRD2), но не содержит всего богатого цистеином домена 1 (CRD1), где вариантный полипептид TACI содержит одну или несколько аминокислотных замен в укороченном внеклеточном домене TACI дикого типа.

16. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 14 или 15, в котором полипептид TACI представляет собой укороченный внеклеточный домен TACI дикого типа или является его вариантом, где укороченный внеклеточный домен TACI дикого типа состоит из непрерывной последовательности, содержащейся в аминокислотных остатках 67-118, которая состоит из аминокислотных остатков 71-104, с ссылкой на положения, указанные в SEQ ID NO:709, где вариантный полипептид TACI содержит одну или несколько аминокислотных замен в укороченном внеклеточном домене TACI дикого типа.

17. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 1-13, в

котором BIM представляет собой полипептид BCMA, который состоит из внеклеточного домена BCMA или его связывающей части, которая связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером BAFF/APRIL.

18. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 14-16, в котором укороченный внеклеточный домен TACI дикого типа имеет длину из 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 59, 50 или 51 аминокислоты.

19. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 14-16 и 17, в котором укороченный внеклеточный домен TACI дикого типа состоит из аминокислотных остатков 68-110, указанных в SEQ ID NO:709.

20. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 14-16 и 17-19, в котором полипептид TACI состоит из последовательности аминокислот, указанной в SEQ ID NO:528, или является его вариантом, содержащим одну или несколько аминокислотных замен в последовательности, указанной в SEQ ID NO:528.

21. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 14-16 и 17-20, в котором укороченный полипептид TACI или его вариант связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером BAFF/APRIL.

22. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 14-16, в котором полипептид TACI представляет собой укороченный внеклеточный домен TACI дикого типа, который состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:516.

23. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 14-16 и 17-21, в котором полипептид TACI представляет собой укороченный внеклеточный домен TACI дикого типа, который состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:528.

24. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 15-16 и 17-21, в котором полипептид TACI представляет собой вариантный полипептид TACI, обладающий повышенной аффинностью связывания с одним или обоими из APRIL и BAFF по сравнению с укороченным полипептидом TACI.

25. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 15-16, 17-21 и 24, в котором вариантный полипептид TACI содержит одну или несколько аминокислотных замен в положениях, выбранных из 74, 75, 76, 77, 78, 79, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 92, 95, 97, 98, 99, 101, 102 и 103, соответствующих нумерации, указанной в SEQ ID NO:709.

26. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 25, в котором одна или несколько аминокислотных замен выбраны из E74V, Q75E, Q75R, G76S, K77E, F78Y, Y79F, L82H, L82P, L83S, R84G, R84L, R84Q, D85E, D85V, C86Y, I87L, I87M, S88N, I92V, Q95R, P97S, K98T, Q99E, A101D, Y102D, F103S, F103V, F103Y или их консервативной

аминокислотной замены.

27. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 25 или 26, в котором одна или несколько аминокислотных замен содержат по меньшей мере одну из E74V, K77E, Y79F, L82H, L82P, R84G, R84L, R84Q, D85V или C86Y.

28. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 25-27, в котором одна или несколько аминокислотных замен представляют собой D85E/K98T, I87L/K98T, L82P/I87L, G76S/P97S, K77E/R84L/F103Y, Y79F/Q99E, L83S/F103S, K77E/R84Q, K77E/A101D, K77E/F78Y/Y102D, Q75E/R84Q, Q75R/R84G/I92V, K77E/A101D/Y102D, R84Q/S88N/A101D, R84Q/F103V, K77E/Q95R/A101D или I87M/A101D.

29. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 25-28, в котором одна или несколько аминокислотных замен представляют собой K77E/F78Y/Y102D.

30. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 25-28, в котором одна или несколько аминокислотных замен представляют собой Q75E/R84Q.

31. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 25-29, в котором вариантный полипептид TACI указан в SEQ ID NO:541.

32. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 25-28 и 30, в котором вариантный полипептид TACI указан в SEQ ID NO:542.

33. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 14, в котором полипептид TACI представляет собой вариантный полипептид TACI, содержащий одну или несколько аминокислотных замен во внеклеточном домене (ECD) эталонного полипептида TACI или его фрагмента специфического связывания в положениях, выбранных из 40, 59, 60, 61, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 92, 95, 97, 98, 99, 101, 102 и 103, соответствующих нумерации положений, указанной в SEQ ID NO:709.

34. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 33, в котором эталонный полипептид TACI представляет собой укороченный полипептид, состоящий из внеклеточного домена TACI или его части специфического связывания, которая связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером BAFF/APRIL.

35. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 33 и 34, в котором эталонный полипептид TACI содержит (i) последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:709, (ii) последовательность аминокислот, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:709; или (iii) часть (i) или (ii), содержащую один или оба домена CRD1 и домена CRD2, который связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером BAFF/APRIL.

36. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 33-35, в котором в эталонном полипептиде TACI отсутствует N-концевой метионин.

37. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 33-36, в котором эталонный полипептид TACI содержит домен CRD1 и домен CRD2.

38. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 33-37, в котором эталонный полипептид TACI содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:516.

39. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 33-37, в котором эталонный полипептид TACI состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:516.

40. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 33-36, в котором эталонный полипептид TACI состоит по существу из домена CRD2.

41. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 33-36 и 40, в котором эталонный полипептид TACI содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:528.

42. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 33-36 и 40, в котором эталонный полипептид TACI состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:528.

43. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 33-42, в котором одна или несколько аминокислотных замен выбраны из W40R, Q59R, R60G, T61P, E74V, Q75E, Q75R, G76S, K77E, F78Y, Y79F, L82H, L82P, L83S, R84G, R84L, R84Q, D85E, D85V, C86Y., I87L, I87M, S88N, I92V, Q95R, P97S, K98T, Q99E, A101D, Y102D, F103S, F103V, F103Y или их консервативной аминокислотной замены.

44. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 33-43, в котором одна или несколько аминокислотных замен содержат по меньшей мере одну из E74V, K77E, Y79F, L82H, L82P, R84G, R84L, R84Q, D85V или C86Y.

45. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 33-44, в котором одна или несколько аминокислотных замен содержат по меньшей мере аминокислотную замену K77E.

46. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 33-44, в котором одна или несколько аминокислотных замен содержат по меньшей мере аминокислотную замену R84G.

47. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 33-44, в котором одна или несколько аминокислотных замен содержат по меньшей мере аминокислотную замену R84Q.

48. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 33-47, в котором одна или несколько аминокислотных замен представляют собой D85E/K98T, I87L/K98T, R60G/Q75E/L82P, R60G/C86Y, W40R/L82P/F103Y, W40R/Q59R/T61P/K98T, L82P/I87L, G76S/P97S, K77E/R84L/F103Y, Y79F/Q99E, L83S/F103S, K77E/R84Q, K77E/A101D, K77E/F78Y/Y102D, Q75E/R84Q, Q75R/R84G/I92V, K77E/A101D/Y102D, R84Q/S88N/A101D, R84Q/F103V, K77E/Q95R/A101D или I87M/A101D.

49. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 33-44, 45 и 48, в котором одна или несколько аминокислотных замен представляют собой K77E/F78Y/Y102D.

50 Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 33-44, 47 и 48, в котором одна или несколько аминокислотных замен представляют собой Q75E/R84Q.

51. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 33-50, в котором вариантный полипептид TACI обладает повышенной аффинностью связывания с одним или обоими из APRIL и BAFF по сравнению с эталонным полипептидом TACI.

52. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 24 или 51, в котором вариантный полипептид TACI обладает повышенной аффинностью связывания с APRIL.

53. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 24 или 51, в котором вариантный полипептид TACI обладает повышенной аффинностью связывания с BAFF.

54. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 24 или 51, в котором вариантный полипептид TACI обладает повышенной аффинностью связывания с APRIL и BAFF.

55. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 24 и 51-54, в котором повышенная аффинность к BAFF или APRIL независимо увеличивается более чем в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или 60 раз.

56. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 15-16, 17-21 и 24-55, в котором:

- вариантный полипептид TACI содержит последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO:517-527, 536, 537, 682-701; или

вариантный полипептид TACI содержит последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO:529-535, 538-550, 673-681.

57. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 15-16, 17-21 и 24-55, в котором:

- вариантный полипептид TACI состоит по существу или состоит из

последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO:517-527, 536, 537, 682-701; или

- вариантный полипептид TACI состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO:529-535, 538-550, 673-681.

58. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 15-16, 17-21, 24-55 и 57, в котором вариантный полипептид TACI состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:541.

59. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 15-16, 17-21, 24-55 и 57, в котором вариантный полипептид TACI состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:542.

60. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 15-16, 17-21, 24-55 и 57, в котором вариантный полипептид TACI состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:688.

61. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 15-16, 17-21, 24-55 и 57, в котором вариантный полипептид TACI состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:535.

62. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 15-16, 17-21 и 24-61, содержащий гетерологичный фрагмент, который связан по меньшей мере с одним полипептидом TACI.

63. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 62, в котором гетерологичный фрагмент представляет собой фрагмент, продлевающий период полужизни, домен мультимеризации, нацеливающий фрагмент, который связывается с молекулой на поверхности клетки, или обнаруживаемую метку.

64. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 63, в котором фрагмент, продлевающий период полужизни, включает домен мультимеризации, альбумин, альбуминсвязывающий полипептид, Про/Ала/Сер (PAS), С-концевой пептид (CTP) бета-субъединицы человеческого хорионического гонадотропина, полиэтиленгликоль (PEG)., длинные неструктурированные гидрофильные последовательности аминокислот (XTEN), гидроксиэтилкрахмал (HES), малую молекулу, связывающую альбумин, или их комбинацию.

65. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 17, в котором полипептид BCMA состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:356.

66. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 17, в котором полипептид BCMA представляет собой вариантный полипептид BCMA, содержащий одну или несколько аминокислотных замен во внеклеточном домене (ECD) эталонного полипептида BCMA или фрагменте специфического связывания в положениях,

выбранных из 9, 10, 11, 14, 16, 19, 20, 22, 25, 27, 29, 30, 31, 32, 35, 36, 39, 43, 45, 46, 47 и 48, соответствующих нумерации, указанной в SEQ ID NO:710.

67. Иммуномодулирующий белок, содержащий вариантный полипептид BCMA, в котором вариантный полипептид BCMA включает одну или несколько аминокислотных замен во внеклеточном домене (ECD) эталонного полипептида BCMA или его фрагмента специфического связывания в положениях, выбранных из числа 9, 10, 11, 14, 16, 19, 20, 22, 25, 27, 29, 30, 31, 32, 35, 36, 39, 43, 45, 46, 47 и 48, соответствующих нумерации положений, указанной в SEQ ID NO:710.

68. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 66 или 67, в котором эталонный полипептид BCMA представляет собой полипептид, состоящий из внеклеточного домена BCMA или его части специфического связывания, которая связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером BAFF/APRIL.

69. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 66-68, в котором эталонный полипептид BCMA содержит (i) последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:710, (ii) последовательность аминокислот, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:710; или (iii) часть (i) или (ii), содержащую CRD.

70. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 66-69, в котором в эталонном BCMA отсутствует N-концевой метионин.

71. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 66-70, в котором эталонный полипептид BCMA содержит (i) последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:356, (ii) последовательность аминокислот, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:356; или (iii) часть (i) или (ii), включающую CRD.

72. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 66-71, в котором эталонный полипептид BCMA содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:356.

73. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 66-71, в котором эталонный полипептид BCMA состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:356.

74. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 66-73, в котором одна или несколько аминокислотных замен выбраны из S9G, S9N, S9Y, Q10E, Q10P, N11D, N11S, F14Y, S16A, H19A, H19C, H19D, H19E, H19F, H19G, H19I, H19K, H19L, H19M, H19N, H19P, H19Q, H19R, H19S, H19T, H19V, H19W, H19Y, A20T, I22L, I22V, Q25E, Q25F, Q25G, Q25H, Q25I, Q25K, Q25L, Q25M, Q25S, Q25V, Q25Y,

R27H, R27L, S29P, S30G, S30Y, N31D, N31G, N31H, N31K, N31L, N31M, N31P, N31S, N31V, N31Y, T32I, T32S, L35A, L35M, L35P, L35S, L35V, L35Y, T36A, T36G, T36N, T36M, T36S, T36V, R39L, R39Q, A43E, A43S, V45A, V45D, V45I, T46A, T46I, N47D, N47Y, S48G или их консервативной аминокислотной замены.

75. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 66-74, в котором одна или несколько аминокислотных замен содержат по меньшей мере одну замену в положении 19, при необходимости, где по меньшей мере одна замена выбрана из H19A, H19C, H19D, H19E, H19F, H19G, H19I, H19K, H19L, H19M, H19N, H19P, H19Q, H19R, H19S, H19T, H19V, H19W, H19Y.

76. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 66-75, в котором одна или несколько аминокислотных замен содержат по меньшей мере аминокислотную замену H19L.

77. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 66-75, в котором одна или несколько аминокислотных замен содержат по меньшей мере аминокислотную замену H19K.

78. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 66-75, в котором одна или несколько аминокислотных замен содержат по меньшей мере аминокислотную замену H19R.

79. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 66-75, в котором одна или несколько аминокислотных замен содержат по меньшей мере аминокислотную замену H19Y.

80. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 66-79, в котором одна или несколько аминокислотных замен содержат по меньшей мере одну замену в положении 25, при необходимости, где по меньшей мере одна замена выбрана из Q25E, Q25F, Q25G, Q25H, Q25I, Q25K, Q25L, Q25M, Q25S, Q25V, Q25Y.

81. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 66-80, в котором одна или несколько аминокислотных замен содержат по меньшей мере одну замену в положении 31, при необходимости, где по меньшей мере одна замена выбрана из N31D, N31G, N31H, N31K, N31L, N31M, N31P, N31S, N31V, N31Y.

82. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 66-81, в котором одна или несколько аминокислотных замен содержат по меньшей мере одну замену в положении 35, при необходимости, где по меньшей мере одна замена выбрана из L35A, L35M, L35P, L35S, L35V, L35Y.

83. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 66-82, в котором одна или несколько аминокислотных замен содержат по меньшей мере одну

замену в положении 36, при необходимости, где по меньшей мере одна замена выбрана из T36A, T36G, T36N, T36M, T36S, T36V.

84. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 66-83, в котором одна или несколько аминокислотных замен представляют собой H19Y/S30G; H19Y/V45A; F14Y/H19Y; H19Y/V45D; H19Y/A43E; H19Y/T36A; H19Y/I22V; N11D/H19Y; H19Y/T36M; N11S/H19Y; H19Y/L35P/T46A; H19Y/N47D; S9D/H19Y; H19Y/S30G/V45D; H19Y/R39Q; H19Y/L35P; S9D/H19Y/R27H; Q10P/H19Y/Q25H; H19Y/R39L/N47D; N11D/H19Y/N47D; H19Y/T32S; N11S/H19Y/S29P; H19Y/R39Q/N47D; S16A/H19Y/R39Q; S9N/H19Y/N31K/T46I; H19Y/R27L/N31Y/T32S/T36A; N11S/H19Y/T46A; H19Y/T32I; S9G/H19Y/T36S/A43S; H19Y/S48G; S9N/H19Y/I22V/N31D; S9N/H19Y/Q25K/N31D; S9G/H19Y/T32S; H19Y/T36A/N47Y; H19Y/V45A/T46I; H19Y/Q25K/N31D; H19Y/Q25H/R39Q/V45D; H19Y/T32S/N47D; Q10E/H19Y/A20T/T36S; H19Y/T32S/V45I; H19F/Q25E/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25F/N31S/T36S; H19I/Q25F/N31S/T36V; H19F/Q25V/N31M/T36S; H19Y/Q25Y/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25I/N31M/L35A/T36S; H19I/Q25L/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25L/N31G/L35P/T36A; H19Y/I22L/N31G; H19F/I22V/Q25M/N31P/T36M; H19Y/N31L/L35Y/T36S; H19L/S30G/N31H/L35A; H19L/Q25S/N31V/L35S/T36V; H19L/Q25S/S30Y/N31G/L35M/T36V; H19F/Q25F/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25F/N31S/T36G; H19F/I22V/Q25S/N31V/L35S/T36V; H19F/Q25G/N31S/L35V/T36N; H19L/Q25H/N31D/L35S; или H19F/Q25F/N31S/L35Y/T36S.

85. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 66-75, 79 и 84, в котором одна или несколько аминокислотных замен включают S16A/H19Y/R39Q.

86. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 66-85, в котором вариантный полипептид BCMA обладает повышенной аффинностью связывания с одним или обоими из APRIL и BAFF по сравнению с эталонным полипептидом TACI.

87. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 86, в котором вариантный полипептид BCMA обладает повышенной аффинностью связывания с APRIL.

88. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 86, в котором вариантный полипептид BCMA обладает повышенной аффинностью связывания с BAFF.

89. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 86, в котором вариантный полипептид BCMA обладает повышенной аффинностью связывания с APRIL и BAFF.

90. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 86-89, в котором повышенная аффинность к BAFF или APRIL независимо увеличивается более чем в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или 60 раз.

91. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 66-90, в котором вариантный полипептид BCMA содержит последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO:357-435.

92. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 66-90, в котором вариантный полипептид BCMA состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в любой SEQ ID NO:357-435.

93. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 66-90, в котором вариантный полипептид BCMA состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:381.

94. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 66-90, в котором вариантный полипептид BCMA состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:411.

95. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 66-90, в котором вариантный полипептид BCMA состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:405.

96. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 66-90, в котором вариантный полипептид BCMA состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:406.

97. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 17 и 66-96, содержащий гетерологичный фрагмент, который связан по меньшей мере с одним полипептидом BCMA.

98. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 97, в котором гетерологичный фрагмент представляет собой фрагмент, продлевающий период полужизни, домен мультимеризации, нацеливающий фрагмент, который связывается с молекулой на поверхности клетки, или обнаруживаемую метку.

99. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 98, в котором фрагмент, продлевающий период полужизни, включает домен мультимеризации, альбумин, альбуминсвязывающий полипептид, Про/Ала/Сер (PAS), С-концевой пептид (CTP) бета-субъединицы человеческого хорионического гонадотропина, полиэтиленгликоль (PEG)., длинные неструктурированные гидрофильные последовательности аминокислот (XTEN), гидроксиэтилкрахмал (HES), малую молекулу, связывающую альбумин, или их комбинацию.

100. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 17 и 66-99, содержащий Fc-область иммуноглобулина, которая связана по меньшей мере с одним полипептидом BCMA.

101. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 1-17, 18-20, 21-23, 24-33, 39-66 и 68-100, в котором по меньшей мере одна TIM включает только одну TIM.

102. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 1-17, 18-20, 21-23, 24-33, 39-66 и 68-100, в котором по меньшей мере одна TIM включает 2, 3, 4 или 5 TIM, при необходимости, где каждая TIM является одной и той же.

103. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 102, в котором каждая TIM связана прямо или опосредованно через линкер, при необходимости, где линкер представляет собой пептидный линкер.

104. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 1-17, 18-20, 21-23, 24-33, 39-66 и 68-103, где по меньшей мере одна BIM включает только одну BIM.

105. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 1-17, 18-20, 21-23, 24-33, 39-66 и 68-103, в котором по меньшей мере одна BIM включает 2, 3, 4 или 5 BIM, при необходимости, где каждая BIM является одной и той же.

106. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 105, в котором каждая BIM связан прямо или опосредованно через линкер, при необходимости, где линкер представляет собой пептидный линкер.

107. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 103 или 106, в котором линкер представляет собой пептидный линкер, а пептидный линкер выбран из GSGGS (SEQ ID NO:592), GGGGS (G4S; SEQ ID NO:593), GSGGGGS (SEQ ID NO:590), GGGGSGGGGS (2xGGGGS; SEQ ID NO:594), GGGGSGGGGSGGGGS (3xGGGGS; SEQ ID NO:595), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (4xGGGGS, SEQ ID NO:600), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (5XGGGGS, SEQ ID NO:671), GGGGSSA (SEQ ID NO:596) или их комбинаций.

108. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 1-17, 18-20, 21-23, 24-33, 39-66 и 68-107, где по меньшей мере одна TIM и по меньшей мере одна BIM связаны прямо или опосредованно через линкер, при необходимости, где линкер содержит пептидный линкер и/или фрагмент мультимеризации.

109. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 108, где линкер включает пептидный линкер, а пептидный линкер выбран из GSGGS (SEQ ID NO:592), GGGGS (G4S; SEQ ID NO:593), GSGGGGS (SEQ ID NO:590), GGGGSGGGGS (2xGGGGS; SEQ ID NO:594), GGGGSGGGGSGGGGS (3xGGGGS; SEQ ID NO:595), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (4xGGGGS, SEQ ID NO:600), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (5XGGGGS, SEQ ID NO:671), GGGGSSA (SEQ ID

NO:596) или их комбинации.

110. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 108, в котором линкер включает пептидный линкер, а пептидный линкер выбран из SEQ ID NO:711 (1xEAAAK), SEQ ID NO:712 (2xEAAAK), SEQ ID NO:713 (3xEAAAK), SEQ ID NO:714 (4xEAAAK), SEQ ID NO:715 (5xEAAAK), SEQ ID NO:665 (6xEAAAK).

111. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 1-17, 18-20, 21-23, 24-33, 34-66 и 68-110, который является мономером и/или содержит единственную полипептидную цепь.

112. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 111, в котором по меньшей мере одна TIM является аминоконцевой по отношению по меньшей мере к одной BIM в полипептиде.

113. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 111, в котором по меньшей мере одна TIM является карбоксиконцевой по отношению по меньшей мере к одной BIM в полипептиде.

114. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 1-17, 18-20, 21-23, 24-33, 39-66 и 68-113, который дополнительно содержит обнаруживаемую метку, при необходимости, где обнаруживаемая метка представляет собой метку Flag, метку His или метку myc.

115. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 1-17, 18-20, 21-23, 24-33, 39-64, и 101-114, который содержит последовательность аминокислот, указанную в любой из SEQ ID NO:618-623, или последовательность, которая проявляет по меньшей мере 85% 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности с ними и сохраняет активность.

116. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 18-20, 21-23, 24-33, 39-64 и 101-113, который содержит последовательность аминокислот, указанную в любой из SEQ ID NO:703-708, или последовательность, которая проявляет по меньшей мере 85% 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности с ними и сохраняет активность.

117. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 108, в котором линкер содержит домен мультимеризации, который способствует димеризации, тримеризации, тетрамеризации или пентамеризации.

118. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 108 или 117, в котором домен мультимеризации представляет собой Fc-область иммуноглобулина.

119. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 1-16, 18-20, 21-23, 24-33, 39-66 и 68-110117 и 118, который представляет собой димер.

120. Иммуномодулирующий белок по вариантам осуществления 100 и 118, в котором Fc-область иммуноглобулина является гомодимерной Fc-областью.

121. Иммуномодулирующий белок по вариантам осуществления 100 и 118, в котором Fc-область иммуноглобулина представляет собой гетеродимерную Fc-область.

122. Иммуномодулирующий белок по вариантам осуществления 1-16, 18-20, 21-23, 24-33, 39-66 и 68-110 и 117-120, который является гомодимером, причем каждый полипептид димера является одним и тем же.

123. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 122, в котором каждый полипептид содержит по меньшей мере одну TIM и по меньшей мере одну BIM, и в котором по меньшей мере одна TIM является аминоконцевой по отношению по меньшей мере к одной BIM в каждом полипептиде.

124. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 122, в котором каждый полипептид содержит по меньшей мере одну TIM и по меньшей мере одну BIM и в котором по меньшей мере одна TIM является карбоксиконцевой по отношению по меньшей мере к одной BIM в каждом полипептиде.

125. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 100, 118-120 и 122-124, в котором Fc иммуноглобулина представляет собой Fc-домен IgG1 или представляет собой вариантную Fc, которая проявляет пониженную аффинность связывания с Fc-рецептором и/или пониженную эффекторную функцию, при необходимости по сравнению с Fc-доменом IgG1 дикого типа.

126. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 100, 118-120 и 122-125, в котором Fc иммуноглобулина является Fc-доменом IgG1, а Fc содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:597.

127. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 100, 118-120 и 122-125, в котором Fc иммуноглобулина представляет собой вариантный Fc-домен IgG1, содержащий одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из L234A, L234V, L235A, L235E, G237A, S267K, R292C, N297G и V302C, по нумерации EU.

128. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 127, в котором Fc-область иммуноглобулина содержит аминокислотные замены L234A, L235E и G237A по нумерации EU или аминокислотные замены R292C, N297G и V302C по нумерации EU.

129. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 100, 118-120 и 122-125, 127 и 128, где Fc представляет собой вариантную Fc, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:589.

130. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 1-16, 18-20, 21-23, 24-33, 39-65 и 68-110, и 117-128, который содержит последовательность

аминокислот, указанную в любой из SEQ ID NO:610-617, 624-627, 637, 638, 643, 644, 648, 653 и 654, или последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 85% 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности с ними и сохраняет активность.

131. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 1-13, 17, 65, 66, 68-110, и 117-128, который содержит последовательность аминокислот, указанную в любой SEQ ID NO:601-609, 631-636, 645-647, 649-652, 655-659, или последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 85% 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности с ними и сохраняет активность.

132. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 1-16, 18-20, 21-23, 24-33, 39-66, 68-110, 117-119 и 121, который представляет собой гетеродимер, где каждый полипептид димера связан с Fc-доменом иммуноглобулина, индивидуально содержащим одну или несколько аминокислотных модификаций в Fc-домене дикого типа для осуществления образования гетеродимера между полипептидами.

133. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 132, в котором Fc иммуноглобулина дикого типа представляет собой Fc-домен IgG1.

134. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 132 или 133, в котором одна или несколько аминокислотных модификаций выбраны из модификации «выступ-во-впадину» и мутации заряда для уменьшения или предотвращения самоассоциации из-за отталкивания заряда.

135. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 132-134, дополнительно содержащий одну или несколько аминокислотных замен для снижения аффинности связывания с Fc-рецептором и/или снижения эффекторной функции, при необходимости по сравнению с Fc-доменом IgG1 дикого типа.

136. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 135, в котором одна или несколько аминокислотных замен выбраны из L234A, L234V, L235A, L235E, G237A, S267K, R292C, N297G и V302C, по нумерации EU.

137. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 135 или 136, в котором Fc-область иммуноглобулина содержит аминокислотные замены L234A, L235E и G237A по нумерации EU или аминокислотные замены R292C, N297G и V302C по нумерации EU.

138. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 132-137, в котором гетеродимер включает первый полипептид, содержащий последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:662 или 663, и второй

полипептид, содержащий последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:660.

139. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 1-138, в котором:

- иммуномодулирующий белок блокирует связывание APRIL, BAFF или гетеротримера APRIL/BAFF с BCMA или TACI; и/или

- иммуномодулирующий белок снижает уровни циркулирующих APRIL, BAFF или APRIL/BAFF в крови после введения субъекту.

140. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 1-138, который уменьшает или ингибирует созревание, дифференцировку и/или пролиферацию B-клеток.

141. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 1-17, 18-20, 21-34, 34-6668-134, в котором:

- иммуномодулирующий белок блокирует связывание CD80 или CD86 с костимулирующим рецептором, при необходимости, где костимулирующим рецептором является CD28; и/или

- иммуномодулирующий белок уменьшает или ингибирует костимуляцию T-клеток.

142. Молекула (молекулы) нуклеиновой кислоты, кодирующая иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 1-141.

143. Молекула нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 142, представляющая собой синтетическую нуклеиновую кислоту.

144. Молекула нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 142 или 143, представляющая собой кДНК.

145. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 142-144.

146. Вектор по варианту осуществления 145, который является вектором экспрессии.

147. Вектор по варианту осуществления 145 или 146, который представляет собой вектор экспрессии млекопитающих или вирусный вектор.

148. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по любому из вариантов осуществления 142-144 или вектор по любому из вариантов осуществления 145-147.

149. Клетка по варианту осуществления 148, которая является клеткой млекопитающего.

150. Клетка по варианту осуществления 148 или 149, которая является клеткой человека.

151. Способ получения иммуномодулирующего белка, включающий введение молекулы нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 142-144 или вектора по любому из вариантов осуществления 145-147 в клетку-хозяина в условиях для экспрессии белка в клетке.

152. Способ по варианту осуществления 151, дополнительно включающий выделение или очистку иммуномодулирующего белка из клетки.

153. Иммуномодулирующий белок, полученный способом по варианту осуществления 151 или 152.

154. Фармацевтическая композиция, содержащая иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 1-141 и 153.

155. Вариантный гибридный белок BCMA-Fc, содержащий вариантный полипептид BCMA, Fc-область и линкер между полипептидом BCMA и Fc-областью, где вариантный полипептида BCMA содержит одну или несколько аминокислотных замен во внеклеточном домене (ECD) немодифицированного полипептида BCMA или его фрагмента специфического связывания, соответствующие положениям, выбранным из 9, 10, 11, 14, 16, 19, 20, 22, 25, 27, 29, 30, 31, 32, 35, 36, 39, 43, 45, 46, 47 и 48 со ссылкой на положения, указанные в SEQ ID NO:710.

56. Вариантный гибридный белок BCMA-Fc по варианту осуществления 155, в котором эталонный полипептид BCMA представляет собой полипептид, состоящий из внеклеточного домена BCMA или его части специфического связывания, которая связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером BAFF/APRIL.

157. Вариантный гибридный белок BCMA-Fc по варианту осуществления 155 или 156, в котором эталонный полипептид BCMA содержит (i) последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:710, (ii) последовательность аминокислот, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID. №: 710; или (iii) часть (i) или (ii), содержащую CRD.

158. Вариантный гибридный белок BCMA-Fc по любому из вариантов осуществления 155-157, где в эталонном BCMA отсутствует N-концевой метионин.

159. Вариантный гибридный белок BCMA-Fc по любому из вариантов осуществления 155-158, где эталонный полипептид BCMA содержит (i) последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:356, (ii) последовательность аминокислот, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO:356; или (iii) часть (i) или (ii), включающую CRD.

160. Вариантный гибридный белок BCMA-Fc по любому из вариантов осуществления 155-159, где эталонный полипептид BCMA содержит последовательность,

указанную в SEQ ID NO:356.

161. Вариантный гибридный белок BCMA-Fc по любому из вариантов осуществления 155-159, где эталонный полипептид BCMA состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:356.

162. Вариантный гибридный белок BCMA-Fc по любому из вариантов осуществления 155-161, где одна или несколько аминокислотных замен выбраны из S9G, S9N, S9Y, Q10E, Q10P, N11D, N11S, F14Y, S16A, H19A, H19C, H19D, H19E, H19F, H19G, H19I, H19K, H19L, H19M, H19N, H19P, H19Q, H19R, H19S, H19T, H19V, H19W, H19Y, A20T, I22L, I22V, Q25E, Q25F, Q25G, Q25H, Q25I, Q25K, Q25L, Q25M, Q25S, Q25V, Q25Y, R27H, R27L, S29P, S30G, S30Y, N31D, N31G, N31H, N31K, N31L, N31M, N31P, N31S, N31V, N31Y, T32I, T32S, L35A, L35M, L35P, L35S, L35V, L35Y, T36A, T36G, T36N, T36M, T36S, T36V, R39L, R39Q, A43E, A43S, V45A, V45D, V45I, T46A, T46I, N47D, N47Y, S48G или их консервативной аминокислотной замены.

163. Вариантный гибридный белок BCMA-Fc по любому из вариантов осуществления 155-162, где одна или несколько аминокислотных замен содержат по меньшей мере одну замену в положении 19, при необходимости, где по меньшей мере одна замена выбрана из H19A, H19C, H19D, H19E, H19F, H19G, H19I, H19K, H19L, H19M, H19N, H19P, H19Q, H19R, H19S, H19T, H19V, H19W, H19Y.

164. Вариантный гибридный белок BCMA-Fc по любому из вариантов осуществления 155-163, в котором одна или несколько аминокислотных замен содержат по меньшей мере аминокислотную замену H19L.

165. Вариантный гибридный белок BCMA-Fc по любому из вариантов осуществления 155-163, в котором одна или несколько аминокислотных замен содержат по меньшей мере аминокислотную замену H19K.

166. Вариантный гибридный белок BCMA-Fc по любому из вариантов осуществления 155-163, в котором одна или несколько аминокислотных замен содержат по меньшей мере аминокислотную замену H19R.

167. Вариантный гибридный белок BCMA-Fc по любому из вариантов осуществления 155-163, в котором одна или несколько аминокислотных замен содержат по меньшей мере аминокислотную замену H19Y.

168. Вариантный гибридный белок BCMA-Fc по любому из вариантов осуществления 155-167, в котором одна или несколько аминокислотных замен содержат по меньшей мере одну замену в положении 25, при необходимости, в котором по меньшей мере одна замена выбрана из Q25E, Q25F, Q25G, Q25H, Q25I, Q25K, Q25L, Q25M, Q25S, Q25V, Q25Y.

169. Вариантный гибридный белок BCMA-Fc по любому из вариантов осуществления 155-168, в котором одна или несколько аминокислотных замен содержат по меньшей мере одну замену в положении 31, при необходимости, в котором по меньшей мере одна замена выбрана из N31D, N31G, N31H, N31K, N31L, N31M, N31P, N31S, N31V, N31Y.

170. Вариантный гибридный белок BCMA-Fc по любому из вариантов осуществления 155-169, в котором одна или несколько аминокислотных замен содержат по меньшей мере одну замену в положении 35, при необходимости, в котором по меньшей мере одна замена выбрана из L35A, L35M, L35P, L35S, L35V, L35Y.

171. Вариантный гибридный белок BCMA-Fc по любому из вариантов осуществления 155-170, в котором одна или несколько аминокислотных замен содержат по меньшей мере одну замену в положении 36, при необходимости, в котором по меньшей мере одна замена выбрана из T36A, T36G, T36N, T36M, T36S, T36V.

172. Вариантный гибридный белок BCMA-Fc по любому из вариантов осуществления 155-171, в котором одна или несколько аминокислотных замен представляют собой H19Y/S30G; H19Y/V45A; F14Y/H19Y; H19Y/V45D; H19Y/A43E; H19Y/T36A; H19Y/I22V; N11D/H19Y; H19Y/T36M; N11S/H19Y; H19Y/L35P/T46A; H19Y/N47D; S9D/H19Y; H19Y/S30G/V45D; H19Y/R39Q; H19Y/L35P; S9D/H19Y/R27H; Q10P/H19Y/Q25H; H19Y/R39L/N47D; N11D/H19Y/N47D; H19Y/T32S; N11S/H19Y/S29P; H19Y/R39Q/N47D; S16A/H19Y/R39Q; S9N/H19Y/N31K/T46I; H19Y/R27L/N31Y/T32S/T36A; N11S/H19Y/T46A; H19Y/T32I; S9G/H19Y/T36S/A43S; H19Y/S48G; S9N/H19Y/I22V/N31D; S9N/H19Y/Q25K/N31D; S9G/H19Y/T32S; H19Y/T36A/N47Y; H19Y/V45A/T46I; H19Y/Q25K/N31D; H19Y/Q25H/R39Q/V45D; H19Y/T32S/N47D; Q10E/H19Y/A20T/T36S; H19Y/T32S/V45I; H19F/Q25E/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25F/N31S/T36S; H19I/Q25F/N31S/T36V; H19F/Q25V/N31M/T36S; H19Y/Q25Y/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25I/N31M/L35A/T36S; H19I/Q25L/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25L/N31G/L35P/T36A; H19Y/I22L/N31G; H19F/I22V/Q25M/N31P/T36M; H19Y/N31L/L35Y/T36S; H19L/S30G/N31H/L35A; H19L/Q25S/N31V/L35S/T36V; H19L/Q25S/S30Y/N31G/L35M/T36V; H19F/Q25F/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25F/N31S/T36G; H19F/I22V/Q25S/N31V/L35S/T36V; H19F/Q25G/N31S/L35V/T36N; H19L/Q25H/N31D/L35S; или H19F/Q25F/N31S/L35Y/T36S.

173. Вариантный гибридный белок BCMA-Fc по любому из вариантов осуществления 155-163, 167 и 172, в котором одна или несколько аминокислотных замен включают S16A/H19Y/R39Q.

174. Вариантный гибридный белок BCMA-Fc по любому из вариантов

осуществления 155-173, где вариантный полипептид BCMA обладает повышенной аффинностью связывания с одним или обоими APRIL и BAFF по сравнению с эталонным полипептидом BCMA.

175. Вариантный гибридный белок BCMA-Fc по любому из вариантов осуществления 155-174, где вариантный полипептид BCMA обладает повышенной аффинностью связывания с APRIL.

176. Вариантный гибридный белок BCMA-Fc по любому из вариантов осуществления 155-174, где вариантный полипептид BCMA обладает повышенной аффинностью связывания с BAFF.

177. Вариантный гибридный белок BCMA-Fc по любому из вариантов осуществления 155-174, где вариантный полипептид BCMA обладает повышенной аффинностью связывания с APRIL и BAFF.

178. Вариантный гибридный белок BCMA-Fc по любому из вариантов осуществления 174-177, в котором повышенная аффинность связывания с BAFF или APRIL независимо увеличивается более чем в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз., 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или 60 раз.

179. Вариантный гибридный белок BCMA-Fc по любому из вариантов осуществления 155-178, где вариантный полипептид BCMA содержит последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO:357-435.

180. Вариантный гибридный белок BCMA-Fc по любому из вариантов осуществления 155-178, где вариантный полипептид BCMA состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO:357-435.

181. Вариантный гибридный белок BCMA-Fc по любому из вариантов осуществления 155-178, где вариантный полипептид BCMA состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:381.

182. Вариантный гибридный белок BCMA-Fc по любому из вариантов осуществления 155-178, где вариантный полипептид BCMA состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:411.

183. Вариантный гибридный белок BCMA-Fc по любому из вариантов осуществления 155-178, где вариантный полипептид BCMA состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:405.

184. Вариантный гибридный белок BCMA-Fc по любому из вариантов осуществления 155-178, где вариантный полипептид BCMA состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:406.

185. Fc гибридный белок по любому из вариантов осуществления 155-184, где

линкер включает пептидный линкер, а пептидный линкер выбран из GSGGS (SEQ ID NO:592), GGGGS (G4S; SEQ ID NO:593), GSGGGGS (SEQ ID NO:590), GGGGSGGGGS (2xGGGGS; SEQ ID NO:594), GGGGSGGGGSGGGGS (3xGGGGS; SEQ ID NO:595), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (4xGGGGS, SEQ ID NO:600), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (5XGGGGS, SEQ ID NO:671), GGGGSSA (SEQ ID NO:596) или их комбинаций.

186. Fc-гибридный белок по любому из вариантов осуществления 155-185, который является димером.

187. Fc-гибридный белок по любому из вариантов осуществления 155-186, в котором Fc-область иммуноглобулина является гомодимерной Fc-областью.

188. Fc-гибридный белок по любому из вариантов осуществления 155-187, в котором Fc иммуноглобулина представляет собой Fc-домен IgG1, или представляет собой вариант Fc, который проявляет пониженную аффинность связывания с Fc-рецептором и/или пониженную эффекторную функцию, при необходимости по сравнению с Fc-доменом IgG1 дикого типа.

189. Fc-гибридный белок по любому из вариантов осуществления 155-188, где Fc иммуноглобулина является Fc-доменом IgG1, и Fc содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:597.

190. Fc-гибридный белок по любому из вариантов 155-188, в котором Fc иммуноглобулина представляет собой вариантный Fc-домен IgG1, содержащий одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из L234A, L234V, L235A, L235E, G237A, S267K, R292C, N297G и V302C, по нумерации EU.

191. Fc-гибридный белок по варианту осуществления 190, в котором Fc-область иммуноглобулина содержит аминокислотные замены L234A, L235E и G237A по нумерации EU или аминокислотные замены R292C, N297G и V302C по нумерации EU.

192. Fc-гибридный белок по любому из вариантов осуществления 155-191, в котором Fc иммуноглобулина указана в SEQ ID NO:586.

193. Fc-гибридный белок по любому из вариантов осуществления 155-192, где Fc представляет собой вариантную Fc, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:589.

194. Fc-гибридный белок по любому из вариантов осуществления 155-193, который является димером.

195. Fc-гибридный белок по любому из вариантов осуществления 155-194, который является гомодимером.

196. Fc-гибридный белок по любому из вариантов осуществления 155-195,

который нейтрализует APRIL и BAFF.

197. Fc-гибридный белок по любому из вариантов осуществления 155-196, где:

- IC50 для нейтрализации APRIL составляет менее 100 пМ, менее 50 пМ, менее 40 пМ, менее 30 пМ, менее 20 пМ, менее 10 пМ, менее 5 пМ или менее 1 пМ, или является любым значением между любыми из вышеперечисленных; и/или

- IC50 для нейтрализации BAFF составляет менее 400 пМ, менее 300 пМ, менее 200 пМ, менее 100 пМ, менее 75 пМ, менее 50 пМ, менее 25 пМ или менее 10 пМ, или является любым значением между любыми из вышеперечисленны.

198. Fc-гибридный белок по любому из вариантов осуществления 155-196, где:

- Fc-гибридный белок блокирует связывание APRIL, BAFF или гетеротримера APRIL/BAFF с BCMA или TACI; и/или

- Fc-гибридный белок снижает уровни циркулирующих APRIL, BAFF или APRIL/BAFF в крови после введения субъекту.

199. Fc-гибридный белок по любому из вариантов осуществления 155-198, где иммуномодулирующий белок уменьшает или ингибирует созревание, дифференцировку и/или пролиферацию B-клеток.

200. Молекула (молекулы) нуклеиновой кислоты, кодирующая Fc-гибридный белок по любому из вариантов осуществления 155-199.

201. Молекула нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 200, представляющая собой синтетическую нуклеиновую кислоту.

202. Молекула нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 200 или 201, представляющая собой кДНК.

203. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 200-202.

204. Вектор по варианту осуществления 203, который является вектором экспрессии.

205. Вектор по варианту осуществления 203 или 204, в котором вектор представляет собой вектор экспрессии млекопитающих или вирусный вектор.

206. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по любому из вариантов осуществления 200-202 или вектор по любому из вариантов осуществления 203-205.

207. Клетка по варианту осуществления 206, которая является клеткой млекопитающего.

208. Клетка по варианту осуществления 206 или 207, которая является клеткой человека.

209. Способ получения Fc-гибридного белка, включающий введение молекулы

нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 200-202 или вектора по любому из вариантов осуществления 203-205 в клетку-хозяина в условиях для экспрессии белка в клетке.

210. Способ по варианту осуществления 209, дополнительно включающий выделение или очистку Fc-гибридного белка из клетки.

211. Fc-гибридный белок, полученный способом по варианту осуществления 209 или 210.

212. Фармацевтическая композиция, содержащая Fc-гибридный белок по любому из вариантов осуществления 155-199 и 211.

213. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 154 или 212, содержащая фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

214. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 154, 212 и 213, в котором фармацевтическая композиция является стерильной.

215. Изделие, включающее фармацевтическую композицию по любому из вариантов осуществления 154 и 212-214 во флаконе или контейнере.

216. Изделие по варианту осуществления 215, в котором флакон или контейнер герметично закрыт.

217. Набор, содержащий фармацевтическую композицию по любому из вариантов осуществления 154 и 212-214 и инструкции по применению.

218. Набор, включающий изделие по варианту осуществления 215 или 216 и инструкции по применению.

219. Способ снижения иммунного ответа у субъекта, включающий введение иммуномодулирующего белка по любому из вариантов осуществления 1-141 или 153 субъекту, нуждающемуся в этом.

220. Способ снижения иммунного ответа у субъекта, включающий введение Fc-гибридного белка по любому из вариантов осуществления 155-199 и 211 субъекту, нуждающемуся в этом.

221. Способ снижения иммунного ответа у субъекта, включающий введение фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 154 и 211-214 субъекту, нуждающемуся в этом.

222. Способ по любому из вариантов осуществления 219-221, в котором у субъекта снижается иммунный ответ В-клеток, в результате чего снижается или ингибируется созревание, дифференцировка и/или пролиферация В-клеток.

223. Способ по любому из вариантов осуществления 219-222, в котором у субъекта снижают уровни циркулирующих APRIL, BAFF или гетеротримера

APRIL/BAFF.

224. Способ снижения циркулирующих уровней APRIL, BAFF или гетеротримера APRIL/BAFF у субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 155 и 211-214.

225. Способ по варианту осуществления 128 или 221, в котором у субъекта снижается Т-клеточный иммунный ответ, посредством чего снижается или ингибируется костимуляция Т-клеток.

226. Способ по любому из вариантов осуществления 219-225, в котором снижение иммунного ответа лечит заболевание или состояние у субъекта.

227. Способ лечения заболевания или состояния у субъекта, включающий введение иммуномодулирующего белка по любому из вариантов осуществления 1-141 или 153 субъекту, нуждающемуся в этом.

228. Способ лечения заболевания или состояния у субъекта, включающий введение Fc-гибридного белка по любому из вариантов осуществления 155-199 субъекту, нуждающемуся в этом.

229. Способ лечения заболевания или состояния у субъекта, включающий введение фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 154 и 211-214 субъекту, нуждающемуся в этом.

230. Способ по любому из вариантов осуществления 224-227, в котором заболевание или состояние представляет собой аутоиммунное заболевание, В-клеточный рак, патологию, опосредованную антителами, заболевание почек, отторжение трансплантата, болезнь «трансплантат против хозяина» или вирусную инфекцию.

231. Способ по варианту осуществления 230, в котором заболевание или состояние представляет собой аутоиммунное заболевание, выбранное из группы, состоящей из системной красной волчанки (СКВ); синдрома Шегрена, склеродермии, рассеянного склероза, диабета, полимиозита, первичного билиарного цирроза, IgA-нефропатии, неврита зрительного нерва, амилоидоза, синдрома антифосфолипидных антител (APS), аутоиммунного полигландулярного синдрома II типа (APS II), аутоиммунного заболевания щитовидной железы (AITD), болезни Грейвса, аутоиммунного адреналита и вульгарной пузырчатки.

232. Способ по варианту осуществления 230, в котором заболевание или состояние представляет собой В-клеточный рак, а рак представляет собой миелому.

X. ПРИМЕРЫ

Следующие примеры включены только в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения объема изобретения.

Пример 1. Генерация и оценка вариантов полипептидов внеклеточного домена CTLA-4 в качестве молекулы, ингибирующей Т-клетки (TIM)

В этих примерах описываются примерные молекулы, ингибирующие Т-клетки, из полипептида CTLA-4 (TIM), которые используются как часть предлагаемого мультидоменного иммуномодулирующего белка с молекулой, ингибирующей В-клетки (BIM), включая способы конструирования и идентификации модифицированных по аффинности (вариантных) полипептидов CTLA-4, которые связываются (например, на повышенном уровне, по сравнению с диким типом) с лигандами рецептора, стимулирующего Т-клетки.

Мутантные ДНК-конструкции доменов IgSF CTLA-4 человека были получены для трансляции и экспрессии на поверхности дрожжей в качестве библиотек дрожжевого дисплея.

Библиотеки, содержащие случайные замены аминокислот, были сконструированы для идентификации вариантов внеклеточного домена (ECD) CTLA-4, содержащего домен суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF) (VTDCTLA-4), на основе последовательности CTLA-4 человека дикого типа, указанной в SEQ ID NO:1 далее:

KAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAAT YMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYYLGIGNGT QIYVIDPEPCPDSD (SEQ ID NO:1).

ДНК, кодирующую ECD CTLA-4 дикого типа, клонировали между сайтами BamHI и KpnI модифицированного вектора дрожжевого дисплея pBYDS03 (Life Technologies, США). Мутации вводили с помощью ПЦР сниженной точности с использованием набора Genemorph II (Agilent, США), с добавлением $MnCl_2$, и с использованием ECD-специфичных олигонуклеотидов, которые перекрывались на 40 п.н. с вектором клонирования pBYDS03 за пределами и включая сайты клонирования BamHI и KpnI. Продукт ПЦР – подвергнутую мутагенезу ДНК очищали с помощью электрофореза в агарозном геле, затем дополнительно амплифицировали, используя 100 нг мутагенизированного продукта ПЦР с помощью OneTaq 2x PCR Master Mix (New England Biolabs, США). Продукты второй ПЦР очищали с помощью электрофореза в агарозном геле и посредством очистки ПЦР-гелем (Qiagen, Германия) и ресуспендировали в стерильной деионизированной воде. Для каждой последующей электропорации дрожжей было получено в общей сложности 12 мкг продукта ПЦР.

Для подготовки к вставке в библиотеку вектор pBYDS03 расщепляли с помощью ферментов рестрикции BamHI и KpnI (New England Biolabs, США), а большой фрагмент вектора очищали с помощью геля и растворяли в стерильной деионизированной воде.

Готовую к электропорации ДНК для следующего этапа получали путем смешивания 12 мкг вставки библиотечной ДНК с 4 мкг линеаризованного вектора в общем объеме 50 мкл деионизированной и стерильной воды.

Библиотеки ДНК CTLA-4 вводили в дрожжи с помощью электропорации. Вкратце, клетки дрожжевого штамма BJ5464, способные к электропорации (ATCC.org; Номер ATCC 208288) были подготовлены и электропорированы на Gene Pulser II (Biorad, США) с готовой к электропорации ДНК с вышеуказанных стадий, по существу, как описано (Colby, D.W. et al. 2004 Methods Enzymology 388, 348-358). Единственным исключением является то, что трансформированные клетки выращивали в неиндуцирующей минимальной селективной среде SCD-Leu для размещения селективного маркера LEU2, переносимого модифицированной плазмидой pBYDS03. На один литр среды SCD-Leu добавляли 14,7 г натрия цитрата, 4,29 г лимонной кислоты моногидрата, 20 г декстрозы, 6,7 г дрожжевой азотной основы и 1,6 г дрожжевой синтетической добавки для отсева без лейцина. Среду подвергали стерилизующей фильтрации перед использованием с применением вакуумного фильтрующего устройства с размером пор 0,22 мкм.

Размер библиотеки определяли путем нанесения серийных разведений свежевыделенных клеток на пластины с агаром SCD-Leu, а затем экстраполировали размер библиотеки на количество одиночных колоний при нанесении, которые образовали по меньшей мере 50 колоний на планшет. В целом, размеры библиотеки варьировали от $1{,}0\times10^{8}$ до 1×10^{9} трансформантов на основе этого анализа разведения. Оставшуюся часть электропорированной культуры выращивали до насыщения в SCD-Leu, и клетки из этой культуры повторно культивировали (например, 1/100) в свежей среде SCD-Leu, чтобы свести к минимуму долю нетрансформированных клеток, и выращивали в течение ночи. Чтобы сохранить разнообразие библиотеки, этот этап субкультуры проводили с использованием инокулята, который содержал по меньшей мере в 10 раз больше клеток, чем рассчитанный размер библиотеки. Клетки из второй насыщенной культуры ресуспендировали в свежей среде, содержащей стерильный 25% (масса/объем) глицерина до плотности 1×10^{10}/мл, замораживали и хранили при -80°C (замороженный библиотечный фонд).

Дрожжи, экспрессирующие аффинно модифицированные варианты IgD CTLA-4, были отобраны против ICOSL и/или CD86. Количество клеток, по меньшей мере в 10 раз превышающее расчетный размер библиотеки, размораживали из отдельных библиотечных запасов, суспендировали до $1{,}0\times10^{6}$ клеток/мл в неиндуцирующей SCD-Leu среде и выращивали в течение ночи. На следующий день количество клеток, в 10 раз превышающее размер библиотеки, центрифугировали при 2000 об/мин в течение двух

минут и ресуспендировали до $5,0\times10^6$ клеток/мл в индуцирующей среде SCDG-Leu. Один литр индуцирующей среды SCDG-Leu, состоящей из 5,4 г Na_2HPO_4, 8,56 г $NaH_2PO_4\bullet H_2O$, 20 г галактозы, 2,0 г декстрозы, 6,7 г дрожжевой азотистой основы и 1,6 г дрожжевой синтетической добавки для отсева без лейцина, растворенных в воде, стерилизовали через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм. Культуру выращивали в индуцирующей среде в течение 1 дня при комнатной температуре, чтобы индуцировать экспрессию библиотечных белков на поверхности дрожжевых клеток.

Индуцированную дрожжевую библиотеку подвергали 4 циклам сортировки с использованием магнитных гранул, загруженных попеременно ICOSL или CD86, для уменьшения количества несвязывающих веществ и обогащения для вариантных молекул CTLA-4, обладающих способностью связывать ICOSL или CD86. После каждого цикла отбора дрожжи, удерживаемые путем связывания с магнитными гранулами, амплифицировали путем выращивания в среде SCD с последующей индукцией в течение ночи в среде SCDG. За предварительным отбором последовали два раунда сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) с использованием ICOSL-Fc в 1-м раунде и CD86-Fc во 2-м раунде для обогащения фракции дрожжевых клеток, которая демонстрирует улучшенные связывающие свойства. Обогащение магнитными гранулами и отбор методом проточной цитометрии проводили в основном так, как описано в Miller et al., Current Protocols in Cytometry 4.7.1-4.7.30, July 2008.

В этом процессе селекции использовали следующие реагенты и инструменты: человеческий rICOSL.Fc (т.е. рекомбинантный гибридный белок ICOSL-Fc) и белки-лиганды-мишени rCD86.Fc человека были приобретены у R&D Systems, США. Магнитные гранулы белка А были получены в New England Biolabs, США. Для двухцветной проточной цитометрической сортировки использовали сортировщик Bio-Rad S3e. Уровни дисплея CTLA-4 контролировали с помощью антитела к гемагглютинину, меченного Alexafluor 488 (Life Technologies, США). Лигандное связывание гибридных белков Fc, rICOSL.Fc или rCD86.Fc, выявляли с помощью PE-конъюгированного человеческого Ig-специфического козьего Fab (Jackson ImmunoResearch, США). Дуплетные дрожжи были выделены с использованием параметров прямого рассеяния (FSC)/ бокового рассеяния (SSC), и гейтинг сортировки был основан на более высоком связывании лиганда, обнаруженном в FL2, который обладал более ограниченным связыванием метки экспрессии в FL1.

Отсортированные дрожжи от проточной цитометрии анализировали на более высокую специфическую аффинность связывания. Дрожжи на выходе сортировки были размножены и повторно индуцированы для экспрессии конкретных вариантов домена

IgSF с модифицированной аффинностью, которые они кодируют. Затем эту популяцию сравнивали с родительским штаммом дрожжей дикого типа или другими выбранными исходными данными, такими как популяция дрожжей, собранных на гранулах, с помощью проточной цитометрии.

После второго раунда FACS полученный продукт последовательно разбавляли и наносили на SCD-агар таким образом, чтобы можно было выделить единичные клоны. Двести восемьдесят восемь колоний отбирали в микротитровальные планшеты с круглым дном, содержащие 150 мкл среды SCD, дополненной канамицином, пенициллином и стрептомицином. Планшеты инкубировали при 30°C с встряхиванием. После 4 часов роста 80 мкл переносили в лунки нового планшета, клетки осаждали центрифугированием, SCD удаляли, в каждую лунку добавляли 200 мкл среды для индукции SCDG, дополненной антибиотиками, с последующей инкубацией в течение ночи при комнатной температуре с встряхиванием. Анализ FACS использовали для независимой оценки связывания каждого клона с rICOSL-Fc, rCD86-Fc и анти-HA Mab в качестве контроля экспрессии. Контрольные лунки дрожжей, содержащих CTLA-4 дикого типа, использовали на каждом планшете. 16 клонов были отобраны для переформатирования в конструкциях Fc гибридов, и секвенированы, как описано ниже.

Анализ последовательностей 16 клонов дрожжей выявил единственную доминирующую комбинацию мутаций (L12P/A26T/L63P/L98Q/Y105L; SEQ ID NO:3). Чтобы создать дополнительное клональное разнообразие и определить минимальные мутации, необходимые для усиленного связывания, мутации в этом клоне были частично перемешаны с последовательностью дикого типа. Вкратце, были сконструированы три пары ПЦР-праймеров, которые разделили область кодирования ECD на трети. Праймеры для ПЦР поддерживали последовательность, перекрывающуюся на 20 п.н., с соседним продуктом ПЦР, чтобы облегчить последующее клонирование сборки Гибсона. Три продукта ПЦР были получены как из дикого типа (A_1, B_1, C_1), так и из мутантной матрицы (A_2, B_2, C_2). Комбинации из 3 продуктов ПЦР, например, A_2, B_1, C_1; A_2, B_2, C_1 и т.д., смешивали с модифицированным вектором гибрида Fc для проведения рекомбинации in vitro с использованием Gibson Assembly Mastermix (New England Biolabs, США), который впоследствии использовали для трансформации теплового шока в штамм E. coli NEB® 5-альфа. Эта перетасовка с последовательностью дикого типа привела к SEQ ID NO:4-10.

Вторая библиотека случайных мутаций была создана с помощью подверженной ошибкам ПЦР с использованием клонов из отбора Gen1 в качестве матрицы. Эта библиотека, описанная как Gen2, была сконструирована с использованием того же процесса, который был описан ранее, за исключением того, что ДНК-матрица состояла из

пула клонов Gen1 вместо ДНК ECD CTLA-4 дикого типа. Дрожжевая библиотека была подвергнута скринингу с помощью итеративных циклов сортировки FACS, чередующихся между rICOSL-Fc и rCD86-Fc, для создания множества пулов из клонов. Как и прежде, пулы дрожжей анализировали на связывание с помощью FACS. На основании связывания с rICOSL-Fc, rCD86-Fc, rCD80-Fc с помощью FACS было отобрано несколько пулов для ПЦР-клонирования в Fc-вектор. Последующий анализ последовательности и продукцию белка проводили, как описано для Gen1.

Результаты отбора были переформатированы в иммуномодулирующие белки, содержащие аффинно модифицированный (вариант) ECD CTLA-4, гибридизованный с молекулой Fc (вариант гибридных молекул ECD-Fc). Для получения рекомбинантных иммуномодулирующих белков, которые представляют собой Fc-гибридные белки, содержащие ECD CTLA-4 по меньшей мере с одним аффинно-модифицированным доменом (например, вариантный ECD CTLA-4 -Fc), кодирующую ДНК генерировали для кодирования белка следующим образом: вариантный (мутантный) ECD, за которым следует линкер из 7 аминокислот (GSGGGGS; SEQ ID NO:590), за которым следует человеческая Fc IgG1, содержащая мутации L234A, L235E и G237A по нумерации EU. Поскольку конструкция не включает в себя какие-либо легкие цепи антител, которые могут формировать ковалентную связь с цистеином, человеческая Fc IgG1 также содержала замену остатков цистеина на остаток серина в положении 220 (C220S) по нумерации EU (соответствующую положению 5 (C5S) со ссылкой на дикий тип или неизмененную Fc, указанную в SEQ ID NO:586). В Fc-области также отсутствовал C-концевой лизин в положении 447 (обозначенном K447del), обычно кодируемый в гене константной области IgG1 человека дикого типа (соответствующем положению 232 дикого типа или немодифицированной Fc, указанной в SEQ ID NO:586). Безэффекторная (инертная) Fc IgG1 в гибридных конструкциях указана в SEQ ID NO:589:

SEQ ID NO:589

EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Полученные клетки из конечных сортировок CTLA-4 методом проточной цитометрии выращивали до конечной плотности в среде SCD-Leu. Плазмидную ДНК из каждого продукта выделяли с использованием набора для выделения дрожжевой плазмидной ДНК (Zymoresearch, США). Для Fc-гибридов использовали ПЦР-праймеры с добавленными сайтами рестрикции, пригодными для клонирования в выбранный вектор

Fc-гибрида, для периодической амплификации из плазмидных ДНК препаратов кодирующей ДНК для мутантных целевых ECD. После рестрикционного расщепления продукты ПЦР лигировали в соответствующий вектор Fc-гибрида с последующей трансформацией тепловым шоком в штамм XL1-Blue *E. coli* (Agilent, США) или NEB® 5-alpha (New England Biolabs) по указанию поставщика. Альтернативно, результаты были ПЦР-амплифицированы с помощью праймеров, содержащих области перекрытия 40 п.н. на обоих концах, с модифицированным вектором Fc-гибрида для проведения рекомбинации in vitro с использованием Gibson Assembly Mastermix (New England Biolabs, США), который впоследствии был использован для трансформации теплового шока в штамм *E. coli* NEB® 5-альфа. Примером вектора Fc-гибрида является pFUSE-hIgG1-Fc2 (InvivoGen, США).

Разведения реакций трансформации наносили на LB-агар, содержащий 100 мкг/мл карбенициллина (Teknova, США), чтобы выделить отдельные колонии для отбора. Затем до 96 колоний от каждой трансформации выращивали в 96-луночных планшетах до насыщения в течение ночи при 37°C в LB-бульоне (кат.№ L8112, Teknova, США), и небольшую аликвоту из каждой лунки отправляли для секвенирования ДНК вставки ECD с целью идентификации мутации (мутаций) во всех клонах. Подготовку образцов для секвенирования ДНК проводили с использованием протоколов, предоставленных поставщиком (Genewiz; Южный Плейнфилд, Нью-Джерси). После удаления образца для секвенирования ДНК к оставшимся культурам добавляли глицерин до конечного содержания глицерина 25%, и планшеты хранили при -20°C для дальнейшего использования в качестве мастер-планшетов (см. ниже). Альтернативно, образцы для секвенирования ДНК получали путем нанесения реплик из выращенных жидких культур на твердые агаровые пластины с использованием одноразового 96-луночного репликатора (VWR, США). Эти пластины инкубировали в течение ночи для получения участков роста, и пластины были отправлены в Genewiz для секвенирования ДНК в соответствии с их спецификациями.

После анализа данных секвенирования ДНК, полученных Genewiz, представляющие интерес клоны извлекали из мастер-планшетов и индивидуально выращивали до насыщения в 5 мл жидкого LB-бульона, содержащего 100 мкг/мл карбенициллина (Teknova, США), и затем использовали 2 мл каждой культуры для получения приблизительно 10 мкг из минипрепаратной плазмидной ДНК каждого клона с использованием стандартного набора, такого как система получения плазмид PureYield (Promega, США). Идентификация представляющих интерес клонов обычно включала следующие этапы. Во-первых, файлы данных о последовательности ДНК были загружены

с веб-сайта Genewiz. Затем все последовательности были обработаны вручную таким образом, чтобы они начинались с начала области кодирования ECD. Последовательности Genewiz были обработаны для создания выравниваний с использованием программного обеспечения Ugene (http://ugene.net).

Затем клоны, представляющие интерес, были идентифицированы с использованием следующих критериев: (1) идентичный клон встречается по меньшей мере два раза в выравнивании, и (2) мутация встречается по меньшей мере два раза в выравнивании и предпочтительно в различных клонах. Клоны, которые соответствовали хотя бы одному из этих критериев, были обогащены в процессе сортировки, скорее всего, благодаря улучшенному связыванию.

Fc-гибридные белки, содержащие вариантные ECD CTLA-4, были получены путем экспрессии и очистки с высокой пропускной способностью. Рекомбинантные вариантные Fc-гибридные белки были получены из адаптированных к суспензии клеток эмбриональной почки человека (HEK) 293 с использованием экспрессионной системы Expi293 (Invitrogen, США). 4 мкг каждой плазмидной ДНК добавляли к 200 мкл Opti-MEM (Invitrogen, США) одновременно с тем, как 10,8 мкл ExpiFectamine отдельно добавляли к другим 200 мкл Opti-MEM. Через 5 минут 200 мкл плазмидной ДНК смешивали с 200 мкл ExpiFectamine и дополнительно инкубировали в течение еще 20 минут, прежде чем добавлять эту смесь к клеткам. Десять миллионов клеток Expi293 распределяли в отдельные лунки стерильного 10 мл 24-луночного планшета для выращивания с лунками с коническим дном (Thomson Instrument Company, США) в объеме 4 мл среды Expi293 (Invitrogen, США). Планшеты встряхивали в течение 5 дней при 120 оборотах в минуту в инкубаторе для культивирования клеток млекопитающих, настроенном на 95% влажность и 8% CO_2. После 5-дневной инкубации клетки осаждали и удаляли надосадочную жидкость культуры.

Белок очищали от надосадочной жидкости с использованием высокопроизводительного 96-луночного набора для очистки протеина A по протоколу производителя (номер по каталогу 45202, Life Technologies, США). Полученные фракции элюирования подвергали буферному обмену в PBS с использованием 96-луночного вращающегося планшета для обессоливания Zeba (номер по каталогу 89807, Life Technologies, США) по протоколу производителя. Очищенный белок определяли количественно с использованием поглощения при 280 нм, измеренного прибором Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, США), и чистоту белка оценивали путем загрузки 5 мкг белка на предварительно отлитые полиакриламидные гели NUPAGE (Life Technologies, США) в денатурирующих и восстанавливающих условиях и последующего

гель-электрофореза. Белки визуализировали в геле с использованием стандартного окрашивания красителем кумасси.

Аминокислотные замены в выбранных vIgD CTLA-4, которые были идентифицированы путем отбора, приведены в Таблице 3. Выбранные vIgD CTLA-4, отформатированные как Fc-гибридные белки, были протестированы на связывание и функциональную активность, как описано ниже.

A. Функциональная характеристика

Исследования связывания были выполнены для оценки специфичности и аффинности гибридных белков CTLA-4 vIgD-Fc к партнерам по связыванию CD80, CD86 и ICOSL. Вариантные Fc-гибридные белки были дополнительно охарактеризованы на биологическую активность в анализах первичных Т-клеток человека in vitro.

1. Связывание

Для получения клеток, экспрессирующих партнера по связыванию, полноразмерные конструкции поверхностной экспрессии млекопитающих для каждого из человеческих CD80, CD86 и ICOSL были сконструированы в векторах экспрессии pcDNA3.1 (Life Technologies) и получены из Genscript, США. Исследования связывания проводили с использованием описанной выше системы временной трансфекции Expi293F (Life Technologies, США). Было определено количество клеток, необходимое для эксперимента, и была проведена соответствующая трансфекция в объеме 30 мл с использованием предложенного производителем протокола. Для каждой контр-структуры или имитационной трансфекции объемом 30 мл 75 миллионов клеток Expi293F инкубировали с 30 мкг ДНК экспрессирующей конструкции и 1,5 мл разбавленного реагента ExpiFectamine 293 в течение 48 часов, после чего клетки собирали для окрашивания.

Для анализа посредством проточной цитометрии 200 000 клеток с соответствующей временной трансфекцией или отрицательным контролем были помещены в 96-луночные пластины с круглым дном. Клетки осаждали и суспендировали в буфере для окрашивания (PBS (физиологический раствор с фосфатным буфером), 1% BSA (бычий сывороточный альбумин) и 0,1% азид натрия) в течение 20 минут для блокирования неспецифического связывания. Затем клетки снова центрифугировали и суспендировали в буфере для окрашивания, содержащем от 100 нМ до 100 мкм CTLA-4 IgSF варианта Fc-гибридного белка в 50 мкл. Первичное окрашивание проводили в течение 45 минут, перед тем как дважды промыть клетки в буфере для окрашивания. Для трансфекций CD86 связанный белок определяли с помощью PE-конъюгированного античеловеческого Fc (Jackson ImmunoResearch, США), разведенного 1:150 в 50 мкл

буфера для окрашивания, инкубировали в течение 30 минут. Для трансфекций CD80 и ICOSL связанный белок улавливали антителом против CTLA-4 (Biolegend, США), разведенным 1:130 в 50 мкл буфера для окрашивания. После 30-минутной инкубации клетки дважды промывали и выявляли с помощью PE-конъюгированного анти-мышиного Fc (Jackson ImmunoResearch, США), разведенного 1:150 в 50 мкл, при дополнительной 30-минутной инкубации. Клетки дважды промывали для удаления несвязанных конъюгированных антител, фиксировали в 2% формальдегиде/PBS и анализировали на FACScan (Becton Dickinson, США) или проточном цитометре Hypercyt (Intellicyte, США).

Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) рассчитывали для каждой трансфектантной и отрицательной родительской линии с помощью программного обеспечения Cell Quest Pro (Becton Dickinson, США) или программного обеспечения Forcyte (Intellicyt, США).

2. Продукция цитокинов в анализах анти-CD3 костимуляции

Биологическую активность растворимого CTLA-4-Fc тестировали в реакции смешанных культур лимфоцитов человека (MLR). Первичные дендритные клетки (DC) человека получали путем культивирования моноцитов, выделенных из PBMC (BenTech Bio, США) in vitro в течение 7 дней с 50 нг/мл rIL-4 (R&D Systems, США) и 80 нг/мл rGM-CSF (R&D Systems, США) в среде Ex-Vivo 15 (Lonza, Швейцария). На 3-й и 5-й дни половину среды удаляли и заменяли свежей средой, содержащей 50 нг/мл rIL-4 и 80 нг/мл rGM-CSF. Чтобы полностью индуцировать созревание DC, липополисахарид (LPS) (InvivoGen Corp., США) добавляли в количестве 100 нг/мл к культурам DC на 6-й день, и клетки инкубировали в течение дополнительных 24 часов. Приблизительно 10 000 созревших DC и 100 000 очищенных аллогенных CD3+ Т-клеток (BenTech Bio, США) совместно культивировали с CTLA-4-вариантными Fc-гибридными белками и контролями в 96-луночных круглодонных планшетах в конечном объеме 200 мкл среды Ex-Vivo 15. На 4-5-й день секрецию IFN-гамма в надосадочной жидкости культуры анализировали с использованием набора для ELISA человеческого IFN-γ Duoset (R&D Systems, США). Оптическую плотность измеряли на многорежимном ридере для микропланшетов BioTek Cytation (BioTek Corp., США) и количественно сравнивали с титрованным стандартом rIFN-γ, входящим в комплект IFN-γ Duo-set (R&D Systems, США.

3. Результаты

Результаты анализов биологической активности связывания и костимуляции, описанных выше для вариантных и немодифицированных полипептидов CTLA-4, суммированы в таблицах E1-E3. Значения для связывания CD80, CD86 и ICOSL (MFI) и секреции интерферона-гамма [пг/мл] приведены в дополнение к относительному

коэффициенту по сравнению с соответствующим связыванием и секрецией немодифицированного полипептида CTLA-4 (ΔWT) для каждого эксперимента. Относительные коэффициенты связывания, которые были существенно ниже 0,1, указаны как 0. Кроме того, данные MLR для вариантов, в которых вариант подавлял секрецию интерферона гамма до неопределяемых уровней, также сообщаются как 0.

Таблица E1. Связывающая и костимулирующая биоактивность вариантных CTLA-4-Fc полипептидов

Мутации	SEQ ID NO (ECD)	Связывание			MLR
		CD80 MFI (ΔWT)	CD86 MFI (ΔWT)	ICOSL MFI (ΔWT)	IFN-γ [пг/мл] (ΔWT)
L12P/A26T/L63P/L98Q/Y105L	3	829 (0,2)	761890 (1,1)	873 (0,5)	216 (0,3)
L12P/A26T	5	1024 (0,2)	276276 (0,4)	928 (0,6)	850 (1,3)
L12P/A26T/L63P	6	2400 (0,5)	500345 (0,7)	891 (0,5)	671 (1,0)
L63P/L98Q/Y105L	7	4718 (1,0)	410571 (0,6)	1802 (1,1)	124 (0,2)
L98Q/Y105L	8	3863 (0,8)	685365 (1,0)	1186 (0,7)	124 (0,2)
L63P	9	3932 (0,8)	595807 (0,8)	966 (0,6)	261 (0,4)
L98R/N110K	10	2110 (0,4)	665012 (0,9)	1046 (0,6)	344 (0,5)
WT CTLA-4	1	4775 (1,0)	708753 (1,0)	1664 (1,0)	662 (1,0)

Таблица E2. Связывающая и костимулирующая активность вариантных CTLA-4-Fc полипептидов

Мутации	SEQ ID NO (ECD)	Связывание			MLR
		CD80 MFI (ΔWT)	CD86 MFI (ΔWT)	ICOSL MFI (ΔWT)	IFN-γ [пг/мл] (ΔWT)
L12P/A26T/L63P/L98Q/ M99L/Y105L	11	2026 (0,4)	33068 (0,9)	1222 (0,7)	569 (1,5)
E33M/Q82H/L98Q/M99L/Y105 L	12	1098 (0,2)	35506 (1,0)	1792 (1,1)	253 (0,7)
L63P/S72G/L98Q/M99L/ Y105L	13	2591 (0,5)	33477 (0,9)	1604 (1,0)	586 (1,6)
S14N/R16C/I18T/M56K/ T61A/L63P/A86T/M99L	14	3773 (0,8)	30572 (0,8)	990 (0,6)	441 (1,2)
S27P/M56K/L63P/S72G/ S73R/T89A/M99L/Y105L/I117 M	15	1982 (0,4)	33467 (0,9)	1354 (0,8)	426 (1,1)
M56K/L63P/N75D/V96I/ M99L/Y105L/L106I	16	3775 (0,8)	31296 (0,9)	1719 (1,0)	583 (1,6)
L63P/S72G/Y105L	17	3831 (0,8)	32160 (0,9)	1362 (0,8)	123 (0,3)
L63P/L98Q/M99L/Y105L/ I117M	18	2635 (0,6)	32564 (0,9)	1761 (1,1)	539 (1,4)
L63P/S72G/L98Q/M99L/ Y105L/L106I/I117L	19	2463 (0,5)	32830 (0,9)	1930 (1,2)	603 (1,6)
A26T/L63P/S72G/L98Q/ Y105L/L106I/I117L	20	3576 (0,7)	31549 (0,9)	939 (0,6)	83 (0,2)
L63P/L98Q/V116A	21	2772 (0,6)	32657 (0,9)	1033 (0,6)	298 (0,8)
G29W/L98Q/M99L/Y105L	22	1772 (0,4)	32977 (0,9)	6183 (3,7)	745 (2,0)
T37S/M56V/L98Q/Y105L	23	2115 (0,4)	27628 (0,8)	881 (0,5)	148 (0,4)

Таблица E2. Связывающая и костимулирующая активность вариантных CTLA-4-Fc полипептидов

Мутации	SEQ ID NO (ECD)	Связывание			MLR
		CD80 MFI (ΔWT)	CD86 MFI (ΔWT)	ICOSL MFI (ΔWT)	IFN-γ [пг/мл] (ΔWT)
A26T/Y54F/M56K/M99L/ Y105L	24	1526 (0,3)	28149 (0,8)	1113 (0,7)	552 (1,5)
L12P/I18T/A26T/M55T/ T69S/S72G/M99L/Y105L	25	1577 (0,3)	25936 (0,7)	931 (0,6)	944 (2,5)
V22I/L63P/L98Q/Y105L/ I117M	26	2802 (0,6)	27629 (0,8)	1013 (0,6)	103 (0,3)
A26T/L63P/S72G/L98Q/ M99L/Y105L	27	2899 (0,6)	26407 (0,7)	1759 (1,1)	195 (0,5)
I18T/T61R/L63P/S72G /L98Q/M99L/P102L/Y105L	190	1140 (0,2)	46974 (1,3)	935 (0,6)	714 (1,9)
E33M/A42T/L98Q/ Y105L	28	1623 (0,3)	27354 (0,7)	1675 (1,0)	638 (1,7)
M55T/E97Q/M99L/ Y105F	29	906 (0,2)	6249 (0,2)	1037 (0,6)	575 (1,5)
M55T/S72G/L98Q/M99L/ Y105L	30	1940 (0,4)	30594 (0,8)	2313 (1,4)	594 (1,6)
R16C/G29W/E33V/M55T /L63P/L98Q/Y105L	31	2678 (0,6)	28858 (0,8)	1480 (0,9)	144 (0,4)
L12P/A26T/L63P/L98Q/ Y105L/L106I	32	2318 (0,5)	28463 (0,8)	879 (0,5)	127 (0,3)
M56L/L63P/L98Q/Y105L /L106I/I117L	33	3487 (0,7)	32054 (0,9)	963 (0,6)	72 (0,2)
S15P/I18V/M56T/L98Q/ M99L/Y105L	34	1445 (0,3)	33793 (0,9)	1505 (0,9)	622 (1,7)
I18T/G29W/L63P/L98Q/ Y105L	35	10109 (2,1)	29367 (0,8)	1711 (1,0)	50 (0,1)
L63P/Q82H/L98Q/M99L/ Y105L	36	2777 (0,6)	31740 (0,9)	2110 (1,3)	723 (1,9)
L98Q/M99L/Y105L/L106I/ I117T	37	1117 (0,2)	28174 (0,8)	1081 (0,6)	944 (2,5)
L98Q/M99L/Y105L/L106I/Y115 N	38	1074 (0,2)	27514 (0,7)	939 (0,6)	322 (0,9)
M55T/L63P/T71I/M99L/Y105L	39	2900 (0,6)	24010 (0,7)	1125 (0,7)	384 (1,0)
A26T/T53S/M56K/L63P/L98Q/ Y105L	40	3352 (0,7)	23688 (0,6)	1042 (0,6)	88 (0,2)
I18T/A26T/L63P/Q82R/L98Q/Y 105L	41	3650 (0,8)	26133 (0,7)	923 (0,6)	105 (0,3)
L12H/M55T/E59D/L63P/M99L	42	2877 (0,6)	26206 (0,7)	876 (0,5)	619 (1,7)
I18T/L63P/S72G/L98Q/Y105L/I 108V	43	2706 (0,6)	26196 (0,7)	960 (0,6)	62 (0,2)
I18T/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y 105L	44	2442 (0,5)	29111 (0,8)	2489 (1,5)	817 (2,2)
T61A/L63P/S72G/L98Q/M99L/ Y105L	45	2505 (0,5)	32390 (0,9)	1987 (1,2)	944 (2,5)
V38I/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y 105L	46	3433 (0,7)	33373 (0,9)	2410 (1,4)	846 (2,3)
L63P/S72G/I93L/L98Q/M99L/Y 105L	47	3282 (0,7)	32885 (0,9)	2277 (1,4)	897 (2,4)
L12I/M55T/M56V/I67T/M99L/L 106R/I108F	48	2917 (0,6)	31744 (0,9)	2485 (1,5)	842 (2,3)
I18N/A26T/L63H/T89A/L98Q/ M99L/Y105L	49	1943 (0,4)	31558 (0,9)	2175 (1,3)	689 (1,8)
I18T/E48R/L63P/T69S/L98Q/Y1	50	1086 (0,2)	23508 (0,6)	1124 (0,7)	645 (1,7)

Таблица E2. Связывающая и костимулирующая активность вариантных CTLA-4-Fc полипептидов

Мутации	SEQ ID NO (ECD)	Связывание			MLR
		CD80 MFI (ΔWT)	CD86 MFI (ΔWT)	ICOSL MFI (ΔWT)	IFN-γ [пг/мл] (ΔWT)
05L/N110Y					
I18N/L63P/S72T/M87T/L98Q/Y105L/N110S	51	1998 (0,4)	36385 (1,0)	1032 (0,6)	73 (0,2)
G29W/M56T/L63P/L98Q/Y105L/L106I/I117L	52	3308 (0,7)	32787 (0,9)	1258 (0,8)	78 (0,2)
G29W/N58S/L63P/M87T/L98Q/M99L/Y105L	53	3381 (0,7)	32622 (0,9)	3622 (2,2)	578 (1,6)
G29W/N58S/L63P/D64N/L98Q/M99L/Y105L	54	3750 (0,8)	33612 (0,9)	2158 (1,3)	227 (0,6)
I18T/L63P/S72G/M87K/L98Q/M99L/Y105L	55	2925 (0,6)	35032 (1,0)	1999 (1,2)	679 (1,8)
WT CTLA-4	1	4775 (1,0)	36785 (1,0)	1664 (1,0)	373 (1,0)

Таблица E3. Связывающая и костимулирующая биоактивность вариантных CTLA-4-Fc полипептидов

Мутации	SEQ ID NO (ECD)	Связывание			MLR
		CD80 MFI (ΔWT)	CD86 MFI (ΔWT)	ICOSL MFI (ΔWT)	IFN-γ [пг/мл] (ΔWT)
M56V	56	2688 (0,6)	36766 (0,1)	822 (0,5)	176 (1,3)
L63P/K95R	57	2914 (0,6)	33412 (0,0)	819 (0,5)	165 (1,2)
L63P/L98Q	58	2830 (0,6)	31416 (0,0)	885 (0,5)	229 (1,6)
L98Q/M99L/Y105L	59	1472 (0,3)	33977 (0,0)	1541 (0,9)	325 (2,3)
L63P/M87K/M99L/L106R	60	3329 (0,7)	61526 (0,1)	2540 (1,5)	531 (3,8)
L63P/M99L/Y105L/I108F	61	2142 (0,4)	32781 (0,0)	3759 (2,3)	1053 (7,5)
V10A/L63P/L98Q/Y105L	62	3148 (0,7)	34595 (0,0)	869 (0,5)	141 (1,0)
M56T/L91R/L98Q/Y105L	63	1713 (0,4)	33645 (0,0)	1128 (0,7)	0 (0,0)
A26T/L63P/M87V/N110K/I117E	64	2909 (0,6)	31487 (0,0)	973 (0,6)	426 (3,0)
G29W/L63P/L98Q/M99L/Y105L	65	5165 (1,1)	37721 (0,1)	3023 (1,8)	438 (3,1)
A26T/V46E/L63P/D65G/L98Q	66	5009 (1,0)	38407 (0,1)	888 (0,5)	273 (1,9)
G29W/N58S/L63P/L98Q/Y105L	67	15619 (3,3)	34897 (0,0)	1374 (0,8)	0 (0,0)
G29W/E59G/L63P/L98Q/Y105L	68	3214 (0,7)	32786 (0,0)	1148 (0,7)	0 (0,0)
L12H/L63P/S72G/L98Q/Y105L	69	2034 (0,4)	31843 (0,0)	857 (0,5)	87 (0,6)
A6T/A26T/M55T/M99L/Y105L	70	1429 (0,3)	33589 (0,0)	938 (0,6)	472 (3,4)
A26T/L63P/D65G/L98Q/M99L/Y105L	71	2324 (0,5)	33672 (0,0)	2200 (1,3)	264 (1,9)
V10A/L63P/D64V/S72G/L98Q/M99L/Y105L	72	2598 (0,5)	33868 (0,0)	2502 (1,5)	904 (6,4)
L12P/G29W/D43N/N58S/L63P/L98Q/M99L/Y105L	73	1486 (0,3)	30004 (0,0)	1276 (0,8)	352 (2,5)
I18V/A26T/L63P/D64E/L98Q/Y105L/L106R/N110K	74	4096 (0,9)	30852 (0,0)	17220 (10,3)	0 (0,0)
A19V/G29W/R35K/L63P/L98Q/M99L/Y105L	75	2349 (0,5)	33255 (0,0)	3119 (1,9)	445 (3,2)

Таблица E3. Связывающая и костимулирующая биоактивность вариантных CTLA-4-Fc полипептидов					
Мутации	SEQ ID NO (ECD)	Связывание			MLR
		CD80 MFI (ΔWT)	CD86 MFI (ΔWT)	ICOSL MFI (ΔWT)	IFN-γ [пг/мл] (ΔWT)
L12P/A26T/L63P/S72G/T89M/L98Q/M99L/Y105L	76	1833 (0,4)	924222 (1,3)	919 (0,6)	536 (3,8)
P28L/E33V/L63P/S72G/L98R/M99L/Y105L	77	1441 (0,3)	782025 (1,1)	966 (0,6)	535 (3,8)
E24Q/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	78	2864 (0,6)	729343 (1,0)	1080 (0,6)	867 (6,2)
I18T/G29R/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	79	3592 (0,8)	857127 (1,2)	1014 (0,6)	366 (2,6)
L63P/L98Q/M99L/Y105L	80	2662 (0,6)	618249 (0,9)	868 (0,5)	944 (6,7)
Q41L/Y54F/M56K/M99L/I108F	81	2570 (0,5)	703731 (1,0)	940 (0,6)	408 (2,9)
S72G/L98Q/M99L/Y105L/I117T	82	1374 (0,3)	863538 (1,2)	968 (0,6)	221 (1,6)
M56R/L63P/L98Q/M99L/Y105L	83	2546 (0,5)	911035 (1,3)	839 (0,5)	1198 (8,5)
E33M/L63P/S72G/L98Q/Y105L	84	1532 (0,3)	518203 (0,7)	999 (0,6)	1220 (8,7)
L63P/L98Q/M99L/Y105L/L106I	85	2814 (0,6)	1007606 (1,4)	1004 (0,6)	773 (5,5)
A26T/M55R/L98Q/M99L/Y105L	86	2324 (0,5)	520232 (0,7)	986 (0,6)	468 (3,3)
L63P/S72G/M87A/L98Q/Y105L	87	2769 (0,6)	349875 (0,5)	875 (0,5)	202 (1,4)
A26D/S72G/L98Q/M99L/Y105L	88	5409 (1,1)	578704 (0,8)	1235 (0,7)	1097 (7,8)
V22A/L63P/L98Q/M99L/Y105L/P119H	89	2820 (0,6)	642849 (0,9)	992 (0,6)	1174 (8,4)
A26T/M55T/L63P/L98Q/M99L/Y105L	90	3203 (0,7)	850654 (1,2)	875 (0,5)	1096 (7,8)
E33V/A42S/M55T/L98Q/M99L/Y105L	91	2195 (0,5)	929792 (1,3)	1043 (0,6)	1478 (10,5)
G29W/N58S/L63P/Q82R/L98Q/Y105L	92	18277 (3,8)	950639 (1,3)	1463 (0,9)	0 (0,0)
E33M/L63P/S72G/L98Q/Y105L/I117L	93	2293 (0,5)	912480 (1,3)	907 (0,5)	586 (4,2)
A26T/I67N/S72G/L98Q/M99L/Y105L	94	1740 (0,4)	976150 (1,4)	948 (0,6)	1331 (9,5)
L12F/A26T/L63P/L98Q/Y105L/L106R	95	2186 (0,5)	984573 (1,4)	867 (0,5)	1286 (9,2)
S20N/A26T/L63P/L98Q/M99L/Y105L	96	3707 (0,8)	941466 (1,3)	1020 (0,6)	1879 (13,4)
G29W/T61I/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	97	3446 (0,7)	842791 (1,2)	1024 (0,6)	718 (5,1)
G29W/N58S/L63P/T69I/L98Q/M99L/Y105L	98	4558 (1,0)	841939 (1,2)	1945 (1,2)	1036 (7,4)
L12P/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L/L106N	99	2991 (0,6)	854863 (1,2)	894 (0,5)	0 (0,0)
L63P/T69A/L98Q/M99L/Y105L/L106R/V116A	100	3984 (0,8)	831276 (1,2)	1765 (1,1)	0 (0,0)
G29W/N58S/L63P/S72G/L98Q/Y105L	101	4262 (0,9)	860194 (1,2)	1445 (0,9)	0 (0,0)
G29W/L63P/D65G/S72G/L98Q/Y105L	102	3399 (0,7)	854339 (1,2)	954 (0,6)	0 (0,0)
T53S/M56V/L98Q/Y105L	103	3860 (0,8)	875378 (1,2)	1376 (0,8)	0 (0,0)
L63P/S72G/L98Q/Y105L	104	3451 (0,7)	892268 (1,3)	1486 (0,9)	0 (0,0)

Таблица E3. Связывающая и костимулирующая биоактивность вариантных CTLA-4-Fc полипептидов

Мутации	SEQ ID NO (ECD)	Связывание			MLR
		CD80 MFI (ΔWT)	CD86 MFI (ΔWT)	ICOSL MFI (ΔWT)	IFN-γ [пг/мл] (ΔWT)
I18A/L63P/S72G/L98Q/Y105L	105	3542 (0,7)	637802 (0,9)	1240 (0,7)	0 (0,0)
G29W/T53S/M56K/L63P/L98Q/Y105L	106	3347 (0,7)	794165 (1,1)	1914 (1,2)	179 (1,3)
I18V/G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L	107	4064 (0,9)	797318 (1,1)	1351 (0,8)	0 (0,0)
G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106I	108	4303 (0,9)	829524 (1,2)	1474 (0,9)	0 (0,0)
G29W/L63P/I67V/S72G/L98Q/Y105L	109	3993 (0,8)	769557 (1,1)	1053 (0,6)	0 (0,0)
G29W/M55V/E59G/L63P/L98Q/Y105L	110	4174 (0,9)	427427 (0,6)	1248 (0,7)	0 (0,0)
G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L/I117L	111	3794 (0,8)	502885 (0,7)	1853 (1,1)	0 (0,0)
L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106I/I117L	112	3811 (0,8)	789352 (1,1)	1885 (1,1)	37 (0,3)
L12F/R16H/G29W/M56T/L98Q/Y105L	113	6575 (1,4)	919746 (1,3)	2615 (1,6)	0 (0,0)
L12P/G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L	114	4012 (0,8)	783049 (1,1)	1001 (0,6)	155 (1,1)
L12P/G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106I	115	4347 (0,9)	662327 (0,9)	1219 (0,7)	195 (1,4)
G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106I/I117L	116	3242 (0,7)	702231 (1,0)	1205 (0,7)	133 (0,9)
A26T/T53S/L63P/L98Q/Y105L/L106I/I117L	118	4853 (1,0)	713974 (1,0)	2111 (1,3)	0 (0,0)
G29W/N58S/L63P/S72G/M87V/L98Q/Y105L	119	4044 (0,8)	818528 (1,2)	1572 (0,9)	0 (0,0)
G29W/S72G/Q76R/L98Q/Y105L/L106I/Q113H	120	2421 (0,5)	842313 (1,2)	2147 (1,3)	1129 (8,1)
G29W/N58S/L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106V	121	1233 (0,3)	931184 (1,3)	1045 (0,6)	844 (6,0)
A26T/L63P/L98Q/M99L/Y105L	122	3095 (0,6)	762915 (1,1)	1863 (1,1)	1059 (7,6)
G29W/N58D/I67V/L98Q/M99L/Y105L	123	2460 (0,5)	898877 (1,3)	4222 (2,5)	373 (2,7)
I67V/S72G/Q82H/T89A/L98Q/M99L/Y105L	124	1729 (0,4)	865295 (1,2)	5692 (3,4)	786 (5,6)
S72G/R85G/L98Q/M99L/Y105L/L106I	125	1439 (0,3)	905813 (1,3)	4653 (2,8)	915 (6,5)
L63P/L98Q/M99L/Y105L	80	2787 (0,6)	824331 (1,2)	1723 (1,0)	692 (4,9)
A26T/T47A/M56K/L63P/S72G/Q82R/L98Q/M99L/Y105L	126	2432 (0,5)	835548 (1,2)	2767 (1,7)	404 (2,9)
A26T/M55T/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	127	3226 (0,7)	1085961 (1,5)	2090 (1,3)	1413 (10,1)
L12H/I18V/A42T/M55T/N58D/L98R/Y105L/L106I/P121S	128	1764 (0,4)	896733 (1,3)	733 (0,4)	170 (1,2)
I18T/A26T/L63P/S72G/L98Q/Y105L	129	3265 (0,7)	769820 (1,1)	802 (0,5)	145 (1,0)
L12F/K30R/S72G/Q82R/L98Q/M99L/Y105L	130	1208 (0,3)	766257 (1,1)	1747 (1,0)	718 (5,1)
L12P/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L/L106N/I117L	131	987 (0,2)	782940 (1,1)	998 (0,6)	623 (4,4)

Таблица E3. Связывающая и костимулирующая биоактивность вариантных CTLA-4-Fc полипептидов					
Мутации	SEQ ID NO (ECD)	Связывание			MLR
		CD80 MFI (ΔWT)	CD86 MFI (ΔWT)	ICOSL MFI (ΔWT)	IFN-γ [пг/мл] (ΔWT)
G29W/M87K/I93V/L98Q/M99L/Y105L	132	2019 (0,4)	767081 (1,1)	7975 (4,8)	786 (5,6)
P28L/E33V/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	133	1163 (0,2)	798068 (1,1)	1849 (1,1)	1161 (8,3)
G29W/T53S/M56K/L63P/Q82H/L98Q/M99I/Y105L	134	4087 (0,9)	425068 (0,6)	5654 (3,4)	956 (6,8)
I18F/L63P/L98Q/M99L/Y105L/P121S	135	2392 (0,5)	486401 (0,7)	1765 (1,1)	737 (5,3)
L63P/L98Q/M99L/Y105L/I108V	136	3455 (0,7)	730161 (1,0)	2074 (1,2)	592 (4,2)
A26T/A42V/Q45H/I67N/M87K/E97Q/M99L	137	10573 (2,2)	610530 (0,9)	24030 (14,4)	1282 (9,1)
E33M/L63P/S72G/L98Q/Y105L	84	1984 (0,4)	933740 (1,3)	2401 (1,4)	1849 (13,2)
M56V/E59G/L63P/S72G/M87K/I93V/L98Q/M99L/Y105L/I117E	138	1940 (0,4)	758136 (1,1)	1552 (0,9)	332 (2,4)
G29W/M87K/T89S/L98Q/M99L/Y105L/I108V/I117L	139	3525 (0,7)	913043 (1,3)	9533 (5,7)	232 (1,7)
L12P/M56V/L63P/V96I/L98Q/M99L/Y105L/Y115H	140	1647 (0,3)	891092 (1,3)	1059 (0,6)	907 (6,5)
G29W/T53S/M56K/T61N/L63P/L98Q/Y105L	141	3375 (0,7)	919607 (1,3)	1454 (0,9)	0 (0,0)
I18T/A26S/M55T/M56V/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L/I117K	142	2455 (0,5)	782684 (1,1)	1686 (1,0)	530 (3,8)
I18T/T61R/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	143	3315 (0,7)	926617 (1,3)	2390 (1,4)	296 (2,1)
L12P/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	144	1784 (0,4)	1045369 (1,5)	1510 (0,9)	968 (6,9)
E33M/L63P/S72G/L98Q/Y105L/I108F	145	1481 (0,3)	820016 (1,2)	2109 (1,3)	766 (5,5)
L12P/R16H/A26T/T61S/L63P/M87V/L98Q/M99L/Y105L/L106I/I117L	146	1926 (0,4)	895016 (1,3)	1046 (0,6)	593 (4,2)
G29W/T53S/M56K/N58S/L63P/M87V/L98Q/Y105L/P121S	147	7819 (1,6)	778254 (1,1)	2249 (1,4)	0 (0,0)
G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L/P121S	148	3395 (0,7)	763120 (1,1)	1559 (0,9)	0 (0,0)
G29W/T53S/M56K/N58S/L63P/M87V/L98Q/Y105L	149	8116 (1,7)	257214 (0,4)	2517 (1,5)	0 (0,0)
G29W/T53S/M56K/N58S/L63P/M87V/L98Q/Y105L/I108V	150	7775 (1,6)	271930 (0,4)	3703 (2,2)	45 (0,3)
G29W/T53S/L63P/S72G/L98Q/Y105L	151	4497 (0,9)	174601 (0,2)	1545 (0,9)	0 (0,0)
V10A/G29W/T53S/M56K/L63P/L98Q/Y105L/P121S	152	6058 (1,3)	766570 (1,1)	1612 (1,0)	0 (0,0)
WT CTLA-4	1	4775 (1,0)	708753 (1,0)	1664 (1,0)	140 (1,0)

Пример 2. Генерация и анализ консенсусных вариантов CTLA-4

Дополнительные варианты ECD CTLA-4 были сконструированы путем идентификации консенсусных остатков, идентифицированных в скрининге, описанном в Примере 1, которые обычно ассоциировались с вариантами, проявлявшими улучшенное

связывание CD80, CD86 и/или ICOSL и/или демонстрировавшими подавление секреции интерферона-гамма в анализе MLR. Выбранные консенсусные мутации включали I18T, A26T, E33V, T53S, M55T, M56K, N58S, L63P, M87V, L98Q, M99L и Y105L. Консенсусные мутанты были использованы для генерации варианта ECD CTLA-4 путем сайт-направленного мутагенеза со ссылкой на последовательность дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, которая затем была отформатирована как Fc-гибридный белок, как описано в Примере 1. Варианты гибридов CTLA-4 ECD-Fc были протестированы на связывание и биологическую активность, как описано ниже.

A. Связывание и биологическая активность

1. Связывание с клетками, экспрессирующими контр-структуры

Для получения клеток, экспрессирующих когнатные партнеры по связыванию, полноразмерные конструкции поверхностной экспрессии млекопитающих для каждого из человеческих CD80, CD86 и ICOSL были сконструированы в векторе экспрессии pcDNA3.1 (Life Technologies) и получены из Genscript, США. Исследования связывания проводили с использованием описанной выше системы временной трансфекции Expi293F (Life Technologies, США). Было определено количество клеток, необходимое для эксперимента, и была проведена соответствующая трансфекция в объеме 30 мл с использованием предложенного производителем протокола. Для каждой контр-структуры или имитационной трансфекции объемом 30 мл 75 миллионов клеток Expi293F инкубировали с 30 мкг ДНК экспрессирующей конструкции и 1,5 мл разбавленного реагента ExpiFectamine™ 293 в течение 48 часов, после чего клетки собирали для окрашивания.

В некоторых случаях использовали клетки со стабильной экспрессией когнатных партнеров по связыванию. Клетки яичников китайского хомяка (CHO) были стабильно трансдуцированы лентивирусом для поверхностной экспрессии полноразмерных человеческих CD80, CD86 или ICOSL.

Для проточного цитометрического анализа 200 000 клеток данной временной трансфекции, стабильной клеточной линии или соответствующего отрицательного контроля были помещены в 96-луночные круглодонные планшеты. Клетки осаждали и суспендировали в буфере для окрашивания (PBS (физиологический раствор с фосфатным буфером), 1% BSA (бычий сывороточный альбумин) и 0,1% азид натрия) в течение 20 минут для блокирования неспецифического связывания. Затем клетки снова центрифугировали и суспендировали в буфере для окрашивания, содержащем от 100 нМ до 100 мкм CTLA-4 вариантного Fc-гибридного или контроля в 50 мкл. Первичное окрашивание проводили в течение 45 минут, перед тем как дважды промыть клетки в

буфере для окрашивания. Связанный CTLA-4 выявляли с помощью PE-конъюгированных антител к IgG человека (Jackson ImmunoResearch, США), разведенных 1:150 в 50 мкл буфера для окрашивания и инкубированных в течение 30 минут. Альтернативно, связанный CTLA-4 выявляли с помощью антитела против CTLA-4 (Biolegend, США), разведенного 1:130 в 50 мкл буфера для окрашивания в течение 30 минут, перед тем как дважды промыть клетки в буфере для окрашивания. Затем антитело против CTLA-4 определяли с помощью PE-конъюгированного антитела к IgG мыши (Jackson ImmunoResearch, США), разведенного 1:150 в 50 мкл буфера для окрашивания, и инкубировали в течение 30 минут.

После окончательной инкубации клетки дважды промывали для удаления несвязанных конъюгированных антител, фиксировали в 2% формальдегиде/PBS и анализировали на проточном цитометре Hypercyt (Intellicyte, США) или LSRII (Becton Dickinson, США).

Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) рассчитывали для каждого образца с помощью программного обеспечения Cell Quest Pro (Becton Dickinson, США), программного обеспечения FlowJo (FlowJo, США) или программного обеспечения Forcyte (Intellicyt, США).

a. Биоанализ блокады CD86

Выбранные CTLA-4 вариантные Fc-гибридные белки анализировали на способность блокировать костимуляцию, опосредованную CD86-CD28, как определено с помощью биоанализа блокады CD86. Искусственные антигенпрезентирующие клетки (APC) были получены путем трансдукции клеток K562 лентивирусом для экспрессии на клеточной поверхности одноцепочечного Fv против CD3 человека (OKT3) и человеческого CD86, что дало K562/OKT3/CD86. Эффекторные клетки были получены путем трансдукции клеток Jurkat, экспрессирующих репортер IL-2-люциферазы (Promega), лентивирусом для экспрессии химерного рецептора, состоящего из внеклеточного домена ICOS человека и внутриклеточного домена CD28 человека, с получением Jurkat/IL-2/ICOS-CD28. APC высевали в 33 мкл/лунку буфера для анализа (RPMI1640 с 5% ЭТС) в количестве 2×10^4 клеток/лунку с CTLA-4-Fc или контрольными белками в 33 мкл/лунку при 300 нМ. APC и белки инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре перед добавлением эффекторных клеток в количестве 2×10^5 клеток на лунку при 33 мкл на лунку. Пластины переносили в инкубационную камеру при температуре 37°C, в среде увлажненного 5% CO_2 в течение 5 часов, затем вынимали и давали акклиматизироваться до комнатной температуры в течение 15 минут. В каждый планшет добавляли 100 мкл/лунку раствора для лизиса клеток и субстрата люциферазы

(реагент для люциферазы BioGlo™, Promega) и инкубировали на орбитальном шейкере в течение 10 минут. Относительные значения люминесценции (RLU) определяли для каждого тестируемого образца путем измерения люминесценции со временем интегрирования 1 секунда на лунку с использованием ридера Cytation 3 (BioTek instruments). Процент ингибирования, опосредованного блокадой CD86, определяли по следующей формуле: [(Среднее контрольное значение RLU – Экспериментальное значение RLU)/(Среднее контрольное значение RLU)]×100.

B. Результаты

Результаты обобщены ниже в Таблице E4. Значения для связывания CD80, CD86 и ICOSL (MFI) и процент ингибирования костимуляции CD28 приведены в дополнение к относительному показателю по сравнению с соответствующим связыванием и блокадой CD86 немодифицированного полипептида CTLA-4 (ΔWT) для каждого эксперимента. Как указано, определенные мутации и комбинации мутаций были ассоциированы со значительным увеличением связывания ECD CTLA-4 с ICOSL, независимо от изменения связывания либо с CD80, либо с CD86. В некоторых случаях также наблюдалось увеличение связывания с одним или обоими из CD80 или CD86.

Таблица E4. Связывание и биоактивность консенсусных вариантных CTLA-4-Fc полипептидов

Мутации	SEQ ID NO (ECD)	Связывание			Биоанализ блокады CD86 (ΔWT)
		CD80 MFI (ΔWT)	CD86 MFI (ΔWT)	ICOSL MFI (ΔWT)	
T53S, M56K, N58S, L63P, M87V, L98Q, Y105L	162	631192 (1,2)	497901 (0,9)	215054 (50,9)	88,2 (1,3)
I18T, A26T, M55T, M56K, L63P, L98Q, M99L, Y105L	163	759480 (1,4)	657099 (1,1)	89672 (21,2)	40,2 (0,6)
I18T, A26T, M56K, L63P, L98Q, Y105L	164	496119 (0,9)	601631 (1,0)	295395 (69,9)	86,1 (1,2)
T53S, L63P, L98Q	165	564111 (1,1)	571155 (1,0)	11541 (2,7)	86,2 (1,2)
T53S, L63P, Y105L	166	526605 (1,0)	568901 (1,0)	20739 (4,9)	86,4 (1,2)
T53S, M56K, N58S, L63P, M87V, Y105L	168	610377 (1,2)	604604 (1,0)	48034 (11,4)	86,7 (1,3)
L98Q, M99L, Y105L	59	875290 (1,7)	686788 (1,2)	116699 (27,6)	33,9 (0,5)
E33V, L98Q, Y105L	174	811261 (1,5)	580048 (1,0)	101877 (24,1)	32,5 (0,5)
E33V, M99L	177	758165 (1,4)	618183 (1,1)	71903 (17,0)	85,2 (1,2)
T53S, M56K, N58S, L63P, M87V,	167	347188	555921	7241	82,6 (1,2)

Таблица E4. Связывание и биоактивность консенсусных вариантных CTLA-4-Fc полипептидов					
Мутации	SEQ ID NO (ECD)	Связывание			Биоанализ блокады CD86 (ΔWT)
		CD80 MFI (ΔWT)	CD86 MFI (ΔWT)	ICOSL MFI (ΔWT)	
L98Q		(0,7)	(1,0)	(1,7)	
T53S, M56K, N58S, L63P, L98Q, Y105L	169	795550 (1,5)	557059 (1,0)	248668 (58,8)	87,4 (1,3)
T53S, M56K, N58S, M87V, L98Q, Y105L	170	113358 7 (2,1)	676071 (1,2)	35087 (8,3)	88,7 (1,3)
T53S, M56K, L63P, M87V, L98Q, Y105L	171	736640 (1,4)	546545 (0,9)	234716 (55,5)	90,1 (1,3)
T53S, N58S, L63P, M87V, L98Q, Y105L	172	637509 (1,2)	508878 (0,9)	108784 (25,7)	86,8 (1,3)
M56K, N58S, L63P, M87V, L98Q, Y105L	173	688049 (1,3)	574298 (1,0)	258574 (61,2)	85,9 (1,2)
E33V, L98Q, M99L,	176	975697 (1,8)	628740 (1,1)	137713 (32,6)	14,1 (0,2)
Дикий тип	1	529140 (1,0)	579615 (1,0)	4228 (1,0)	69,1 (1,0)

Пример 3. Генерация и анализ выбранных вариантов CTLA-4

Была разработана дополнительная панель вариантов ECD CTLA-4 с мутациями из варианта CTLA-4, идентифицированными при скрининге, описанном в Примере 1, в частности, вариант, указанный в SEQ ID NO:113, содержащий мутации L12F/R16H/G29W/M56T/L98Q/Y105L, который был ассоциирован с усиленным связыванием с CD80, CD86 и ICOSL, и супрессией интерферона-гамма. В некоторых случаях включали S72G, потому что она была идентифицирована как горячая точка, которая отмечена более чем в 35% других 50 наилучших вариантов, которые были идентифицированы как обладающие супрессорной активностью. Для некоторых генерированных вариантов стратегия включала удаление некоторых мутаций (реверсивных мутаций), например, для уменьшения количества мутаций в варианте. Вариантные ECD CTLA-4 были получены путем сайт-направленного мутагенеза со ссылкой на последовательность дикого типа, указанную в SEQ ID NO:1, которая затем была отформатирована как Fc-гибридный белок, как описано в Примере 1. Вариантные гибриды CTLA-4 ECD-Fc были протестированы на связывание и биологическую активность, как описано в Примере 2.

В Таблице E5 приведены значения для связывания CD80, CD86 и ICOSL (MFI) и процента ингибирования костимуляции CD28 в дополнение к относительному показателю

по сравнению с соответствующим связыванием и блокадой CD86 немодифицированного полипептида CTLA-4 (ΔWT) для каждого эксперимента.

Таблица E5. Связывание и биоактивность реверсионных вариантных CTLA-4-Fc полипептидов

Мутации	SEQ ID NO (ECD)	Связывание			MLR
		CD80 MFI (ΔWT)	CD86 MFI (ΔWT)	ICOSL MFI (ΔWT)	Биоанализ блокады CD86 (ΔWT)
L12F, R16H, G29W, M56T, L98Q	178	76155 (1,5)	86548 (1,2)	959 (0,8)	72,3 (0,9)
L12F, R16H, G29W, M56T, Y105L	179	73996 (1,4)	72293 (1,0)	1944 (1,7)	77,8 (1,0)
L12F, R16H, G29W, L98Q, Y105L	180	60527 (1,2)	78181 (1,1)	862 (0,7)	89,0 (1,1)
L12F, R16H, M56T, L98Q, Y105L	181	70120 (1,4)	70437 (1,0)	1265 (1,1)	86,8 (1,1)
G29W, M56T, L98Q, Y105L	182	70579 (1,4)	65251 (0,9)	612 (0,5)	88,6 (1,1)
L12F, G29W, L98Q, Y105L	183	66677 (1,3)	85018 (1,2)	807 (0,7)	90,0 (1,1)
L12F, L98Q, Y105L	184	67142 (1,3)	85125 (1,2)	2584 (2,2)	86,9 (1,1)
R16H, L98Q, Y105L	185	67259 (1,3)	70269 (1,0)	1018 (0,9)	89,8 (1,1)
G29W, L98Q, Y105L	186	90170 (1,8)	64097 (0,9)	570 (0,5)	90,0 (1,1)
M56T, L98Q, Y105L	187	68644 (1,3)	70222 (1,0)	700 (0,6)	88,0 (1,1)
L12F, R16H, G29W, M56T, S72G, L98Q, Y105L	188	46175 (0,9)	58464 (0,8)	613 (0,5)	88,3 (1,1)
G29W, M56T, S72G, L98Q, Y105L	189	55706 (1,1)	67962 (0,9)	534 (0,5)	88,6 (1,1)
Дикий тип	1	51269 (1,0)	73502 (1,0)	1160 (1,0)	80,5 (1,0)

Пример 4. Идентификация модифицированного по аффинности полипептида внеклеточного домена TACI в качестве молекулы, ингибирующей B-клетки (BIM)

В этих примерах описываются примерные молекулы, ингибирующие B-клетки (BIM), из полипептида TACI, которые используются как часть предлагаемого мультидоменного иммуномодулирующего белка с молекулой, ингибирующей T-клетки (TIM), включая способы разработки и идентификации модифицированных по аффинности (вариантных) полипептидов TACI, которые связываются (например, в большей степени по сравнению с диким типом) с лигандами рецептора, стимулирующего B-клетки.

Этот пример описывает генерацию мутантных ДНК конструкций доменов TNFR TACI человека (TD) для трансляции и экспрессии на поверхности дрожжей в качестве

библиотек дрожжевого дисплея, введение библиотек ДНК в дрожжи и отбор дрожжевых клеток, экспрессирующих модифицированные по аффинности варианты внеклеточного домена (ECD) TACI, содержащие по меньшей мере один TD (vTD TACI).

А. Генерация мутантных ДНК конструкций доменов TNFR TACI

Библиотеки, содержащие случайные замены аминокислот, были сконструированы для идентификации вариантов внеклеточного домена (ECD) TACI. Конструкции были созданы на основе последовательности TACI человека дикого типа, содержащей ECD-часть TACI, которая включала либо (1) оба богатых цистеином белковых домена (CRD, CRD1/CRD2), как указано в SEQ ID NO:516 (соответствующие остаткам 29-110, как указано в UniProt, номер доступа O14836), либо (2) только один CRD (CRD2), как указано в SEQ ID NO:528 (соответствует остаткам 68-110, как указано в UniProt, номер доступа O14836).

ECD TACI (29-110) (SEQ ID NO:516): VAMRSCPEEQYWDPLLGTCMSCKTICNHQSQRTCAAFCRSLSCRKEQGKFYDHLLRDCI SCASICGQHPKQCAYFCENKLRS

ECD TACI (68-110) (SEQ ID NO:528): SLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRS

ДНК, кодирующую домен ECD TACI дикого типа, клонировали между сайтами BamHI и KpnI модифицированного вектора экспрессии дрожжей PBYDS03 (Life Technologies, США), который поместил N-конец ECD TACI на поверхность дрожжей, закрепляя домен Sag1 (С-концевой домен α-агглютинина дрожжей) с N-концом метки гибридизации HA в рамке к последовательности ECD TACI, а С-конец метки гибридизации c-Myc к последовательности ECD TACI. Экспрессия в этом векторе контролируется с помощью индуцируемого промотора GAL1. После проверки правильной последовательности ДНК конструкцию ДНК ECD TACI дикого типа использовали в качестве шаблона подверженной ошибкам ПЦР для введения случайных мутаций в последовательности ECD TACI с частотой 2-5 мутаций на копию гена. Набор Genemorph II (Agilent, США) использовали в сочетании с титрованием количествами $MnCl_2$ от 0,0 до 0,6 мм для достижения необходимой частоты ошибок. После проведения подверженной ошибкам ПЦР подвергнутую мутагенезу ДНК очищали с помощью геля NucleoSpin® и набора для очистки ПЦР (Macherey-Nagel, Германия). Затем этот выделенный фрагмент ДНК подвергали ПЦР-амплификации с помощью OneTaq 2x PCR master mix (New England Biolabs, США) с использованием праймеров, содержащих области перекрытия 48 п.н., гомологичные pBYDS03, для подготовки к крупномасштабной электропорации дрожжей. Вставку ДНК ECD TACI очищали в геле и ресуспендировали в стерильной

деионизированной воде при номинальной концентрации 500 нг/мкл.

Для подготовки вектора к трансформации pBYDS03 расщепляли ферментами рестрикции BamHI-HF и KpnI-HF (New England Biolabs, США), и большой фрагмент вектора (ожидаемый размер: 7671 п.н.) очищали на геле и растворяли в стерильной деионизированной воде при номинальной концентрации 500 нг/мкл. Для подготовки к трансформации дрожжей 12 мкг вставки библиотечной ДНК смешивали с 4 мкг линеаризованного вектора для каждой электропорации.

Для введения случайных библиотек ДНК в дрожжи, штамм Saccharomyces cerevisiae BJ5464 (ATCC.org; номер ATCC 208288) был подготовлен непосредственно перед электропорацией, как подробно описано в Benatuil, L. et.al., Protein Eng Des Sel. 2010 Apr; 23(4): 155-159. Вкратце, культуру BJ5464 в стационарной фазе в течение ночи пассировали до $ОП_{600}$ 0,3 в 100 мл среды YPD (10 г/л азотистой основы дрожжей, 20 г/л пептона и 20 г/л D-(+)-глюкозы) и помещали в платформенный шейкер при 30°C и 300 об/мин до тех пор, пока инокулированные культуры не достигали $ОП_{600}$ 1,6. Через ~5 часов клетки собирали центрифугированием и выдерживали на льду до конца протокола, если не указано иное. После сбора клетки дважды промывали 50 мл ледяной воды и один раз электропорационным буфером (1 M сорбита, 1 мм $CaCl_2$). Собранные клетки кондиционировали путем повторного суспендирования в 20 мл 0,1 M LiAc/10 мм DTT и встряхивания при 225 об/мин в культуральной колбе в течение 30 минут при 30°C. Кондиционированные клетки немедленно центрифугировали, дважды промывали буфером для электропорации и повторно суспендировали с ~100-200 мкл буфера для электропорации, чтобы довести объем до 1 мл. Этой кондиционированной клеточной суспензии было достаточно для двух реакций электропорации в кюветах объемом 400 мкл.

Для каждой электропорации 12 мкг вставки библиотечной ДНК и 4 мкг линеаризованного вектора pBYDS03 (описанного выше) смешивали с 400 мкл электрокомпетентного BJ5464 и переносили в предварительно охлажденную кювету BioRad GenePulser с зазором между электродами 2 мм. Смеси выдерживали на льду в течение 5 минут перед электропорацией с использованием системы электропорации с экспоненциальной волной затухания BTX ECM399 при 2500V. Сразу после электропорации клетки добавляли к 8 мл смеси 1:1 1 M сорбита: 1X YPD и оставляли при комнатной температуре без встряхивания в течение 10 мин, затем помещали в платформенный шейкер на 1 час при 225 об/мин и 30°C. Клетки собирали центрифугированием и ресуспендировали в 250 мл среды SCD-Leu для размещения селективного маркера LEU2, переносимого модифицированной плазмидой pBYDS03.

Один литр среды SCD-Leu был получен с использованием 14,7 г цитрата натрия, 4,29 г лимонной кислоты моногидрата, 20 г декстрозы, 6,7 г дрожжевой азотной основы и 1,6 г дрожжевой синтетической добавки для отсева без лейцина. Среда была подвергнута стерилизующей фильтрации перед использованием с применением вакуумного фильтрующего устройства с размером пор 0,22 мкм. Размер библиотеки оценивали путем определения серийных разведений свежевыделенных клеток на чашке с агаром SCD-Leu в диапазоне разведений от 10^{-5} до 10^{-10} и экстраполяции путем подсчета колоний через три дня. Оставшуюся часть электропорированной культуры выращивали до насыщения, и клетки из этой культуры подвергали субкультивированию 1/100 в той же среде и выращивали до насыщения, чтобы свести к минимуму долю нетрансформированных клеток и обеспечить выделение плазмиды из клеток, которые могут содержать два или более вариантов библиотеки. Чтобы сохранить разнообразие библиотеки, этот этап субкультуры проводили с использованием инокулята, который содержал по меньшей мере в 10 раз больше клеток, чем рассчитанный размер библиотеки. Клетки из второй насыщенной культуры ресуспендировали в свежей среде, содержащей стерильный 25% (масса/объем) глицерин до плотности 1×10^{10}/мл, замораживали и хранили при -80°C (замороженный библиотечный фонд).

Количество клеток, по меньшей мере в 10 раз превышающее расчетный размер библиотеки, размораживали из отдельных библиотечных запасов, суспендировали до $0,5\times10^{7}$ клеток/мл в неиндуцирующей SCD-Leu среде и выращивали в течение ночи. На следующий день количество клеток, в 10 раз превышающее размер библиотеки, центрифугировали при 2000 об/мин в течение двух минут и ресуспендировали до $0,5\times10^{7}$ клеток/мл в индуцирующей среде SCDG-Leu. Один литр среды для индукции SCDG-Leu был получен с использованием 5,4 г Na_2HPO_4, 8,56 г $NaH_2PO4\bullet H_2O$, 20 г галактозы, 2,0 г декстрозы, 6,7 г дрожжевой азотной основы и 1,6 г дрожжевой синтетической добавки для отсева без лейцина, растворенной в воде и стерилизованной через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм. Культуру выращивали в индукционной среде в течение ночи при 30°C, чтобы индуцировать экспрессию библиотечных белков на поверхности дрожжевых клеток.

После индукции в течение ночи библиотек ECD TACI количество клеток, эквивалентное 10-кратному оцененному разнообразию библиотек, было отсортировано методом магнитной сепарации с использованием магнитных гранул Dynabeads™ His-Tag, предварительно загруженных BAFF-9xHis, для обогащения вариантов ECD TACI способностью связывать их экзогенные рекомбинантные белки с контр-структурой. Результаты магнитной сепарации использовали в последующей схеме отбора FACS,

включающей четыре раунда положительных отборов, чередующихся между BAFF-9xHis и APRIL-FLAG, с одновременным 10-кратным снижением концентрации контр-структуры в каждом раунде (например, FACS1: 50 нМ APRIL-FLAG; FACS4: 0,05 нМ BAFF-9xHis). Объем инкубации регулировали таким образом, чтобы поддерживать по меньшей мере 10-кратное стехиометрическое превышение контр-структуры над общим количеством молекул варианта ECD TACI от дрожжевого дисплея (при условии 100 000 копий белка на клетку), чтобы избежать артефактов истощения лигандов, которые могут уменьшить распознавание библиотеки. Связывание BAFF-9xHis и APRIL-FLAG с вариантами ECD TACI выявляли с помощью PE-конъюгированного антитела против 6xHis-метки (BioLegend, США) и PE-конъюгированного антитела против FLAG-метки, соответственно. Варианты из выходов FACS3 и FACS4 были выделены для секвенирования ДНК и последующего клонирования для экспрессии рекомбинантного Fc-гибрида.

Второй цикл случайного мутагенеза был проведен на выходах дрожжевых клеток из описанных выше выборок FACS4 BAFF-9xHis. Протокол положительного отбора с чередованием контр-структур для каждого вида был таким же, как и в первом цикле, за исключением того, что порядок контр-структур был изменен (например, FACS1: 50 нМ BAFF-9xHis; FACS4: 0,05 нМ APRIL-FLAG). Дополнительные варианты были выбраны из выходов дрожжевых клеток FACS3 и FACS4.

Вставки варианта ECD TACI из выходов FACS3 и FACS4 как из цикла 1, так и из цикла 2, как описано выше, были субклонированы в вектор Fc-гибрида для анализа последовательности отдельных клонов.

Выходные пулы клеток из выбранных FACS сортов ECD TACI выращивали до конечной плотности в селекционной среде SCD-Leu и выделяли плазмидную ДНК с использованием набора для выделения дрожжевой плазмидной ДНК (Zymoresearch, США). Для генерации Fc-гибридов варианты ECD TACI с созревшей аффинностью подвергали ПЦР-амплификации с использованием праймеров, содержащих гомологичные области по 40 п.н. на обоих концах, с кодированием вектора Fc-гибрида, расщепленного AfeI и BamHI, и в рамке с Fc-областью для проведения рекомбинации in vitro с использованием Gibson Assembly Master Mix (New England Biolabs, США). Реакция сборки Гибсона была добавлена к штамму E. coli NEB5alpha (New England Biolabs, США) для трансформации при тепловом шоке в соответствии с инструкциями производителя.

Разведения реакций трансформации наносили на LB-агар, содержащий 100 мкг/мл карбенициллина (Teknova, США), чтобы выделить отдельные колонии для отбора. Как правило, до 96 колоний от каждой трансформации затем выращивали в 96-луночных

планшетах до насыщения в течение ночи при 37°C в LB-бульоне, содержащем 100 мкг/мл карбенициллина (Teknova, кат.№ L8112), и небольшую аликвоту из каждой лунки отправляли на секвенирование ДНК для идентификации мутации (мутаций) во всех клонах.

После анализа последовательностей и идентификации представляющих интерес клонов плазмидную ДНК готовили с использованием набора MidiPlus (Qiagen).

Рекомбинантный вариант Fc-гибридных белков был получен из адаптированных к суспензии клеток эмбриональной почки человека (HEK) 293 с использованием экспрессионной системы Expi293 (Invitrogen, США). Собирали надосадочную жидкость и улавливали Fc-белок на Mab SelectSure (GE Healthcare кат. № 17543801). Белок элюировали из колонки с использованием 50 мм ацетата pH 3,6. Элюат MabSelect Sure объединяли и доводили pH до значения выше pH 5,0. Затем этот материал окончательно очищали на колонке препаративной SEC для получения высокоочищенного мономерного материала. В этом материале был заменен буфер на 10 мм ацетат, 9% сахарозу pH 5,0. Чистоту белка оценивали путем аналитической эксклюзионной хроматографии. Материал разливали по флаконам и хранили при температуре -80°C.

Аминокислотные замены в выбранных vTD TACI, которые были идентифицированы и получены в результате отбора, приведены в Таблице 2. Выбранные vTD были протестированы на связывание и функциональную активность, как описано в Примере 6.

Пример 5. Идентификация модифицированного по аффинности полипептида внеклеточного домена BCMA и иммуномодулирующих белков

В этих примерах описываются примерные BCMA полипептидные молекулы, ингибирующие B-клетки (BIM), которые используются как часть предлагаемого мультидоменного иммуномодулирующего белка с молекулой, ингибирующей T-клетки (TIM), включая способы конструирования и идентификации модифицированных по аффинности (вариантных) полипептидов BCMA, которые связываются (например, на более высоком уровне, по сравнению с дикого типа) с лигандами рецептора, стимулирующего B-клетки. Вариантные внеклеточные полипептиды BCMA также были отформатированы как иммуномодулирующий белок в виде BCMA Fc-гибридного белка без молекулы, ингибирующей T-клетки.

Этот пример описывает генерацию мутантных ДНК конструкций доменов TNFR (TD) BCMA человека для трансляции и экспрессии на поверхности дрожжей в качестве библиотек дрожжевого дисплея, введение библиотек ДНК в дрожжи и отбор дрожжевых клеток, экспрессирующих модифицированные по аффинности варианты внеклеточного

домена (ECD) BCMA. содержащие по меньшей мере один TD (vTD BCMA). Выбранные vTD BCMA затем форматировали как Fc-гибридные белки

А. Генерация мутантных ДНК-конструкций доменов BCMA

Библиотеки, содержащие случайные замены аминокислот, были сконструированы для идентификации вариантов внеклеточного домена (ECD) BCMA. Конструкции были созданы на основе последовательности BCMA человека дикого типа, содержащей ECD-часть BCMA, которая включала богатый цистеином белковый домен (CRD), как указано в SEQ ID NO:356 (соответствует остаткам 2-54, как указано в UniProt, номер доступа Q02223, обозначенном «ECD BCMA (2-54)» далее:

ECD BCMA (2-54) (SEQ ID NO:356):

LQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNA

ДНК, кодирующую домен ECD BCMA дикого типа, клонировали между сайтами BamHI и KpnI модифицированного вектора экспрессии дрожжей PBYDS03 (Life Technologies, США), который поместил N-конец ECD BCMA на дрожжевой поверхностный якорный домен Sag1 (С-концевой домен α-агглютинина дрожжей) с N-концом метки гибридизации HA в рамке к последовательности ECD BCMA, и С-конец метки гибридизации c-Myc к последовательности ECD BCMA. Экспрессию в этом векторе контролировали с помощью индуцибельного промотора GAL1. После проверки правильной последовательности ДНК конструкцию ДНК ECD BCMA дикого типа использовали в качестве шаблона для проведения подверженной ошибкам ПЦР для введения случайных мутаций в последовательности ECD BCMA с частотой 2-5 мутаций на копию гена. Набор Genemorph II (Agilent, США) использовали в сочетании с титрованием количествами $MnCl_2$ от 0,0 до 0,6 мм для достижения необходимой частоты ошибок. После подверженной ошибкам ПЦР мутагенизированную ДНК очищали с помощью геля NucleoSpin® и набора для очистки ПЦР (Macherey-Nagel, Германия). Затем этот выделенный фрагмент ДНК подвергали ПЦР-амплификации с помощью OneTaq 2x PCR master mix (New England Biolabs, США) с использованием праймеров, содержащих области перекрытия 48 п.н., гомологичные pBYDS03, для подготовки к крупномасштабной электропорации дрожжей. Вставку ДНК ECD BCMA очищали в геле и ресуспендировали в стерильной деионизированной воде при номинальной концентрации 500 нг/мкл.

Для подготовки вектора к трансформации pBYDS03 расщепляли ферментами рестрикции BamHI-HF и KpnI-HF (New England Biolabs, США), а большой фрагмент вектора (ожидаемый размер 7671 п.н.) очищали на геле и растворяли в стерильной деионизированной воде при номинальной концентрации 500 нг/мкл. Для подготовки к

трансформации дрожжей 12 мкг вставки библиотечной ДНК смешивали с 4 мкг линеаризованного вектора для каждой электропорации.

Для введения случайных библиотек ДНК в дрожжи, штамм Saccharomyces cerevisiae BJ5464 (ATCC.org; номер ATCC 208288) был подготовлен непосредственно перед электропорацией, как подробно описано в Benatuil, L. et.al., Protein Eng Des Sel. 2010 Apr; 23(4): 155-159. Вкратце, культуру BJ5464 в стационарной фазе в течение ночи пассировали до $ОП_{600}$ 0,3 в 100 мл среды YPD (10 г/л азотистой основы дрожжей, 20 г/л пептона и 20 г/л D-(+)-глюкозы) и помещали в платформенный шейкер при 30°C и 300 об/мин до тех пор, пока инокулированные культуры не достигали $ОП_{600}$ 1.6. Через ~5 часов клетки собирали центрифугированием и выдерживали на льду до конца протокола, если не указано иное. После сбора клетки дважды промывали 50 мл ледяной воды и один раз электропорационным буфером (1 M сорбита, 1 мм $CaCl_2$). Собранные клетки кондиционировали путем повторного суспендирования в 20 мл 0,1 M LiAc/10 мм DTT и встряхивания при 225 об/мин в культуральной колбе в течение 30 минут при 30°C. Кондиционированные клетки немедленно центрифугировали, дважды промывали буфером для электропорации и повторно суспендировали с ~100-200 мкл буфера для электропорации, чтобы довести объем до 1 мл. Этой кондиционированной клеточной суспензии было достаточно для двух реакций электропорации в кюветах объемом 400 мкл.

Для каждой электропорации 12 мкг вставки библиотечной ДНК и 4 мкг линеаризованного вектора pBYDS03 (описанного выше) смешивали с 400 мкл электрокомпетентного BJ5464 и переносили в предварительно охлажденную кювету BioRad GenePulser с зазором между электродами 2 мм. Смеси выдерживали на льду в течение 5 минут перед электропорацией с использованием системы электропорации с экспоненциальной волной затухания BTX ECM399 при 2500V. Сразу после электропорации клетки добавляли к 8 мл смеси 1:1 1 M сорбита: 1X YPD и оставляли при комнатной температуре без встряхивания в течение 10 мин, затем помещали в платформенный шейкер на 1 час при 225 об/мин и 30°C. Клетки собирали центрифугированием и ресуспендировали в 250 мл среды SCD-Leu для размещения селективного маркера LEU2, переносимого модифицированной плазмидой pBYDS03. Один литр среды SCD-Leu был получен с использованием 14,7 г цитрата натрия, 4,29 г лимонной кислоты моногидрата, 20 г декстрозы, 6,7 г дрожжевой азотной основы и 1,6 г дрожжевой синтетической добавки для отсева без лейцина. Среда была подвергнута стерилизующей фильтрации перед использованием с применением вакуумного фильтрующего устройства с размером пор 0,22 мкм. Размер библиотеки оценивали путем

определения серийных разведений свежевыделенных клеток на чашке с агаром SCD-Leu в диапазоне разведений от 10^{-5} до 10^{-10} и экстраполяции путем подсчета колоний через три дня. Оставшуюся часть электропорированной культуры выращивали до насыщения, и клетки из этой культуры подвергали субкультивированию 1/100 в той же среде и выращивали до насыщения, чтобы свести к минимуму долю нетрансформированных клеток и обеспечить выделение плазмиды из клеток, которые могут содержать два или более вариантов библиотеки. Чтобы сохранить разнообразие библиотеки, этот этап субкультуры проводили с использованием инокулята, который содержал по меньшей мере в 10 раз больше клеток, чем рассчитанный размер библиотеки. Клетки из второй насыщенной культуры ресуспендировали в свежей среде, содержащей стерильный 25% (масса/объем) глицерин до плотности 1×10^{10}/мл, замораживали и хранили при -80ºC (замороженный библиотечный фонд).

Количество клеток, по меньшей мере в 10 раз превышающее расчетный размер библиотеки, размораживали из отдельных библиотечных запасов, суспендировали до $0{,}5\times10^{7}$ клеток/мл в неиндуцирующей среде SCD-Leu и выращивали в течение ночи. На следующий день количество клеток, в 10 раз превышающее размер библиотеки, центрифугировали при 2000 об/мин в течение двух минут и ресуспендировали до $0{,}5\times10^{7}$ клеток/мл в индуцирующей среде SCDG-Leu. Один литр индуцирующей среды SCDG-Leu был получен с использованием 5,4 г Na_2HPO_4, 8,56 г $NaH_2PO4{\bullet}H_2O$, 20 г галактозы, 2,0 г декстрозы, 6,7 г дрожжевой азотной основы и 1,6 г дрожжевой синтетической добавки для отсева без лейцина, растворенной в воде и стерилизованной посредством мембранной фильтрации 0,22 мкм. Культуру выращивали в индукционной среде в течение ночи при 30°C, чтобы индуцировать экспрессию библиотечных белков на поверхности дрожжевых клеток.

После индукции в течение ночи библиотек наивного ECD BCMA количество клеток, эквивалентное 10-кратному оцененному разнообразию библиотек, отделяли методом магнитной сепарации с использованием магнитных гранул Dynabeads™ His-Tag, предварительно загруженных BAFF-9xHis, для обогащения вариантов ECD BCMA способностью связывать экзогенные рекомбинантные контр-структурные белки. Результаты магнитной сепарации использовали в последующей схеме отбора FACS, включающей четыре раунда положительных отборов, чередующихся между BAFF-9xHis и APRIL-FLAG, с одновременным 10-кратным снижением концентрации контр-структуры в каждом раунде (например, FACS1: 50 нМ APRIL-FLAG; FACS4: 0,05 нМ BAFF-9xHis). Объем инкубации регулировали таким образом, чтобы поддерживать по меньшей мере 10-кратное стехиометрическое превышение контр-структуры над общим количеством

вариантных молекул ECD BCMA дрожжевого дисплея (при условии 100 000 копий белка на клетку), чтобы избежать артефактов истощения лигандов, которые могут уменьшить распознавание библиотеки. Связывание BAFF-9xHis и APRIL-FLAG с вариантами ECD BCMA выявляли с помощью PE-конъюгированного антитела против 6xHis-метки (BioLegend, США) и PE-конъюгированного антитела против FLAG-метки, соответственно. Варианты из выходов FACS3 и FACS4 были выделены для секвенирования ДНК и последующего клонирования для экспрессии рекомбинантного Fc-гибрида.

Второй цикл случайного мутагенеза был проведен на выходах дрожжевых клеток из описанных выше выборок FACS4 BAFF-9xHis. Протокол положительного отбора с чередованием контр-структур для каждого вида был таким же, как и в первом цикле, за исключением того, что порядок контр-структур был изменен (например, FACS1: 50 нМ BAFF-9xHis; FACS4: 0,05 нМ APRIL-FLAG). Дополнительные варианты были выбраны из выходов дрожжевых клеток FACS3 и FACS4.

А. Генерация мутантных ДНК-конструкций с вырожденными колонами доменов TNFR BCMA

В этом примере описывается конструирование целевых библиотек ДНК вырожденных кодонов доменов TNFR BCMA человека для трансляции и экспрессии на поверхности дрожжей в качестве библиотек дрожжевого дисплея, введение библиотек ДНК в дрожжи и отбор дрожжевых клеток, экспрессирующих модифицированные по аффинности варианты TNFR BCMA.

Библиотеки целевых ДНК-олигонуклеотидов были сконструированы на основе доступной кристаллической структуры и функциональных данных после характеристики in vitro рекомбинантных Fc-гибридов вариантных ECD BCMA белков, выделенных из цикла 1 и цикла 2 случайных библиотек, отобранных для созревания аффинности. Во-первых, положения BCMA для целевого мутагенеза были ограничены межфазными контактами BCMA:BAFF (PDB ID: 1XU2), с использованием средневзвешенного расстояния для каждого остатка, равного 4,5 ангстрем (PyMOL, Schrödinger). Во-вторых, тепловые карты последовательности-функции были созданы с использованием доступных данных IC_{50} для определения положений, в которых мутация обычно улучшала связывание с BAFF и APRIL. Чтобы облегчить визуальный контроль, был рассчитан показатель склонности, зависящий от положения (PSPS), путем сравнения частоты всех мутаций в рекомбинантных вариантных Fc-гибридах ECD BCMA, имеющих IC_{50} в пределах верхних 10% относительно частоты мутаций во всей популяции. PSPS дополнительно масштабировали по частоте мутаций в пределах верхних 10% (т.е.

нумератора PSPS), чтобы помочь скорректировать смещение положений с высокой мутационной нагрузкой. Среднее значение IC_{50} для результатов цикла 2 было на порядок ниже для BAFF, чем для APRIL, и, таким образом, предпочтение отдавали положениям, где замена в целом улучшала связывание BAFF.

Наконец, рассмотрение результатов экспрессии Fc-белка рекомбинантного вариантного ECD BCMA и гомогенности оценивали с помощью аффинной хроматографии белка A и эксклюзионной хроматографии, соответственно. Взятые вместе, семь положений были выбраны для проектирования трех независимых библиотек ECD BCMA с вырожденными кодонами: H19, I22, Q25, S30, N31, L35 и T36. Сайт-насыщающий мутагенез в каждом из необходимых положений, указанных в Таблице E6, проводили с использованием смешанного базового набора «NNK», который кодирует все 20 протеиногенных аминокислот. Каждая библиотека вырожденных кодонов была разработана с использованием SnapGene (GSL Biotech LLC, США) и синтезирована в виде одноцепочечного полноразмерного ДНК-олигонуклеотида Ultramer® от Integrated DNA Technologies.

Таблица E6. Целевые положения библиотеки, выбранные для насыщающего мутагенеза «NKK»

Положение	19	22	25	30	31	35	36
Остаток дикого типа	H	I	Q	S	N	L	T
Конструкция 1	X	X		X	X	X	
Конструкция 2	X		X		X	X	X
Конструкция 3	X	X	X	X	X	X	X

Целевые Ультрамеры® оцДНК NNK получали и вводили в дрожжи, по существу, как описано в Примере 4. Библиотеки использовали для отбора дрожжей, экспрессирующих модифицированные по аффинности варианты ECD BCMA, по существу, как описано в Примере 4. Выбор выполняли по существу, как описано в Примере 4, следуя протоколу случайного выбора библиотеки цикла 1. Дополнительные варианты, идентифицированные при скрининге, как описано, приведены в Таблице E14.

B. Переформатирование результатов отбора в виде Fc-гибридов

Выходы вариантов ECD BCMA из выборок, как описано выше, были субклонированы в вектор Fc-гибрида для анализа последовательности отдельных клонов, чтобы получить рекомбинантные иммуномодулирующие белки в виде Fc-гибридных белков, содержащих ECD BCMA по меньшей мере с одним модифицированным по аффинности доменом (например, вариантным ECD-Fc BCMA), кодирующую ДНК получали для кодирования белка следующим образом: вариантный домен BCMA, за которым следует линкер из 7 аминокислот (GSGGGGS; SEQ ID NO:590), за которым

следует безэффекторная Fc-последовательность IgG1 человека, содержащая мутации L234A, L235E и G237A, в соответствии с системой нумерации EU для иммуноглобулиновых белков. Поскольку конструкция не включает в себя какие-либо легкие цепи антител, которые могут формировать ковалентную связь с цистеином, Fc IgG1 человека также содержала замену остатков цистеина на остаток серина в положении 220 (C220S) по системе нумерации индексов EU для иммуноглобулиновых белков (соответствует положению 5 (C5S) со ссылкой на дикий тип или неизмененную Fc, указанную в SEQ ID NO:586). В Fc области также отсутствовал C-концевой лизин в положении 447 (обозначенный K447del), обычно кодируемый в гене константной области IgG1 человека дикого типа (соответствующий положению 232 дикого типа или немодифицированной Fc, указанной в SEQ ID NO:586). Безэффекторная (инертная) Fc IgG1 в гибридных конструкциях указана в SEQ ID NO:589:

Выходные пулы клеток из выбранных посредством FACS сортов ECD BCMA выращивали до конечной плотности в селекционной среде SCD-Leu и выделяли плазмидную ДНК с использованием набора для выделения дрожжевой плазмидной ДНК (Zymoresearch, США). Для генерации Fc-гибридов варианты ECD BCMA с созревшей аффинностью подвергали ПЦР-амплификации с использованием праймеров, содержащих гомологичные области по 40 п.н. на обоих концах, с кодированием вектора Fc-гибрида, расщепленного AfeI и BamHI, и в рамке с Fc-областью для проведения рекомбинации in vitro с использованием Gibson Assembly Master Mix (New England Biolabs). Реакция сборки Гибсона была добавлена к штаммам E. coli NEB5alpha (New England Biolabs, США) для трансформации при тепловом шоке в соответствии с инструкциями производителя.

Разведения реакций трансформации наносили на LB-агар, содержащий 100 мкг/мл карбенициллина (Teknova, США), чтобы выделить отдельные колонии для отбора. Как правило, до 96 колоний от каждой трансформации затем выращивали в 96-луночных планшетах до насыщения в течение ночи при 37°C в LB-бульоне, содержащем 100 мкг/мл карбенициллина (Teknova, кат.№ L8112), и небольшую аликвоту из каждой лунки отправляли на секвенирование ДНК для идентификации мутации (мутаций) во всех клонах.

После анализа последовательностей и идентификации представляющих интерес клонов плазмидную ДНК готовили с использованием набора MidiPlus (Qiagen).

Рекомбинантные вариантные Fc-гибридные белки были получены из адаптированных к суспензии клеток эмбриональной почки человека (HEK) 293 с использованием экспрессионной системы Expi293 (Invitrogen, США). Собирали надосадочную жидкость и улавливали Fc-белок на Mab SelectSure (GE Healthcare, кат. №

17543801). Белок элюировали из колонки с использованием 50 мМ ацетата, pH 3,6. Элюат с MabSelect Sure объединяли, и доводили pH до значения выше 5,0. Затем этот материал окончательно очищали на колонке для препаративной эксклюзионной хроматографии для получения высокоочищенного мономерного материала. В этом материале проводили замену буфера на 10 мм ацетат, 9% сахарозу, pH 5,0. Чистоту белка оценивали аналитическим методом. Материал разливали во флаконы и хранили при -80°C.

Аминокислотные замены в выбранных vTD BCMA, которые были идентифицированы путем отбора, приведены в Таблице 1. Выбранные vTD BCMA, отформатированные как Fc-гибридные белки, были протестированы на связывание и функциональную активность, как описано в Примере 6.

Пример 6. Оценка активности Fc-гибридных белков

Этот пример описывает характеристику активности молекул, содержащих домен BCMA, таких как растворимые молекулы дикого типа (WT) или вариантные vTD BCMA, отформатированные как Fc-гибриды, с использованием биоанализа in vitro на основе клеточной линии.

Были приобретены клетки Jurkat с репортером ядерного фактора каппа-би активированных B-клеток (NF-κB) на основе люциферазы (BPS Bioscience). Клетки Jurkat/NK-κB трансдуцировали лентивирусом для получения стабильной экспрессии мышиного TACI на клеточной поверхности (Jurkat/NF-κB/TACI). Клетки, экспрессирующие мышиный TACI, реагируют как на человеческий, так и на мышиный APRIL или BAFF. После связывания рекомбинантного человеческого или мышиного APRIL или BAFF с TACI эндогенные факторы транскрипции NK-κB в клетках Jurkat связываются с элементами ответа ДНК, контролирующими транскрипцию гена люциферазы светлячка. Выработку люциферазы определяли количественно путем добавления субстрата, содержащего люциферин, который при окислении генерирует свет, который можно измерить с помощью ридера микропланшетов. Схема анализа Jurkat/NF-kB/TACI показана на Фиг.1.

Были приобретены рекомбинантные лиганды APRIL и BAFF человека и мыши: APRIL человека (Tonbo Biosciences); BAFF человека (BioLegend); APRIL мыши (ProSci Incorporated); и BAFF мыши (R&D Systems).

Для определения биологической активности молекул, содержащих домен WT или vTD BCMA, рекомбинантные человеческие или мышиные APRIL или BAFF в различных концентрациях (в диапазоне от 1 до 10 нМ) в 30 мкл инкубировали с фиксированными или титрованными (в диапазоне от 40 нМ до 66 пМ) молекулами, содержащими домен BCMA, в 30 мкл. Лиганды и растворимые рецепторы инкубировали в течение 20 минут при

встряхивании при комнатной температуре (RT). 50 мкл переносили в 96-луночный белый планшет с плоскодонными лунками, содержащий $1,5\times10^5$ клеток Jurkat/NF-κB/TACI/лунку в среде объемом 50 мкл (RPMI1640 + 5% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС)). Лунки перемешивали, а планшеты инкубировали в течение 5 часов при 37°C в увлажненной 5% CO_2 инкубационной камере. Планшеты извлекали из инкубатора, и в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора субстрата для лизиса клеток и люциферазы (система анализа люциферазы Bio-Glo™, Promega), и планшеты инкубировали на орбитальном шейкере в течение 10 минут. Относительные значения люминесценции (RLU) определяли для каждого тестируемого образца путем измерения люминесценции со временем интегрирования 1 секунда на лунку с использованием ридера изображений Cytation 3 (BioTek Instruments). Снижение RLU в присутствии WT или vTD BCMA по сравнению с контрольными белками представляет собой блокаду и ингибирование лигандной сигнализации через трансдуцированный рецептор TACI в клетках Jurkat/NF-κB/TACI.

Как показано на Фиг.2, примерные vTD BCMA-Fc ингибируют передачу сигналов лигандами на уровнях, равных или превышающих уровни для Fc-гибридных белков, содержащих домены WT BCMA.

Пример 7. Генерация мультидоменных иммуномодулирующих белков, ингибирующих Т- и В-клетки

Были получены мультидоменные иммуномодулирующие белки, содержащие (1) по меньшей мере одну молекулу, ингибирующую Т-клетки (TIM), которая связывается с рецептором, стимулирующим Т-клетки, таким как CD28, или его лигандом; и (2) по меньшей мере одну молекулу, ингибирующую В-клетки (BIM), которая связывается с рецептором, стимулирующим В-клетки, таким как BCMA или APRIL, или его лигандом. Примерные TIM включали ECD дикого типа (WT) или вариантный ECD CTLA-4, содержащий домен IgSF (IgD или vIgD CTLA-4, соответственно), который связывается с CD28, например, такой, как любой, описанный в Примере 1. Примеры BIM включали (i) ECD дикого типа (WT) или вариантный ECD TACI, содержащий домен TD (TD или vTD TACI, соответственно), который связывается с лигандами APRIL или BAFF, такими как описано в Примере 5; или (ii) ECD WT или вариантный ECD BCMA, содержащий домен TD (TD или vTD BCMA, соответственно), который связывается с лигандами APRIL или BAFF, такими как описано в Примере 6.

Иммуномодулирующие белки были получены либо в виде мультимерных молекул путем гибридизации с Fc-белком, либо в виде мономерных молекул.

А. Мультимерные конфигурации

Различные мультидоменные иммуномодулирующие белки были получены в виде мультимерных молекул путем гибридизации с Fc-белком в различных конфигурациях, как кратко описано ниже. TIM или BIM мультидоменного иммуномодулирующего белка были по-разному связаны с N- или C-концом Fc-области посредством пептидного линкера, такого как GSGGGGS (SEQ ID NO:590), GGGGSGGGGS (2xGGGGS; SEQ ID NO:594), $(GGGGS)_4$ (SEQ ID NO:600), или $(GGGGS)_5$ (SEQ ID NO:671).

Для генерации гомодимерных Fc-гибридов примерная Fc-область IgG1, используемая в полученных конструкциях, имела последовательность, указанную в SEQ ID NO:589, и содержала мутацию C220S по нумерации EU, мутации L234A, L235E и G237A по нумерации EU для снижения эффекторной функции (мутации соответствовали C5S, L19A, L20E, G22A, со ссылкой на человеческий Fc IgG1 дикого типа, указанный в SEQ ID NO:586). и делецию C-концевого лизина, K447del по нумерации EU (соответствует делеции положения 232, со ссылкой на Fc дикого типа или немодифицированную Fc, указанную в SEQ ID NO:586).

В Таблице E7-A ниже приведены примеры полученных мультидоменных гомодимерных иммуномодулирующих Fc-гибридных белков.

Таблица E7-A: Мультидоменные иммуномодулирующие белки (гомодимер)

Описание	ДНК SEQ ID NO	Белок SEQ ID NO		CTLA-4 (SEQ ID NO)	TACI (SEQ ID NO)	BCMA (SEQ ID NO)	Линкер (SEQ ID NO)	Fc (SEQ ID NO)
		His метка	His метка					
CTLA-4 ECD и BCMA								
CTLA-4 186–GSG4S – Fc-(G4S)4 – BCMA 406		601		G29W/L98Q/Y105L ECD (186)		H19L (2-54) (406)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 406		602		CTLA-4 ECD (1)		H19L (2-54) (406)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
CTLA-4 186GSG4S – Fc- (G4S)4 – BCMA 381		603		G29W/L98Q/Y105L ECD (186)		S16A, H19Y, R39Q (2-54) (381)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
CTLA-4		604		G29W/L		H19R (2-	GSG4S	Fc (589)

Таблица E7-A: Мультидоменные иммуномодулирующие белки (гомодимер)								
Описание	ДНК SEQ ID NO	Белок SEQ ID NO		CTLA-4 (SEQ ID NO)	TACI (SEQ ID NO)	BCMA (SEQ ID NO)	Линкер (SEQ ID NO)	Fc (SEQ ID NO)
		His метка	His метка					
186GSG4S – Fc- (G4S)4 – BCMA 411				98Q/Y105L ECD (186)		54) (411)	(590) (G4S)4 (600)	
CTLA-4 186GSG4S – Fc- (G4S)4 – BCMA 405		605		G29W/L98Q/Y105L ECD (186)		H19K (2-54) (405)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 381		606		CTLA-4 ECD (1)		S16A, H19Y, R39Q (2-54) (381)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 411		607		CTLA-4 ECD (1)		H19R (2-54) (411)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 405		608		CTLA-4 ECD (1)		H19K (2-54) (405)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
BCMA 381 GSG4S – Fc-(G4S)4 – CTLA-4 186		609		G29W/L98Q/Y105L ECD (186)		S16A, H19Y, R39Q (2-54) (381)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)2 BCMA 356		631		CTLA-4 ECD (1)		2-54 WT (356)	GSG4S (590) (G4S)2 (594)	Fc (589)
CTLA-4 92 GSG4S Fc (G4S)2 BCMA 356		632		G29W/N58S/L63P/Q82R/L98Q/Y105L ECD (92)		2-54 WT (356)	GSG4S (590) (G4S)2 (594)	Fc (589)

Таблица E7-A: Мультидоменные иммуномодулирующие белки (гомодимер)								
Описание	ДНК SEQ ID NO	Белок SEQ ID NO		CTLA-4 (SEQ ID NO)	TACI (SEQ ID NO)	BCMA (SEQ ID NO)	Линкер (SEQ ID NO)	Fc (SEQ ID NO)
		His метка	His метка					
CTLA-4 165 GSG4S Fc (G4S)2 BCMA 356		633		T53S/L63P/L98Q ECD (165)		2-54 WT (356)	GSG4S (590) (G4S)2 (594)	Fc (589)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)2 BCMA 357		634		CTLA-4 ECD (1)		H19Y (2-54) (357)	GSG4S (590) (G4S)2 (594)	Fc (589)
CTLA-4 92 GSG4S Fc (G4S)2 BCMA 357		635		G29W/N58S/L63P/Q82R/L98Q/Y105L ECD (92)		H19Y (2-54) (357)	GSG4S (590) (G4S)2 (594)	Fc (589)
CTLA-4 165 GSG4S Fc (G4S)2 BCMA 357		636		T53S/L63P/L98Q ECD (165)		H19Y (2-54) (357)	GSG4S (590) (G4S)2 (594)	Fc (589)
BCMA 411 GSG4S Fc (G4S)4 CTLA-4 186		645		G29W/L98Q/Y105L ECD (186)		H19R (2-54) (411)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
BCMA 405 GSG4S Fc (G4S)4 CTLA-4 186		646		G29W/L98Q/Y105L ECD (186)		H19K (2-54) (405)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
BCMA 406 GSG4S Fc (G4S)4 CTLA-4 186		647		G29W/L98Q/Y105L ECD (186)		H19L (2-54) (406)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
BCMA 381 GSG4S Fc (G4S)4 CTLA-4 WT ECD 1		649		CTLA-4 ECD (1)		S16A, H19Y, R39Q (2-54) (381)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)

Таблица E7-A: Мультидоменные иммуномодулирующие белки (гомодимер)								
Описание	ДНК SEQ ID NO	Белок SEQ ID NO		CTLA-4 (SEQ ID NO)	TACI (SEQ ID NO)	BCMA (SEQ ID NO)	Линкер (SEQ ID NO)	Fc (SEQ ID NO)
		His метка	His метка					
BCMA 411 GSG4S Fc (G4S)4 CTLA-4 WT ECD 1		650		CTLA-4 ECD (1)		H19R (2-54) (411)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
BCMA 405 GSG4S Fc (G4S)4 CTLA-4 WT ECD 1		651		CTLA-4 ECD (1)		H19K (2-54) (405)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
BCMA 406 GSG4S Fc (G4S)4 CTLA-4 WT ECD 1		652		CTLA-4 ECD (1)		H19L (2-54) (406)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
BCMA 357 (G4S)3 CTLA-4 92 GSG4S Fc		655		G29W/N58S/L63P/Q82R/L98Q/Y105L ECD (92)		H19Y (2-54) (357)	(G4S)3 (595) GSG4S (590)	Fc (589)
BCMA 357 GSG4S Fc (G4S)3 CTLA-4 92		656		G29W/N58S/L63P/Q82R/L98Q/Y105L ECD (92)		H19Y (2-54) (357)	(G4S)3 (595) GSG4S (590)	Fc (589)
CTLA-4 92 (G4S)4 BCMA 357 GSG4S Fc		657		G29W/N58S/L63P/Q82R/L98Q/Y105L ECD (92)		H19Y (2-54) (357)	(G4S)4 (600) GSG4S (590)	Fc (589)
CTLA-4 92 GSG4S Fc (G4S)3 BCMA 357		658		G29W/N58S/L63P/Q82R/L98Q/Y105L		H19Y (2-54) (357)	GSG4S (590) (G4S)3 (595)	Fc (589)

Таблица E7-A: Мультидоменные иммуномодулирующие белки (гомодимер)								
Описание	ДНК SEQ ID NO	Белок SEQ ID NO		CTLA-4 (SEQ ID NO)	TACI (SEQ ID NO)	BCMA (SEQ ID NO)	Линкер (SEQ ID NO)	Fc (SEQ ID NO)
		His метка	His метка					
				ECD (92)				
CTLA-4 92 GSG4S Fc (G4S)5 BCMA 357		659		G29W/N58S/L63P/Q82R/L98Q/Y105L ECD (92)		H19Y (2-54) (357)	GSG4S (590) (G4S)5 (671)	Fc (589)
CTLA-4 ECD и TACI								
CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541		610		G29W/L98Q/Y105L ECD (186)	K77E, F78Y, Y102D (68-110) (541)		GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541		611		CTLA-4 ECD (1)	K77E, F78Y, Y102D (68-110) (541)		GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 (TACI 542)		612		G29W/L98Q/Y105L ECD (186)	Q75E, R84Q (68-110) (542)		GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 (TACI 542)		613		CTLA-4 ECD (1)	Q75E, R84Q (68-110) (542)		GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
TACI 542 GSG4S Fc (G4S)4 (CTLA-4 186)		614		G29W/L98Q/Y105L ECD (186)	Q75E, R84Q (68-110) (542)		GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
TACI 516 (G4S)2 Fc (G4S)2 CTLA 4 668		615		C122S ECD (668)	29-110 WT (516)		(G4S)2 (594)	Fc (589)
TACI 528 (G4S)2 Fc		616		CTLA-4 ECD	68-110 WT		(G4S)2 (594)	Fc (589)

Таблица E7-A: Мультидоменные иммуномодулирующие белки (гомодимер)								
Описание	ДНК SEQ ID NO	Белок SEQ ID NO		CTLA-4 (SEQ ID NO)	TACI (SEQ ID NO)	BCMA (SEQ ID NO)	Линкер (SEQ ID NO)	Fc (SEQ ID NO)
		His метка	His метка					
(G4S)2 CTLA 4 WT ECD 1				(1)	(528)			
TACI 528 (G4S)2 Fc (G4S)2 CTLA 4 668		617		C122S ECD (668)	68-110 WT (528)		(G4S)2 (594)	Fc (589)
CTLA-4 WT ECD 1 (G4S)2 Fc (G4S)2 TACI 516		624		CTLA-4 ECD (1)	29-110 WT (516)		(G4S)2 (594)	Fc (589)
CTLA 4 668 (G4S)2 Fc (G4S)2 TACI 516		625		C122S ECD (668)	29-110 WT (516)		(G4S)2 (594)	Fc (589)
CTLA-4 WT ECD 1 (G4S)2 Fc (G4S)2 TACI 528		626		CTLA-4 ECD (1)	68-110 WT (528)		(G4S)2 (594)	Fc (589)
CTLA 4 668 (G4S)2 Fc (G4S)2 TACI 528		627		C122S ECD (668)	68-110 WT (528)		(G4S)2 (594)	Fc (589)
CTLA 4 92 GSG4S Fc (G4S)2 TACI 516		637		G29W/N 58S/L63 P/Q82R/ L98Q/Y1 05L ECD (92)	29-110 WT (516)		GSG4S (590) (G4S)2 (594)	Fc (589)
CTLA 4 165 GSG4S Fc (G4S)2 TACI 516		638		T53S/L6 3P/L98Q ECD (165)	29-110 WT (516)		GSG4S (590) (G4S)2 (594)	Fc (589)
CTLA-4 113 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 535 (68-110)		643		L12F/R1 6H/G29 W/M56T /L98Q/Y 105L ECD (113)	R84G (68-110) (535)		GSG4S (590) (G4S)2 (594)	Fc (589)

Таблица E7-A: Мультидоменные иммуномодулирующие белки (гомодимер)								
Описание	ДНК SEQ ID NO	Белок SEQ ID NO		CTLA-4 (SEQ ID NO)	TACI (SEQ ID NO)	BCMA (SEQ ID NO)	Линкер (SEQ ID NO)	Fc (SEQ ID NO)
		His метка	His метка					
CTLA-4 113 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 688 (29-110)		644		L12F/R16H/G29W/M56T/L98Q/Y105L ECD (113)	R84G (29-110) (688)		GSG4S (590) (G4S)2 (594)	Fc (589)
TACI 541 GSG4S Fc (G4S)4 CTLA-4 186		648		G29W/L98Q/Y105L ECD (186)	K77E, F78Y, Y102D (68-110) (541)		GSG4S (590) (G4S)2 (594)	Fc (589)
TACI 541 GSG4S Fc (G4S)4 CTLA-4 WT ECD 1		653		CTLA-4 ECD (1)	K77E, F78Y, Y102D (68-110) (541)		GSG4S (590) (G4S)2 (594)	Fc (589)
TACI 542 GSG4S Fc (G4S)4 CTLA-4 WT ECD 1		654		CTLA-4 ECD (1)	Q75E, R84Q (68-110) (542)		GSG4S (590) (G4S)2 (594)	Fc (589)

Для получения гетеродимерных мультидоменных Fc-гибридных белков мультимерные мультидоменные иммуномодулирующие белки были получены в виде гетеродимерных молекул с помощью технологии «выступ-во-впадину». В таком примере гетеродимер был получен путем совместной экспрессии TIM и BIM, каждая из которых была гибридизована либо с (1) первой Fc-субъединицей «выступа» (указанной в SEQ ID NO:669, содержащей мутации S354C и T366W по нумерации EU, соответствующие S139C и T151W со ссылкой на человеческую Fc IgG1 дикого типа, указанную в SEQ ID NO:586); с (2) второй Fc-субъединицей «впадины» (указанной в SEQ ID NO:670, содержащей мутации Y349C, T366S, L368A и Y407V по нумерации EU, соответствующие Y134C, T151S, L153A и Y192V со ссылкой на человеческую Fc IgG1 дикого типа, указанную в SEQ ID NO:586), для экспрессии гетеродимерной молекулы. Кроме того, как Fc как выступа, так и впадины также включали мутации L19A, L20E, G22A для снижения

эффекторной функции и содержали замену остатка цистеина на остаток серина в положении 5 (C5S), каждая по сравнению с Fc дикого типа или немодифицированной Fc, указанной в SEQ ID NO:586 (соответствует C220S, L234A, L235E и G237A по нумерации EU, соответственно).

Fc выступа (SEQ ID NO:669):

EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G

Fc впадины (SEQ ID NO:670):

EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G

В Таблице E7-B приведены примеры полученных мультидоменных гетеродимерных иммуномодулирующих гибридных белков.

Таблица E7-B: Гетеродимерные мультидоменные иммуномодулирующие белки CTLA/BCMA/TACI

				TIM	BIM			
Описание	**ДНК SEQ ID NO**	**Белок SEQ ID NO Белок SEQ ID NO +His метка**		**CTLA-4 (SEQ ID NO)**	**TACI (SEQ ID NO)**	**BCMA (SEQ ID NO)**	**Линкер (SEQ ID NO)**	**Fc (SEQ ID NO)**
CTLA-4 92 Fc + BCMA 357 Fc	CTLA-4 92 GSG4S Fc K	662		G29W/N58S/L63P/Q82R/L98Q/Y105L ECD (92)			GSG4S (590)	Fc K (669)
	BCMA 357 GSG4S Fc H	660				H19Y (2-54) (357)	GSG4S (590)	Fc H (670)
CTLA-4 113 Fc + BCMA	CTLA-4 113	663		L12F/R16H/G29			GSG4S (590)	Fc K (669)

Таблица E7-B: Гетеродимерные мультидоменные иммуномодулирующие белки CTLA/BCMA/TACI								
				TIM	**BIM**			
Описание	**ДНК SEQ ID NO**	**Белок SEQ ID NO Белок SEQ ID NO +His метка**		**CTLA-4 (SEQ ID NO)**	**TACI (SEQ ID NO)**	**BCMA (SEQ ID NO)**	**Линкер (SEQ ID NO)**	**Fc (SEQ ID NO)**
357 Fc	GSG4S Fc K			W/M56T /L98Q/Y 105L ECD (113)				
	BCMA 357 GSG4S Fc H	660				H19Y (2-54) (357)	GSG4S (590)	Fc H (670)

CTLA-4-Fc (Абатацепт) или BCMA-Fc (Таблица E8-A) использовали в качестве контроля мультидоменных иммуномодулирующих Fc-гибридных белков.

Экспрессионные конструкции, кодирующие представляющие интерес Fc-гибридные белки, временно экспрессировали в клетках Expi293 HEK293 (например, Invitrogen) с реагентами Expifectamine™ и средами в соответствии с инструкциями производителя. Собирали надосадочную жидкость, извлекали белок и элюировали из колонки с белком A с использованием системы очистки белка AKTA. Затем элюированный материал разделяли с помощью дополнительной стадии препаративной эксклюзионной хроматографии для получения неагрегированного (мономерного) высокоочищенного материала. В этом материале проводили замен буфера на 10 мМ ацетат, 9% сахарозу, pH 5,0 (A5Su). Белок разливали во флаконы в стерильном ламинарно-потоковом боксе и замораживали при -80°C. Флакон размораживали и оценивали посредством аналитической SEC, чтобы продемонстрировать, что материал был стабильным и преимущественно неагрегированным (мономерным) после размораживания.

Таблица E8-A: Fc BCMA								
Описание	ДНК SEQ ID NO	Белок SEQ ID NO	Белок SEQ ID NO +His метка	CTLA-4 (SEQ ID NO)	TACI (SEQ ID NO)	BCMA (SEQ ID NO)	Линкер (SEQ ID NO)	Fc (SEQ ID NO)
Fc (G4S)2 BCMA		628				2-54 WT (356)	(G4S)2 (594)	Fc (589)

(356)								
Fc (G4S)2 BCMA (357)		629				H19Y (2-54) (357)	(G4S)2 (594)	Fc (589)

B. Мономерные конфигурации

В некоторых конфигурациях полученные мультидоменные иммуномодулирующие белки были созданы в виде мономерных молекул, содержащих TIM и BIM, связанных вместе пептидным линкером. В этом примере конструкции были созданы с помощью линкера (EAAAK)6 (SEQ ID NO:665). В некоторых случаях мономерные иммуномодулирующие белки также содержали N- или C-концевую часть для детекции и/или очистки, такую как поли-гистидиновая метка (HHHHHH; SEQ ID NO:702) и/или Flag-метка (DYKDDDDK; SEQ ID NO:588).

В Таблице E9 описаны примерные созданные мультидоменные иммуномодулирующие мономерные белки.

Таблица E9: Мономерные мультидоменные иммуномодулирующие белки

Описание	**ДНК SEQ ID NO**	**Белок SEQ ID NO**		**CTLA-4 (SEQ ID NO)**	**TACI (SEQ ID NO) BCMA (SEQ ID NO)**	**Линкер (SEQ ID NO)**
		- His метка	+ Flag His метка			
TACI 516 (EAAAK)6 CTLA 4 WT ECD 1		703	618	CTLA-4 ECD (1)	29-110 WT (516)	(EAAAK)6 (665)
TACI 516 (EAAAK)6 CTLA 4 668		704	619	C122S ECD (668)	29-110 WT (516)	(EAAAK)6 (665)
TACI 528 (EAAAK)6 CTLA 4 WT ECD 1		705	620	CTLA-4 ECD (1)	68-110 WT (528)	(EAAAK)6 (665)
TACI 528 (EAAAK)6 CTLA 4 668		706	621	C122S ECD (668)	68-110 WT (528)	(EAAAK)6 (665)
TACI 516 (G4S)3 CTLA 4 668		707	622	C122S ECD (668)	29-110 WT (516)	(G4S)3 (595)
TACI 528 (G4S)3 CTLA 4 668		708	623	C122S ECD (668)	68-110 WT (528)	(G4S)3 (595)

Пример 8. Оценка биологической активности BCMA/TACI блокады TACI-опосредованной стимуляции BCMA- или TACI-содержащими молекулами, связанных с доменами CTLA-4

Биоанализ на основе клеточной линии, описанный в Примере 6, использовали для оценки функциональной характеристики TACI- или BCMA-содержащих WT, vTD или мультидоменных белков, связанных с CTLA-4 WT или vIgSF доменом для блокады APRIL или BAFF-опосредованной лигандной сигнализации через рецептор TACI в клетках Jurkat/NF-κB/TACI. Были оценены примерные связанные молекулы, описанные в Примере 7. APRIL- или BAFF-опосредованную лигандную передачу сигналов количественно оценивали путем мониторинга продукции люциферазы в клетках.

A. Биологическая активность примерных мультидоменных молекул

В одном эксперименте примерные молекулы, приведенные в Таблице E8, оценивали с использованием репортерных клеток Jurkat /NF-κB/TACI для блокады APRIL- или BAFF-опосредованной передачи сигналов. В Таблице E10-A приведены значения полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC_{50}) для ингибирования APRIL- и BAFF-опосредованной передачи сигналов TACI. Также показано сравнение с соответствующими контрольными группами WT BCMA-Fc или WT TACI-Fc (Δ исходного vTD) для каждого эксперимента. В некоторых случаях тестируемые белки не сравнивали с их исходными контролями дикого типа, и они представлены как (-) в таблице ниже.

Таблица E10-A. Биоактивность мультидоменных иммуномодулирующих белков

Описание	SEQ ID NO	IC_{50} (нМ) APRIL	IC_{50} (нМ) APRIL (Δ исходного vTD)	IC_{50} (нМ) BAFF	IC_{50} (нМ) BAFF (Δ исходного vTD)
TACI 516 (EAAAK)6 CTLA 4 WT ECD 1	703/618	46,15	46,2 (5,0)	7,781	7,8 (3,0)
TACI 516 (EAAAK)6 CTLA 4 668	704/619	138	138,0 (15,0)	3,422	3,4 (1,3)
TACI 528 (EAAAK)6 CTLA 4 WT ECD 1	705/620	ND	ND	5,305	5,3 (2,1)
TACI 528 (EAAAK)6 CTLA 4 668	706/621	ND	ND	5,176	5,2 (2,0)
TACI 516 (G4S)3 CTLA 4 668	707/622	ND	ND	8,747	8,7 (3,4)
TACI 528 (G4S)3 CTLA 4 668	708/623	ND	ND	8,412	8,4 (3,3)
CTLA-4 WT ECD 1 (G4S)2 Fc (G4S)2 TACI 516	624	19,15	19,2 (2,1)	9,459	9,5 (3,7)
CTLA 4 668 (G4S)2 Fc (G4S)2 TACI 516	625	19,97	20,0 (2,2)	10,05	10,1 (3,9)
CTLA-4 WT ECD 1 (G4S)2 Fc (G4S)2 TACI 528	626	37,53	37,5 (4,1)	2,06	2,1 (0,8)

Таблица E10-A. Биоактивность мультидоменных иммуномодулирующих белков					
Описание	SEQ ID NO	IC_{50} (нМ) APRIL	IC_{50} (нМ) APRIL (Δ исходного vTD)	IC_{50} (нМ) BAFF	IC_{50} (нМ) BAFF (Δ исходного vTD)
CTLA 4 668 (G4S)2 Fc (G4S)2 TACI 528	627	8,655	8,7 (0,9)	2,237	2,2 (0,9)
TACI WT Fc	516	9,173	9,2 (1,0)	2,579	2,6 (1,0)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)2 BCMA 356	631	0,8383	0,8 (0,0)	33,63	33,6 (0,8)
CTLA-4 165 GSG4S Fc (G4S)2 BCMA 356	633	0,8939	0,9 (0,0)	36,83	36,8 (0,9)
CTLA-4 92 GSG4S Fc (G4S)2 BCMA 356	632	0,8094	0,8 (0,0)	33,46	33,5 (0,8)
Fc (G4S)2 BCMA (356)	628	42,71	42,7 (1,0)	42,71	42,7 (1,0)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)2 BCMA 357	634	0,6879	0,7 (1,0)	3,642	3,6 (0,7)
CTLA-4 92 GSG4S Fc (G4S)2 BCMA 357	635	0,6831	0,7 (1,0)	6,274	6,3 (1,2)
CTLA-4 165 GSG4S Fc (G4S)2 BCMA 357	636	0,6057	0,6 (0,9)	11,84	11,8 (2,2)
Fc (G4S)2 BCMA (357)	629	0,6957	0,7 (1,0)	5,439	5,4 (1,0)
CTLA 4 165 GSG4S Fc (G4S)2 TACI 516	638	4,644	4,6 (0,9)	0,9277	0,9 (0,5)
CTLA 4 92 GSG4S Fc (G4S)2 TACI 516	637	6,752	6,8 (1,3)	1,732	1,7 (1,0)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)2 BCMA 356	631	5,106	5,1 (1,0)	1,698	1,7 (1,0)
CTLA-4 113 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 535 (68-110)	643	8,632	8,6 (NA)	0,5059	0,51 (0,4)
CTLA-4 113 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 535 (29-110)	644	8,253	8,5 (1,4)	0,566	0,57 (0,4)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)2 BCMA 356	631	6,087	6,1 (1,0)	1,389	1,39 (1,0)
CTLA-4 186GSG4S – Fc- (G4S)4 – BCMA 381	603	1,27	1,3 (-)	0,2818	0,28 (-)
CTLA-4 186GSG4S – Fc- (G4S)4 – BCMA 411	604	2,371	2,4 (-)	0,1329	0,13 (-)
CTLA-4 186GSG4S – Fc- (G4S)4 – BCMA 405	605	18,39	18,4 (-)	0,1604	0,16 (-)
CTLA-4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 – BCMA 406	601	0,9969	1,0 (-)	0,4901	0,49 (-)
CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	610	1,558	1,6 (-)	0,1027	0,10 (-)
CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 (TACI 542	612	2,49	2,5 (-)	0,1532	0,15 (-)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 381	606	0,8491	0,8 (-)	0,234	0,23 (-)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S	607	2,005	2,0 (-)	0,1746	0,17 (-)

Таблица E10-A. Биоактивность мультидоменных иммуномодулирующих белков					
Описание	SEQ ID NO	IC_{50} (нМ) APRIL	IC_{50} (нМ) APRIL (Δ исходного vTD)	IC_{50} (нМ) BAFF	IC_{50} (нМ) BAFF (Δ исходного vTD)
Fc (G4S)4 BCMA 411					
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 405	608	23,13	23,1 (-)	0,1956	0,20 (-)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 406	602	1,185	1,2 (-)	0,678	0,68 (-)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	611	1,646	1,6 (-)	0,1285	0,13 (-)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 (TACI 542	613	2,732	2,7 (-)	0,1599	0,16 (-)
BCMA 381 GSG4S – Fc- (G4S)4 –CTLA-4 186	609	0,8762	0,9 (-)	0,06175	0,06 (-)
TACI 542 GSG4S Fc (G4S)4 (CTLA-4 186	614	1,2	1,2 (-)	0,1786	0,18 (-)
BCMA 357 (G4S)3 CTLA-4 92 GSG4S Fc	655	0,6888	0,69 (0,7)	0,3963	0,4 (0,4)
BCMA 357 GSG4S Fc (G4S)3 CTLA-4 92	656	0,5824	0,58 (0,6)	0,4155	0,4 (0,4)
CTLA-4 92 (G4S)4 BCMA 357 GSG4S Fc	657	0,63	0,63 (0,6)	3,754	3,8 (3,8)
CTLA-4 92 GSG4S Fc (G4S)3 BCMA 357	658	0,5499	0,55 (0,5)	0,5481	0,6 (0,6)
CTLA-4 92 GSG4S Fc (G4S)5 BCMA 357	659	0,6873	0,69 (0,7)	0,7649	0,8 (0,8)
BCMA WT-Fc	356	1,026	1,03 (1,0)	0,9946	1,0 (1,0)
CTLA-4 92 Fc K + BCMA 357 Fc H	662 660	4,19	4,2 (4,2)	5,385	5,4 (5,4)
CTLA-4 113 Fc K/ BCMA 357 Fc H	663 660	5,203	5,2 (5,2)	5,153	5,2 (5,2)
BCMA WT-Fc	356	1,026	1,0 (1,0)	0,9946	1,0 (1,0)

B. Активность вариантного BCMA по ингибированию BAFF и APRIL, или vTD BCMA или TACI в комбинации в качестве мультидоменного иммуномодулирующего белка с вариантным vIgD CTLA-4.

Как показано на Фиг.3A, vTD BCMA продемонстрировал сопоставимую активность независимо от того, используется ли он как одиночный домен или включен как часть мультидоменной собранной молекулы. Как показано на Фиг.3B, vTD BCMA, включенные в собранные молекулы, являются взаимозаменяемыми и могут быть использованы для модуляции ингибирования лиганда.

Как показано на Фиг.3C, vTD BCMA, включенные в качестве мультидоменных собранных молекул, демонстрируют способность блокировать как APRIL, так и BAFF.

Как показано на Фиг.3D, vTD BCMA, включенные в собранные молекулы, являются взаимозаменяемыми и могут быть использованы для модуляции ингибирования лиганда.

Как показано на Фиг.4, примерные vTD-Fc BCMA и сборки, содержащие BCMA или vTD TACI с vIgD CTLA-4, ингибируют передачу сигналов мышиного APRIL и BAFF-лиганда. В совокупности результаты показывают способность мультидоменных собранных молекул блокировать лигандную сигнализацию APRIL и BAFF (в данном примере иллюстрируемую TACI-опосредованной сигнализацией) аналогично однодоменным контролям.

C. Сравнение вариантных vTD BCMA и мультидоменных иммуномодулирующих белков vTD BCMA и TACI для блокады APRIL- и BAFF-опосредованной передачи сигналов по сравнению с Fc-гибридом, содержащим ECD-части, присутствующие в Атацицепте или Телитацицепте.

В другом подобном исследовании образцовые созданные молекулы, как описано в Примере 7, оценивали на их способность блокировать APRIL- или BAFF-опосредованную передачу сигналов лигандами в клетках Jurkat/NF-κB/TACI. Для сравнения были получены контрольные молекулы, содержащие ECD TACI дикого типа, гибридизованные с последовательностью Fc, указанной в SEQ ID NO:589. В одном контроле гибридный белок содержал TACI дикого типа (TACI 30-110, SEQ ID NO:718; соответствует части ECD TACI в атацицепте, SEC ID NO:720). В другом контроле гибридный белок содержал TACI дикого типа (TACI 13-118, SEQ ID NO:719), соответствующий части ECD TACI в телитацицепте). Активность сравнивали с контрольными молекулами. Активность также сравнивали с моноклональным антителом против BAFF белимумабом.

Примерные молекулы BCMA, либо дикого типа, либо вариантные vTD BCMA отдельно, либо мультидоменные молекулы, дополнительно объединенные с вариантом IgSF CTLA-4, титровали (между 100 000 пМ - 32 пМ), добавляли к 2 нм рекомбинантного человеческого APRIL или BAFF и анализировали, как описано выше для анализа Jurkat/NF-κB. Как показано на Фиг.5A, примерные молекулы, содержащие TD BCMA отдельно или в виде мультидоменного белка, демонстрировали усиленную блокаду APRIL, но не блокаду BAFF, по сравнению с TACI 30-110-Fc, TACI 13-118-Fc и белимумабом.

Примерные молекулы TACI, либо vTD дикого типа, либо мультидоменные молекулы дикого типа и vTD, дополнительно объединенные с вариантом IgSF CTLA-4, титровали (между 100 000 пМ - 32 пМ), добавляли к 2–нм рекомбинантному человеческому APRIL или BAFF и определяли, как описано выше, для анализа Jurkat/NF-κB. Как показано на Фиг.5B, примерные молекулы, содержащие vTD TACI в качестве

мультидоменного белка, демонстрировали усиленную блокаду APRIL и BAFF, большую, чем TACI 30-100-Fc, TACI 13-118-Fc и белимумаб. WT TACI-Fc, содержащий только домен CRD2 TACI, также демонстрировал усиленную блокаду APRIL, большую, чем TACI 30-100-Fc и TACI 13-118-Fc. Эти результаты согласуются с выводом о том, что минимальный домен CRD2 (содержащий аминокислотные остатки 68-110) демонстрирует улучшенную блокаду APRIL по сравнению с молекулами ECD TACI, также содержащими части домена CRD1, присутствующие в атацицепте и телитацицепте.

В Таблице E10-B приведены значения полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC_{50}) для ингибирования APRIL- и BAFF-опосредованной передачи сигналов TACI для примерных молекул, описанных на Фиг.5A и Фиг.5B. Также в скобках показана относительная блокада по сравнению с атацицептом (Δ атацицепт) для каждой тестируемой молекулы.

Таблица E10-B. Биоактивность мультидоменных иммуномодулирующих белков по сравнению с атацицептом

Описание	SEQ ID NO	I_{C50} (нМ) APRIL	IC_{50} (нМ) APRIL (Δ TACI 30-110-Fc)	IC_{50} (nM) BAFF (Δ TACI 30-110-Fc)
381 BCMA-Fc	381	180	180 (0,05)	1778 (0,31)
406 BCMA-Fc	406	190	190 (0,05)	1532 (0,27)
411 BCMA-Fc	411	209	209 (0,05)	781 (0,14)
CTLA-4 186– GSG4S – Fc-(G4S)4 – BCMA 406	601	269	269 (0,07)	2628 (0,46)
356 BCMA-Fc	356	183	183 (0,05)	823 (0,14)
CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	610	272	272 (0,07)	1259 (0,22)
528 TACI CRD2-Fc	528	369	369 (0,10)	1328 (0,23)
TACI 13-118-Fc	719	9103	9103 (2,37)	7699 (1,33)
Белимумаб		214911	214911 (55,84)	2496 (0,43)
TACI 30-110-Fc	718	3849	3849 (1,00)	5771 (1,00)

Пример 9. Оценка биологической активности блокады CD80/CD86 CD28-опосредованной костимуляции с помощью CTLA-4 при сборке с доменами BCMA или TACI дикого типа или с созревшей аффинностью

Этот пример описывает функциональную характеристику белков WT, vIgD или собранных белков, содержащих CTLA-4, путем блокады CD80/CD86 и ингибирования CD28-опосредованной костимуляции с помощью биоанализа in vitro на основе клеточной линии.

Были приобретены клетки Jurkat, экспрессирующие люциферазу, управляемую промотором интерлейкина-2 (IL-2) (Promega). Клетки Jurkat, клеточная линия Т-клеточного лейкоза человека, эндогенно экспрессируют комплексы Т–клеточный

рецептор (TCR) - CD3 и CD28. При взаимодействии с CD80 или CD86 передача сигналов CD28 опосредует усиление транскрипции промотора IL-2. Активация клеток Jurkat с помощью анти-CD3 и костимуляция с помощью CD80 или CD86 приводит к выработке люциферазы. Люциферазу определяют количественно, как описано в Примере 6. Клетки K562, клеточная линия миелолейкоза человека, были трансдуцированы для стабильной экспрессии на клеточной поверхности одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv) против человеческого CD3 (OKT3), и человеческих CD80 или CD86 (K562/OKT3/CD80 или CD86) для получения искусственных антигенпрезентирующих клеток (aAPC). Схема анализа Jurkat/IL-2 показана на Фиг.6.

Для определения биологической активности WT или vIgD доменов CTLA-4, собранные белки, содержащие эти домены, титровали (в диапазоне от 100 нМ до 256 пМ) и помещали в 96–луночный белый планшет с плоскодонными лунками в 33 мкл среды (RPMI1640 + 5% FBS). aAPC добавляли к белкам в количестве 2×10^4 клеток на лунку в 33 мкл среды и инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре при встряхивании. Клетки Jurkat/IL-2 добавляли в количестве 2×10^5 клеток на лунку, чтобы довести конечный объем в лунке до 100 мкл. Клетки APC и Jurkat инкубировали в течение 5 часов при 37°C в увлажненной 5% CO_2 инкубационной камере. Планшеты обрабатывали, и количественно определяли люминесценцию, как описано выше. Снижение RLU в присутствии CTLA-4 WT или vIgD, или собранных CTLA-4 относительно контрольных белков представляет собой блокаду CD80 или CD86, и ингибирование CD28-опосредованной костимуляции в клетках Jurkat/IL-2.

В Таблице E11 приведены значения полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC_{50}) для ингибирования CD80- и CD86-опосредованной передачи сигналов CD28. Также показано сравнение с эталонным контрольным абатацептом WT-CTLA-4-Fc (Δ исходного CTLA-4-Fc) для каждого эксперимента. В некоторых случаях тестируемые белки не были сопоставимыми с их исходным контролем дикого типа и указаны как (-), или значение IC_{50} не определялось (ND).

Таблица E11. Биоактивность мультидоменных иммуномодулирующих белков					
Описание	SEQ ID NO	CD80 IC_{50} (nM)	CD80 IC_{50} (нМ) (Δ исходного CTLA-4)	CD86 IC50 (Δ WT)	CD86 IC_{50} (нМ) (Δ исходного CTLA-4)
CTLA-4 186 GSG4S – Fc-(G4S)4 – BCMA 381	603	26,1	26,1 (0,8)	11,9	11,9 (1,5)
CTLA-4 186GSG4S – Fc-(G4S)4 – BCMA 411	604	32,7	32,7 (1,0)	9	9,0 (1,1)
CTLA-4 186GSG4S – Fc-(G4S)4 – BCMA 405	605	70,1	70,1 (2,1)	10,8	10,8 (1,3)
CTLA-4 186– GSG4S – Fc-(G4S)4 – BCMA 406	601	25,2	25,2 (0,8)	8,1	8,1 (1,3)
CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	610	56,9	56,9 (1,7)	10,2	10,2 (1,2)
CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 (TACI 542	612	82,6	82,6 (2,5)	9	9,0 (1,1)
186 CTLA-4-Fc	186	33,6	33,6 (1,0)	8,2	8,2 (1,0)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 381	606	9,4	9,4 (1,1)	ND	ND
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 411	607	10,9	10,9 (1,3)	ND	ND
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 405	608	5,7	5,7 (0,7)	ND	ND
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 406	602	11,9	11,9 (1,4)	ND	ND
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	611	10,3	10,3 (1,2)	ND	ND
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 (TACI 542	613	9,5	9,5 (1,1)	ND	ND
Абатацепт		8,6	8,6 (1,0)	ND	ND
CTLA-4 92 GSG4S Fc (G4S)2 BCMA 357	635	22,7	22,7 (-)	16,1	16,1 (-)

Фиг.7A и 7B предоставляют дополнительные результаты для примерных молекул. Блокада CD80 и CD86 и ингибирование CD28-опосредованной костимуляции для примерных молекул, содержащих IgD CTLA-4 дикого типа (Фиг.7A) или vIgD CTLA-4 (Фиг.7B).

В совокупности результаты показывают способность мультидоменных собранных молекул блокировать CD28-опосредованную костимуляцию аналогично или в некоторых случаях лучше, чем однодоменный ECD-Fc CTLA-4 контрольный абатацепт. В частности, собранные молекулы, содержащие vIgD CTLA-4, демонстрировали существенно улучшенную способность блокировать CD86-опосредованную костимуляцию CD28, что

согласуется с их повышенной аффинностью к CD86 по сравнению с CTLA-4 дикого типа.

Пример 10. Оценка биологической активности молекул, содержащих домен BCMA или TACI, в анализе совместной культуры первичных фолликулярных Т-хелперных клеток (Tfh) и В-клеток.

Биологическую активность WT BCMA-Fc, WT TACI-Fc, BCMA vTD-Fc или примерных мультидоменных собранных молекул, содержащих vTD BCMA или TACI с доменами IgSF CTLA-4, тестировали в анализе первичных Т- и В-клеток. Были протестированы примерные мультидоменные молекулы, описанные в Примере 7 и Таблице Е7.

Первичные клетки были получены из конуса системы удаления лейкоцитов (LRS) (Bloodworks Northwest). Конус обрабатывали и выделяли мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) с помощью центрифугирования в градиенте плотности. Общие В-клетки выделяли из PBMC с использованием набора для отрицательной селекции (StemCell Technologies, кат. № 17954) в соответствии с протоколом, предоставленным производителем. Общие CD4+ Т-клетки выделяли из целых PBMC с использованием набора для отрицательной селекции (StemCell Technologies, кат.№17952). CD4+ Т-клетки дополнительно очищали с получением Tfh посредством положительной селекции CXCR5. Гранулы CXCR5 получали с использованием набора «Do-It-Yourself» (StemCell Technologies, каталог №17699) путем связывания очищенного античеловеческого антитела CXCR5 (Biolegend) с магнитными частицами. Tfh (CXCR5+CD4+ Т-клетки) выделяли в соответствии с протоколом, предоставленным производителем. Искусственные антигенпрезентирующие клетки (aAPC) (K562/CD80) получали путем фиксации митомицином С (100 мкг/мл в конечной концентрации) в течение 30 минут при 37°С. aAPC трижды промывали RPMI, содержащей FBS, и суспендировали в среде с добавлением X-Vivo 15TM без сыворотки (X-Vivo 15™, содержащей 1X GlutaMAX, 1X пенициллин-стрептомицин) после окончательного промывания.

В-клетки высевали в 96–луночные обработанные планшеты для тканевых культур, при 5,5-7,0×10^4 клеток/лунку с рекомбинантным IL-21 (BioLegend, 80 нг/мл в конечной концентрации) в 50 мкл среды. Клетки Tfh добавляли в количестве 2,0–7,0×10^3 клеток/лунку в 50 мкл. Fc-гибридные белки, содержащие BCMA или TACI дикого типа, vTD BCMA или мультидоменные сборки CTLA-4-Fc-BCMA/TACI, титровали и добавляли по 50 мкл (в диапазоне от 100 нМ до 32 пМ) в трех экземплярах. APC добавляли в количестве 2,0–5,0×10^3 клеток на лунку с растворимым антителом против CD3 (OKT3) (BioLegend, 10 нМ конечная концентрация) в 50 мкл. Планшеты инкубировали 7 дней при

37°C с 5% CO_2.

Планшеты для совместного культивирования Tfh–B-клеток центрифугировали, а надосадочную жидкость переносили на 96-луночные полипропиленовые планшеты и замораживали при -20°C до тех пор, пока секретируемый иммуноглобулин не мог быть измерен мультиплексным анализом (система MAGPIX®, Millipore EMD). Выход и активацию клеток определяли методом проточной цитометрии с использованием двух панелей для окрашивания. Панель 1 содержала анти-CD19-BUV395, анти-CD38-BV421 (или BV785), антитела к человеческому IgG-PE (или APC), анти-CD138-APC (или PE), анти-IgD-BV605, анти-IgM-PerCP-C5.5, анти-CD3-BUV737, анти-CD27-BV510, анти-CD10-BV711 и LIVE/DEAD™ фиксируемый краситель для ближнего ИК-диапазона. Панель 2 содержала анти-CD19-BUV395, анти-ICOS-PE, анти-CD40L-BV605, анти-CD4-PerCP-Cy5.5, анти-CD86-BV711 (или анти-CD19-BV711 вместо анти-CD19-BUV395) и анти-CD28-APC, и LIVE/DEAD™ фиксируемый краситель для ближнего ИК-диапазона. Все антитела использовали в дозе 1 мкг/мл, за следующими исключениями: антитела к человеческому IgG-PE и антитела к человеческому IgG-AF647 использовали в дозе 0,25 мкг/мл. Анти-CD19-BUV395 разбавляли 1:50, а анти-CD3-BUV737 разбавляли до 1:40 в их соответствующих коктейлях для окрашивания. Клетки анализировали на проточном цитометре LSRII (BD Biosciences).

Ингибирование выхода и активации CD4+ Т-клеток, продемонстрированное отсутствием усиления регуляции CD40L и ICOS для примерных собранных белков WT, vIgD или CTLA-4 с TACI или BCMA показано на Фиг.8A (выход CD4+ Т-клеток), Фиг.8B (выход CD4+CD40L+ клеток), и Фиг.8C (выход CD4+ICOS+ клеток). В этом примере все молекулы содержали один и тот же vIgD CTLA-4. Ингибирование активности Т-клеток наблюдалось только для молекул, которые содержали домен IgSF CTLA-4, в том числе для CTLA-4-содержащих мультидоменных собранных молекул, содержащих TD TACI или BCMA. Аналогичные уровни ингибирования Т-клеток наблюдались независимо от того, использовался ли конкретный IgSF CTLA-4 в качестве отдельного домена или был включен как часть мультидоменной собранной молекулы.

Ингибирование общего выхода В-клеток и активации В-клеток, продемонстрированное отсутствием усиления регуляции CD86 для примерных белков, показано на Фиг.8D (выход CD19+ В-клеток) и Фиг.8E (активация В-клеток/повышающая регуляция CD86), соответственно. Ингибирование секреции IgM В-клетками для примерных белков показано на Фиг.8F. Ингибирование активности В-клеток наблюдалось только для мультидоменных собранных молекул, содержащих vTD TACI или vTD BCMA.

Пример 11. Оценка активности мультиспецифичных конструкций на модели иммунизации KLH in vivo.

В этом примере описывается оценка примерных протестированных мультидоменных собранных белков (описанных в Примере 7 и Таблице E7) для воздействия на иммунные ответы на гемоцианин лимфы улитки (KLH) in vivo у мышей. Мышиная модель иммунизации KLH может быть использована для оценки эффектов иммуномодулирующих молекул на антигенспецифические ответы на Т-клеточно-зависимый антиген KLH после одной или двух инъекций KLH. Две инъекции KLH, каждая с интервалом не менее 7 дней, обеспечивают модель, которая может протестировать вторичный иммунный ответ в период после 2-й инъекции. В этом примере описано исследование, в котором оценивали мультидоменные собранные молекулы по сравнению с соответствующими молярными уровнями контрольного белка Fc-изотипа и абатацепта в ответ на две инъекции KLH (на 1-й и 13-й день). Активность тестируемых препаратов, наблюдаемая на мышиной модели KLH, часто может предсказать их иммуномодулирующие эффекты у людей.

Чтобы начать исследование KLH, 10-недельных самок мышей C57/BL6NJ (Jackson Laboratories, Сакраменто, Калифорния) произвольно распределяли на 6 групп по 5 мышей в каждой и вводили тестируемые препараты, как указано в Таблице E12, путем интраперитонеальной инъекции (IP) (в 0, 6 и 12 дни). Мышам вводили 0,25 мг KLH (EMD Millipore, кат.№ 374825-25MG) путем внутривенной инъекции на 1-й и 13-й дни. Исходный коммерческий маточный раствор KLH был разбавлен в 4 раза фосфатно-буферным физиологическим раствором компании Dulbecco (DPBS). Три мыши оставались интактными/не получавшими инъекций в качестве интактного контроля (группа 7).

Таблица E12, Описание испытуемых препаратов и режим введения

Группа №	№ мыши	Испытуемый препарат	Уровень дозы	Объем дозы (мл/кг)	Режим введения (D = день испытания)	Путь введения
1	5	Fc контроль	0,1 мг	12,5	D0, 6, 12	IP
2	5	Абатацепт	0,17 мг	12,5	D0, 6, 12	IP
3	5	CTLA-4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 – BCMA 406 (SEQ ID NO:601)	0,20 мг	12,5	D0, 6, 12	IP
4	5	CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541 (SEQ ID NO:610)	0,20 мг	12,5	D0, 6, 12	IP
5	5	CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 406 (SEQ ID NO:602)	0,20 мг	12,5	D0, 6, 12	IP

Таблица E12, Описание испытуемых препаратов и режим введения						
Группа №	**№ мыши**	**Испытуемый препарат**	**Уровень дозы**	**Объем дозы (мл/кг)**	**Режим введения (D = день испытания)**	**Путь введения**
6	5	CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541 (SEQ ID NO:611)	0,20 мг	17,5	D0, 6, 12	IP
7	3	Без введения (интактные контроли)	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A = не применяется

На 19-й день всех мышей анестезировали изофлураном и собирали кровь в пробирки для разделения сыворотки. Мышей умерщвляли, удаляли их селезенку, взвешивали и помещали в DPBS на льду. Цельную кровь центрифугировали, а сыворотку удаляли и хранили при -80°C до анализа на уровни анти-KLH антител методом иммуноферментного анализа (ELISA). Селезенку обрабатывали до получения одноклеточных суспензий, эритроциты (RBC) лизировали с использованием буфера для лизиса эритроцитов (Biolegend, кат.№ 420301) в соответствии с инструкциями производителя, и клетки подсчитывали в каждом образце по жизнеспособности с использованием двойной флуоресценции, используя окрашивание акридиновым оранжевым/пропидия йодидом (AO/PI) (Nexcelom, кат.№ CS2-0106-5mL).

Затем каждый образец селезенки окрашивали для анализа проточной цитометрией для определения субпопуляций иммунных клеток, используя следующий метод: 1×10^6 живых клеток помещали в лунку из двух 96-луночных пластин (Corning, кат.№ 3797; один планшет для панели, специфичной для B-клеток, и один планшет для панели, специфичной для T-клеток), центрифугировали при 1500×g в течение 10 секунд, надосадочную жидкость удаляли, а клеточный осадок дважды промывали DPBS. Осадок ресуспендировали в 100 мкл красителя для анализа жизнеспособности (LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit, Life Technologies Corp., разведение 1:1000 в DPBS) и инкубировали в течение 10 мин в темноте при комнатной температуре. После двух промываний буфером для проточной цитометрии (175 мкл каждое) осадок опухоли ресуспендировали в Mouse BD Fc Block (разбавленном 1:50 буфером для проточной цитометрии) и инкубировали в темноте в течение еще 5 минут при RT. Без каких-либо дополнительных промываний в каждую лунку клеток для B- или T-клеточных панелей добавляли 50 мкл коктейля из следующих антител для проточной цитометрии (разведенных в буфере для проточной цитометрии). Для панели B-клеток для коктейля были объединены следующие антитела: антитело против мышиного CD19 BUV395 CD19

BUV395 (клон 1D3, Becton-Dickinson; 1:100), антитело против мышиного CD138 BV421 (клон 281-2, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело против мышиного CD3ε BV510 (клон 17A2, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело против мышиного IgD BV605 (клон 11-26c.2a, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело против мышиного B220 BV785 (клон RA3-6B2, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело против мышиного CD95 FITC (клон SA367H8, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело против мышиного CD23 PerCP Cy5.5 (клон B3B4, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело против мышиного GL7 PE (клон GL7, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело против мышиного Gr1 PE Cy7 (клон RB6-8C5, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело против мышиного CD21 APC (клон 7E9, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), и антитело против мышиного IgM APC Cy7 (клон RMM-1, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация). Для панели Т-клеток для коктейля были объединены следующие антитела: антитело против мышиного PD-1 BV421 (клон 29F.1A12, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело против мышиного CD11b BV510 (клон M1/70, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело против мышиного CD3ε BV605 (клон 145-2C11, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело против мышиного CD8 BV785 (клон 53-6.7, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело против мышиного CD44 FITC (клон IM7, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело против мышиного CD4 PerCP Cy5.5 (клон GK1.5, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело против мышиного CD62L PE (клон MEL-14, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело против мышиного CXCR5 PE Dazzle (клон L138D7, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело против мышиного CD25 PE Cy7 (клон PC61.5, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), и антитело против мышиного CD45 AF700 (клон 30-F11, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация). Клетки инкубировали с одним из коктейлей антител в темноте, на льду, при осторожном перемешивании в течение 45 мин, после чего дважды промывали буфером для проточной цитометрии (175 мкл на промывание). Осадки клеток ресуспендировали в буфере для проточной цитометрии объемом 200 мкл и собирали на проточном цитометре LSRII. Данные были проанализированы с использованием программного обеспечения FlowJo версии 10.2 (FlowJo LLC, США) и построены в виде графиков с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (версия 8.1.2). Анализ идентификации ключевых клеточных субпопуляций включал: общее количество B-клеток (B220+ клеток), B-клетки маргинальной зоны (MZ) (B220+, CD19+, CD23-, CD21high, IgMhigh клетки), B-клетки зародышевого центра (GC) (B220+, CD19+, GL7+, CD95+ клетки), T-

фолликулярные хелперные клетки (Tfh) (CD45+, CD3+, CD4+, PD1+, CD185+ клетки), CD4+ Т-эффекторные клетки памяти (T_{em}) (CD45+, CD3+, CD4+, CD44+, CD62L-клетки) и CD8+ T_{em}-клетки (CD45+, CD3+, CD8+, CD44+, CD62L- клетки).

Статистически значимые различия ($p<0,05$) между группами для всех анализов определяли с помощью одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) или непарного t-критерия Стьюдента с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (версия 8.1.2).

Чтобы определить степень, в которой мультидоменные собранные молекулы ингибировали иммунные ответы, опосредованные KLH-антителами, по сравнению с контролем Fc-изотипа (SEQ ID NO:589), образцы сыворотки оценивали на концентрацию антител против KLH с помощью одного из двух анализов ELISA. Анализы ELISA измеряли уровни IgM- или IgG1-специфических анти-KLH антител в сыворотке и использовали анализы, в которых образцы мышиной сыворотки при многочисленных разведениях инкубировали в планшетах, покрытых KLH, с последующим промыванием и определением с использованием 1:2000 козьего анти-мышиного IgG1:HRP или 1:5000 козьего анти-мышиного IgM: HRP. Проявление цвета было достигнута с использованием набора с субстратом TMB (SeraCare) и планшетов для ELISA, с проведением анализа на ридере планшетов (ридер микропланшетов EMax® Plus, Molecular Devices LLC). Стандартной кривой для анализа не существовало, поэтому для сравнения уровней антител против KLH использовали оптическую плотность (ОП); чем выше ОП, тем больше уровни антител против KLH в образце сыворотки. Данные по уровням ОП анти-KLH IgM представлены на Фиг.9, а статистический анализ с помощью одностороннего ANOVA и теста множественного сравнения Тьюки представлены в Таблице E13; уровни ОП анти-KLH IgG1 представлены на Фиг.10, а статистический анализ с помощью одностороннего ANOVA и теста множественного сравнения Тьюки представлены в Таблице E14A. Результаты демонстрируют, что каждая из протестированных мультидоменных собранных молекул была способна значительно снизить уровни анти-KLH IgM в сыворотке по сравнению с контрольной обработкой Fc, при этом CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541 (SEQ ID NO:610) продемонстрировал наибольшее снижение среди всех тестируемых препаратов. Лечение Абатацептом не оказывало влияния на уровни анти-KLH IgM в сыворотке крови по сравнению с контрольным лечением Fc. Каждая из протестированных мультидоменных собранных молекул также смогла значительно снизить уровни анти-KLH IgG1 по сравнению с контролем Fc, при этом CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541 (SEQ ID NO:610) снова продемонстрировал наибольшее снижение. Абатацепт также был способен значительно снижать уровни анти-

KLH IgG1 в сыворотке крови, но примерные мультидоменные собранные молекулы были столь же эффективны или вызывали более резкое снижение, чем абатацепт (Фиг.10). Эти результаты указывают на то, что эти мультидоменные собранные молекулы эффективны в снижении Т-клеточно-зависимых иммунных ответов антител, и обладают одинаковой или лучшей эффективностью, чем абатацепт, коммерчески доступный и одобренный препарат для лечения многих аутоиммунных и воспалительных заболеваний.

Таблица E13. Статистический анализ уровней ОП анти-KLH IgM	
Сравнение	**p-значение**
Fc контроль против CTLA-4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 BCMA 406	<0,05
Fc контроль против CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	=0,0001
Fc контроль против CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	<0,01
Fc контроль против интактных	<0,001
CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541 против CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 406	<0,0001
CTLA-4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 BCMA 406 против CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 406	=0,0115
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 406 против CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	=0,0035
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 406 против интактных	<0,001

Таблица E14A. Статистический анализ уровней ОП анти-KLH IgG1	
Сравнение	**p-значение**
Fc контроль против абатацепта	=0,0024
Fc контроль против CTLA-4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 BCMA 406	=0,0044
Fc контроль против CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	=0,0006
Fc контроль против CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	=0,0017
Fc контроль против интактных	=0,0032

Как показано на Фиг.11, мыши, получавшие CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541 (SEQ ID NO:610), имели значительно меньшую селезенку в конце исследования (день 19) по сравнению с контрольными мышами, получавшими Fc ($p<0,001$ по t-тесту), как и мыши, получавшие CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541 (SEQ ID NO:611) по сравнению с мышами, получавшими Fc1.1 ($p = 0,01$ по t-тесту). Мыши, получавшие мультидоменную собранную молекулу CTLA-4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 – BCMA 406 (SEQ ID NO:601), имели тенденцию к уменьшению селезенки по сравнению с мышами, получавшими Fc1.1, но разница была не совсем статистически значимой ($p = 0,087$ по t-тесту). Не было никаких различий между мышами, получавшими контрольный изотип Fc, и интактными мышами или мышами, получавшими абатацепт или CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 406 (SEQ ID NO:602, содержавший тот же vTD BCMA, что и

мультидоменная собранная молекула в SEQ ID NO:601), но IgD WT CTLA-4 вместо vIgD. Меньшие размеры селезенки указывают на уменьшение количества лимфоцитов, которые могут оказывать иммуномодулирующее действие на патогенез аутоиммунных и воспалительных заболеваний, связанных с повышенными иммунными реакциями, особенно теми, которые вызываются B- и/или T-клетками. Статистический анализ массы селезенки показан в Таблице E14B.

Таблица E14B. Статистический анализ массы селезенки	
Масса селезенки	**p-значение**
Fc контроль против CTLA4 186 GSG4S Fc1,1 (G4S)4 TACI 541	0,0040
Абатацепт против CTLA4 186– GSG4S – Fc1,1- (G4S)4 – BCMA 406	0,0025
Абатацепт против CTLA4 186 GSG4S Fc1,1 (G4S)4 TACI 541	<0,0001
Абатацепт против CTLA4 WT ECD 1 GSG4S Fc1,1 (G4S)4 TACI 541	0,0021

В соответствии с этим особое значение для патогенеза аутоиммунных и воспалительных заболеваний имеют типы клеток, которые способствуют выживанию и дифференцировке B-клеток, выработке антител и эффекторной памяти T-клеток. Эти типы клеток включают, без ограничения указанными, следующие: B-клетки, B-клетки маргинальной зоны (MZ), B-клетки зародышевого центра (GC), T-фолликулярные хелперные клетки (Tfh) и CD4+ и CD8+ T-эффекторные клетки памяти (T_{em}). Ожидается, что терапевтические средства, механизмы действия которых включают уменьшение количества этих типов клеток, будут эффективными при лечении многочисленных аутоиммунных и воспалительных заболеваний. Как показано на Фиг.12A-12H, некоторые протестированные мультидоменные собранные молекулы были способны снижать в селезенке процент и количество B-клеток, MZ B-клеток, GC B-клеток и Tfh по сравнению с контролем изотипа Fc (SEQ ID NO:589), при этом CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541 (SEQ ID NO:610) является наиболее мощным из вариантов, за которым следует CTLA-4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 – BCMA 406 (SEQ ID NO:601), а затем CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541 (SEQ ID NO:611), содержащий IgD WT CTLA-4 и vTD TACI. Эти мультидоменные собранные молекулы были столь же эффективны или лучше, чем абатацепт, в их способности уменьшать процент или количество этих популяций, которые важны для выживания и дифференцировки B-клеток и выработки антител. Статистический анализ примерных мультидоменных собранных молекул по сравнению с контролем Fc или абатацептом показан в Таблице E15.

Таблица E15. Статистический анализ	
Сравнение	***p*-значение**
B220+ клетки в виде % от живых клеток	
Fc контроль против CTLA-4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 BCMA 406	<0,0001
Fc контроль против CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	<0,0001
Fc контроль против CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 406	0,0344
Fc контроль против CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	<0,0001
Абатацепт против CTLA-4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 BCMA 406	<0,0001
Абатацепт против CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	<0,0001
Абатацепт против CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0,0002
B-клетки маргинальной зоны (MZ) в виде % от B-клеток	
Fc контроль против CTLA-4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 BCMA 406	0,0082
Fc контроль против CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	<0,0001
Fc контроль против CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0,0007
Абатацепт против CTLA-4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 BCMA 406	0,0001
Абатацепт против CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	<0,0001
Абатацепт против CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	<0,0001
B-клетки зародышевого центра в виде % от живых B-клеток	
Fc контроль против Абатацепта	0,0065
Fc контроль против CTLA-4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 BCMA 406	0,0085
Fc контроль против CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0,0016
Fc контроль против CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0,0663
Абатацепт против CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 406	0,0006
CD4+ фолликулярные T-хелперные клетки (Tfh) в виде % от CD4+ клеток	
Fc контроль против Абатацепт	0,0341
Fc контроль против CTLA-4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 BCMA 406	0,0005
Fc контроль против CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	<0,0001
Fc контроль против CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0,0018
Абатацепт против CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0,0065
B220+ клетки на селезенку ($\times 10^6$)	
Fc контроль против Абатацепта	0,0092
Fc контроль против CTLA-4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 BCMA 406	0,022
Fc контроль против CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0,0028
Fc контроль против интактных	0,0162
Абатацепт против CTLA-4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 BCMA 406	<0,0001
Абатацепт против CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	<0,0001
Абатацепт против CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0,0001
Клетки маргинальной зоны (MZ) на селезенку ($\times 10^6$)	
Fc контроль против Абатацепта	0,0009
Fc контроль против CTLA-4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 BCMA 406	0,0312
Fc контроль против CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0,0028
Fc контроль против CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0,0385

Таблица E15. Статистический анализ	
Сравнение	***p*-значение**
Fc контроль против интактных	0,0044
Абатацепт против CTLA-4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 BCMA 406	<0,0001
Абатацепт против CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	<0,0001
Абатацепт против CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 406	0,0057
Абатацепт против CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	<0,0001
B-клетки зародышевого центра (GC) на селезенку ($\times 10^6$)	
Fc контроль против CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0,0246
Абатацепт против CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 406	0,0161
CD4+ фолликулярные Т-хелперные клетки (Tfh) на селезенку ($\times 10^6$)	
Fc контроль против CTLA-4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 BCMA 406	0,0376
Fc контроль против CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0,0083
Абатацепт против CTLA-4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 BCMA 406	0,0268
Абатацепт против CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0,0057

Как показано на Фиг.13A-13D, мультидоменные собранные молекулы, содержащие vIgD CTLA-4 и vTD TACI или BCMA, были способны снижать процент и количество в селезенке CD4+ и CD8+ Tem-клеток по сравнению с контролем изотипа Fc и абатацептом. Таким образом, эти результаты показывают, что примерные протестированные мультидоменные собранные молекулы были по меньшей мере столь же эффективны, а часто и более эффективны, чем абатацепт, в их способности уменьшать процент или количество этих важных эффекторных популяций памяти в селезенке. Статистический анализ примерных мультидоменных собранных молекул по сравнению с контролем Fc или абатацептом показан в Таблице E16.

Таблица E16. Статистический анализ	
Сравнение	***p*-значение**
CD4+ Tem клетки в виде % от CD4+ Т-клеток	
Fc контроль против CTLA-4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 BCMA 406	0,0035
Fc контроль против CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	<0,0001
Абатацепт против CTLA-4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 BCMA 406	0,0392
Абатацепт против CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0,0004
CD8+ Tem клетки в виде % of CD8+ Т-клеток	
Fc контроль против CTLA-4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 BCMA 406	0,0393
Fc контроль против CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0,0042
Fc контроль против интактных	0,0072
Абатацепт против CTLA-4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 BCMA 406	0,0348
Абатацепт против CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0,0037
Абатацепт против интактных	0,0064
CD4+ Tem клетки на селезенку ($\times 10^6$)	
Fc контроль против CTLA-4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 BCMA 406	0,0771

Таблица E16. Статистический анализ	
Сравнение	***p*-значение**
Fc контроль против CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0,0172
Абатацепт против CTLA-4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 BCMA 406	0,0038
Абатацепт против CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0,0006
CD8+ Tem клетки на селезенку ($\times 10^6$)	
Fc контроль против Абатацепта	0,0135
Fc контроль против CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0,0866
Абатацепт против CTLA-4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 BCMA 406	0,0002
Абатацепт против CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0,0002
Абатацепт против интактных	0,0028

В совокупности эти результаты указывают на то, что многодоменные собранные молекулы, которые ингибируют как активность Т-клеток, так и активность В-клеток, могут снижать иммунные ответы и изменения клеточных популяций, опосредованные Т-клеточно-зависимым антигеном KLH in vivo (т.е. уровни анти-KLH в сыворотке и изменения в субпопуляциях иммунных клеток). Эти результаты согласуются с использованием мультидоменных собранных белков CTLA-4 и BCMA/TACI в качестве эффективных терапевтических средств при лечении аутоиммунных и воспалительных заболеваний, в которых гиперактивные лимфоциты играют определенную роль.

Пример 12. Оценка активности мультиспецифических конструкций на модели волчанки у мышей in vivo.

В этом примере описывается оценка образцовых молекул vIgD-Fc CTLA-4 и примерной мультидоменной собранной молекулы, содержащей vTD TACI с доменами vIgD CTLA-4 (описанными в Примере 7 и Таблице E7), для воздействия на иммунные ответы на модели спонтанной волчанки у мышей in vivo (NZB/NZW)F1. У мышей (NZBxNZW)F1 спонтанно развивается аутоиммунное заболевание, очень похожее на СКВ человека, и они считаются одной из лучших мышиных моделей этого заболевания. У мышей (NZB/NZW)F1 отмечены высокие циркулирующие концентрации антител к дцДНК, начиная примерно с 20-недельного возраста, при этом первые клинические признаки заболевания обнаруживаются примерно в 23-недельном возрасте. У мышей развивается гемолитическая анемия, протеинурия и прогрессирующий гломерулонефрит, опосредованный отложением иммунных комплексов в базальной мембране клубочков.

Мышам (NZB/NZW)F1 дважды в неделю вводили интраперитонеально инъекцию (IP) с контролем Fc в дозе 14 мг/кг или подобранными по молярному соотношению количествами vIgD-Fc CTLA-4 (186 CTLA-4-Fc) (21 мг/кг), или примерную мультидоменную собранную Fc-гибридную молекулу, содержащую vTD TACI и vIgD

CTLA-4 (‘vTDCTLA-4-Fc-vTDTACI’) (CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541) (25 мг/кг). Лечение начинали при распределении по группам (22-я неделя возраста) и продолжали до конца исследования. Исследование заканчивали, когда мыши достигали возраста 43 недели, хотя некоторые животные были подвергнуты эвтаназии ранее в ходе исследования, когда они агонизировали.

В различные моменты времени в возрасте от 20 до 40 недель были собраны образцы мочи и сыворотки. Начиная с 20-недельного возраста мышей, концентрацию белка в моче у всех исследуемых мышей еженедельно определяли с помощью тест-полосок для анализа мочи (Roche Chemstrip 2 GP, кат.№ 11895397160). Средние показатели протеинурии с течением времени в каждой опытной группе представлены на Фиг.14A, а среднее процентное изменение массы тела (потеря массы тела, связанная с прогрессированием заболевания) в каждой группе представлено на Фиг.14B. Процент выживаемости мышей в каждой опытной группе показан на Фиг.14C. Титры антител к двухцепочечной (дц) ДНК IgG в сыворотке крови были измерены компанией Hooke Laboratories, Inc. (Лоуренс, Массачусетс) с использованием собственного набора, и результаты представлены на Фиг.14D. Уровни азота мочевины в крови (BUN) повышаются у этих мышей по мере прогрессирования заболевания. Уровни BUN по окончании исследования (или при умерщвлении мышей, которые умерли рано) для каждой группы лечения показаны на Фиг.14E. Статистический анализ проводили с использованием некорректированного критерия Данна, ** обозначает p=0,0047, а p=0,0065; *** обозначает p=0,0004).

Почки отбирали у каждой мыши после эвтаназии и анализировали гистологически в повторяющихся срезах, окрашенных Шифф-йодной кислотой (PAS), используя критерии, описанные в Alperovich G et al, 2007. Lupus 16:18-24. Все срезы почек были проанализированы вслепую патологоанатомом, не знающим о методах лечения и клинических показателях. Клубочковые поражения (мезангиальное расширение, эндокапиллярная пролиферация, клубочковые отложения и экстракапиллярная пролиферация) и тубулярные/интерстициальные поражения (интерстициальные инфильтраты, атрофия канальцев и интерстициальный фиброз) были проанализированы и оценены полуколичественно с использованием системы баллов от 0 до 3, где 0 = без изменений, 1 = слабые изменения, 2 = умеренные изменения и 3 = серьезные изменения. Общий гистологический балл для каждой мыши рассчитывали как сумму индивидуальных баллов (максимальный общий балл равен 21). Показатели почек для общего поражения клубочков, общего поражения канальцев и интерстициальных образований и общего поражения почек показаны на Фиг.14F; по сравнению с

контрольными мышами, получавшими Fc, существенное улучшение гистопатологии почек наблюдалось у животных, получавших vIgD CTLA-4-Fc ($p=0,0068$ по сравнению с Fc группой, по общему поражению почек) или vIgD CTLA-4-Fc-vTD TACI ($p<0,0001$ по сравнению с Fc группой).

Для Фиг.14G-14H правую почку отбирали у каждой мыши по окончании исследования, взвешивали, готовили поперечные срезы и замораживали в одном блоке со средой с оптимальной температурой для получения срезов (OCT) перед разделением и иммуногистохимическим (IHC) окрашиванием мышиного IgG и мышиного комплемента C3 для оценки гломерулярных отложений IgG и C3, соответственно. Срезы почек пропитывали ацетоном и окрашивали FITC-конъюгированным крысиным моноклональным антителом к мышиному фрагменту комплемента C3 (Cedarlane), разведенным 1:25 в разбавителе первичных антител (Leica Biosystems), или AF594-конъюгированным козьим антителом к мышиному IgG (Thermo Fisher Scientific), разведенным 1:200 в разбавителе первичных антител. Гломерулярные отложения IgG и C3 были проанализированы патологом с использованием полуколичественной системы оценки от 0 до 4, где 0 = отсутствие отложений, 1 = умеренное мезангиальное отложение, 2 = выраженное мезангиальное отложение, 3 = мезангиальное и незначительное капиллярное отложение и 4 = интенсивное мезангиальное и мезангиокапиллярное отложение, на основе методики, описанной в Kelkka et al. (2014) Antioxid Redox Signal. 21:2231-45. По сравнению с контрольными мышами, получавшими Fc, значительно уменьшенное гломерулярное отложение IgG и C3 отмечено у животных, получавших 186 CTLA-4 vIgD-Fc ($p=0,0084$ против Fc контрольной группы для отложений IgG, и $p=0,0007$ для отложений C3), или CTLA-4 186 – GSG4S – Fc(G4S)4 – TACI 541 ($p<0,0001$ по сравнению с контрольной группой Fc для IgG и $p=0,0053$ для C3); данные были проанализированы на статистически значимые различия с использованием непараметрического теста Краскела-Уоллиса с последующим применением нескорректированного критерия множественного сравнения Данна.

Результаты демонстрируют, что каждый из vIgD CTLA-4 по отдельности или мультидоменного иммуномодулирующего Fc-белка, содержащего vIgD CTLA-4 и vTD TACI, был способен значительно подавлять протеинурию, сохранять массу тела, повышать общую выживаемость, снижать аутоантитела к дцДНК и BUN, уменьшать отложения IgG и C3 в почках, и предотвращать или облегчать заболевание почек на мышиной модели СКВ (NZB/NZW)F1. Примерные молекулы также были способны эффективно уменьшать субпопуляции B- и T-клеток, включая плазматические клетки, фолликулярные T-хелперные клетки, клетки зародышевого центра и T-клетки памяти в

селезенке и лимфатических узлах этих мышей (данные не показаны).

Пример 13: Сравнительная оценка мультиспецифичных конструкций на модели иммунизации KLH in vivo.

В этом примере описывается оценка влияния примерных протестированных однодоменных Fc-гибридных белков и одного мультидоменного собранного белка (описанного в Примере 6, Примере 7 и Таблице E7) на иммунные ответы на гемоцианин лимфы улитки (KLH) in vivo у мышей. Мышиная модель иммунизации KLH может быть использована для оценки влияния иммуномодулирующих молекул на антигенспецифические ответы на Т-клеточно-зависимый антиген KLH после одной или двух инъекций KLH. Две инъекции KLH, каждая с интервалом не менее 7 дней, обеспечивают модель, которая позволяет оценить как первичный иммунный ответ после 1-й инъекции KLH, так и вторичный иммунный ответ в период после 2-й инъекции. Этот пример описывает исследование, в котором оценивали активность множества молекул, содержащих один домен BCMA, таких как растворимые молекулы дикого типа (WT) или вариантные vTD BCMA, отформатированные в виде Fc-гибридов, а также мультидоменной собранной молекулы CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541, в ответ на две инъекции KLH без адъюванта (на 0-й и 12-й день исследования). Эти испытуемые препараты сравнивали с введением молярно подобранных уровней белка изотипического контроля Fc или абатацепта (CTLA-4-Fc дикого типа). Активность тестируемых препаратов, наблюдаемая на мышиной модели KLH, часто может предсказать их иммуномодулирующие эффекты у людей.

Чтобы начать исследование KLH, 10-недельных самок мышей C57/BL6NJ (The Jackson Laboratories, Сакраменто, Калифорния) произвольно распределяли в 12 групп по 5 мышей в каждой. Мышам вводили 0,25 мг KLH (EMD Millipore, кат.№ 374825, 25 мг) путем интраперитонеальной инъекции (IP) на 0 и 12 дни; исходный коммерческий раствор KLH разбавляли до соответствующей концентрации физиологическим раствором с фосфатным буфером Dulbecco (DPBS) перед инъекцией. Мышам вводили тестируемые препараты, как описано в Таблице E17, путем инъекции IP (вводили в 4 и 11 дни). Шесть мышей оставались интактными/не получавшими инъекций в качестве интактного контроля (группа 13). Сыворотку собирали на 5-й день (через 24 часа после 1-й дозы), 12-й день (через 24 часа после 2-й дозы/до бустерной иммунизации KLH) и 20-й день для оценки воздействия препарата, ADA и/или уровней антител против KLH. Одно животное в группе 10 получило неполную дозу тестируемого препарата и поэтому было исключено из исследования.

Таблица E17. Описание испытуемых препаратов и режим введения						
№ группы	**№ мыши**	**Испытуемый препарат (препараты)**	**Уровень дозы (мг/дозу)**	**(мг/кг)**	**Режим введения дозы (D = день исследования)**	**Путь введения**
1	5	Fc контроль	0,225	11,3	D4 и D11	IP
2	5	Абатацепт (WT hCTLA-4-Fc)	0,342	17,1	D4 и D11	IP
3	5	186 CTLA-4 vIgD-Fc	0,346	17,3	D4 и D11	IP
4	5	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	0,400	20	D4 и D11	IP
5	5	TACI 30-110 – Fc	0,306	15,3	D4 и D11	IP
6	5	TACI 13-118 – Fc	0,327	16,4	D4 и D11	IP
10	4	406 BCMA -Fc	0,278	13,9	D4 и D11	IP
11	5	381 BCMA -Fc	0,278	13,9	D4 и D11	IP
12	5	411 BCMA -Fc	0,279	13,9	D4 и D11	IP
13	6	Нет (интактные)	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A = не применяется

На 20-й день всех мышей анестезировали изофлураном и собирали кровь в пробирки для отделения сыворотки. Мышей умерщвляли, удаляли их селезенку, взвешивали и помещали в DPBS на льду. Цельную кровь центрифугировали, а сыворотку извлекали и хранили при -80°C до испытания на уровни анти-KLH методом иммуноферментного анализа (ELISA). Селезенку обрабатывали до получения суспензий отдельных клеток, эритроциты (RBC) лизировали с использованием буфера для лизиса эритроцитов (Biolegend, кат.№ 420301) в соответствии с инструкциями производителя, и клетки подсчитывали в каждом образце с использованием двойной флуоресцентной оценки жизнеспособности, используя окрашивание акридиновым оранжевым/пропидия йодидом (AO/PI) (Nexcelom, кат.№ CS2-0106 – 5 мл).

Затем каждый образец селезенки окрашивали для анализа с помощью проточной цитометрии субпопуляций иммунных клеток, используя следующий метод: 1×10^6 живых клеток помещали в лунку из двух 96-луночных планшетов (Corning, кат.№ 3797; один планшет для панели, специфичной для B-клеток, и один для панели, специфичной для T-клеток), центрифугировали при 1500×g в течение 10 секунд, надосадочную жидкость удаляли, а клеточный осадок дважды промывали DPBS. Осадок ресуспендировали в 100 мкл красителя для оценки жизнеспособности (LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit, Life Technologies Corp., разведение 1:1000 в DPBS) и инкубировали в течение 10 мин в темноте при комнатной температуре. После двух промываний буфером для проточной

цитометрии (175 мкл каждое) клеточные осадки ресуспендировали в Mouse BD Fc Block (разбавленном 1:50 буфером для проточной цитометрии) и инкубировали в темноте в течение дополнительных 5 минут при RT. Без каких-либо дополнительных промываний в каждую лунку клеток для B- или T-клеточных панелей добавляли 50 мкл коктейля из следующих антител для проточной цитометрии (разведенных в буфере для проточной цитометрии). Для панели B-клеток для коктейля были объединены следующие антитела: антитело к мышиному CD19 BUV395 (клон 1D3, Becton-Dickinson; 1:100), антитело к мышиному CD138 BV421 (клон 281-2, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело к мышиному CD3e BV510 (клон 17A2, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело к мышиному IgD BV605 (клон 11-26c.2a, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело к мышиному B220 BV785 (клон RA3-6B2, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело к мышиному CD95 FITC (клон SA367H8, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело к мышиному CD23 PerCP Cy5.5 (клон B3B4, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело к мышиному GL7 PE (клон GL7, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело к мышиному Gr1 PE Cy7 (клон RB6-8C5, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело к мышиному CD21 APC (клон 7E9, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация) и антитело к мышиному IgM APC Cy7 (клон RMM-1, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация). Для панели T-клеток для коктейля были объединены следующие антитела: антитело к мышиному PD-1 BV421 (клон 29F.1A12, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело к мышиному CD11b BV510 (клон M1/70, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело к мышиному CD3e BV605 (клон 145-2C11, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело к мышиному CD8 BV785 (клон 53-6.7, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело к мышиному CD44 FITC (клон IM7, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело к мышиному CD4 PerCP Cy5.5 (клон GK1.5, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело к мышиному CD62L PE (клон MEL-14, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело к мышиному CXCR5 PE Dazzle (клон L138D7, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело к мышиному CD25 PE Cy7 (клон PC61.5, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация) и антитело к мышиному CD45 AF700 (клон 30-F11, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация). Клетки инкубировали с одним из коктейлей антител в темноте, на льду, при осторожном перемешивании в течение 45 мин, после чего дважды промывали буфером для проточной цитометрии (175 мкл на промывание). Осадки клеток ресуспендировали в буфере для проточной цитометрии объемом 200 мкл и собирали на проточном цитометре LSRII. Данные были проанализированы с использованием

программного обеспечения FlowJo версии 10.2 (FlowJo LLC, США) и построены в виде графика с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (версия 8.1.2). Анализ идентификации ключевых клеточных субпопуляций включал: общее количество B-клеток (B220+ клеток), B-клетки маргинальной зоны (MZ) (B220+, CD19+, CD23-, $CD21^{high}$, IgM^{high} клетки), B-клетки зародышевого центра (GC) (B220+, CD19+, GL7+, CD95+ клетки), фолликулярные T-хелперные клетки (Tfh) (CD45+, CD3+, CD4+, PD-1+, CD185+ клетки), CD4+ T-эффекторные клетки памяти (Tem) (CD45+, CD3+, CD4+, CD44+, CD62L-клетки) и CD8+ T_{em}-клетки (CD45+, CD3+, CD8+, CD44+, CD62L- клетки).

Статистически значимые различия ($p<0,05$) между группами определяли с помощью одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) и теста множественного сравнения с наименьшей значимой разницей Фишера (LSD) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (версия 8.1.2).

Чтобы определить степень, в которой испытуемые препараты ингибировали иммунные реакции, опосредованные KLH-антителами, по сравнению с изотипическим контролем Fc (SEQ ID NO:589), образцы сыворотки оценивали на концентрацию антител против KLH в двух анализах ELISA. Анализы ELISA измеряли уровни IgM- или IgG1-специфического анти-KLH в сыворотке крови. Образцы мышиной сыворотки при многочисленных разведениях инкубировали в планшетах, покрытых KLH, с последующим промыванием и определением с использованием 1:2000 козьего анти-мышиного IgG1:HRP или 1:5000 козьего анти-мышиного IgM:HRP. Проявление цвета было достигнуто с использованием набора с субстратом TMB (SeraCare) и планшетов для ELISA, проанализированных на ридере планшетов (SpectraMax® iD3 Microplate Reader, Molecular Devices LLC). Стандартной кривой для анализа не существовало, поэтому для сравнения уровней антител против KLH использовали оптическую плотность (ОП); чем выше ОП, тем больше уровни антител против KLH в образце сыворотки. Для уровней ОП анти-KLH IgM данные представлены на Фиг.18A (первичный ответ), Фиг.18B (вторичный ответ), а статистический анализ с помощью однофакторного ANOVA и некорректированного теста множественного сравнения LSD Фишера представлены в Таблице E18 и Таблице E19, соответственно. Уровни ОП анти-KLH IgG1 представлены на Фиг.18C (первичный ответ), Фиг.18D (вторичный ответ), а статистический анализ с помощью однофакторного ANOVA и некорректированного теста множественного сравнения LSD Фишера представлен в Таблицах E18-E21. Результаты демонстрируют, что каждый из тестируемых препаратов был способен значительно снизить уровни анти-KLH IgM в сыворотке во время первичного иммунного ответа по сравнению с контрольным лечением Fc, при этом CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541 (SEQ ID NO:610)

продемонстрировал наибольшее снижение среди всех тестируемых препаратов, а лечение абатацептом давало самый скромный эффект (Фиг.18A). Для вторичного ответа на 20-й день, измеренного через 9 дней после 2-й и последней дозы тестируемого препарата, все тестируемые препараты, за исключением TACI 13-118-Fc и 406 BCMA-Fc, индуцировали значительное снижение уровней анти-KLH IgM, с CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541 (SEQ ID NO:610), демонстрирующий наибольшее снижение (Фиг.18B). Каждый из испытуемых препаратов также был способен значительно снизить уровни анти-KLH IgG1 во время первичного иммунного ответа по сравнению с контролем Fc, при этом CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541 (SEQ ID NO:610) снова продемонстрировал наибольшее снижение (Фиг.18C). Что касается вторичного ответа на KLH, то все тестируемые препараты, за исключением TACI 30-110-Fc, TACI 13-118-Fc и 411 BCMA-Fc, значительно снижали уровни анти-KLH IgG1 (Фиг.18D). Эти результаты указывают на то, что большинство молекул, содержащих vTD BCMA, были эффективны при снижении Т-клеточно-зависимого иммунного ответа антител к KLH, при этом CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541 (SEQ ID NO:610) и 381 BMCA-Fc проявляли наиболее значительные эффекты на этой мышиной модели иммунизации.

Таблица E18. Статистический анализ уровней ОП анти-KLH IgM (первичный ответ; Фиг.18A)

Сравнение	**p-значение**	**Значимость**
Fc Контроль против абатацепта	0,0167	Да
Fc Контроль против 186 CTLA-4 vIgD-Fc	<0,0001	Да
Fc Контроль против CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	<0,0001	Да
Fc Контроль против TACI 30-110 – Fc	<0,0001	Да
Fc Контроль против TACI 13-118 – Fc	<0,0001	Да
Fc Контроль против 406 BCMA -Fc	<0,0001	Да
Fc Контроль против 381 BCMA -Fc	<0,0001	Да
Fc Контроль против 411 BCMA -Fc	<0,0001	Да
Fc Контроль против интактных	<0,0001	Да

Таблица E19. Статистический анализ уровней ОП анти-KLH IgM (вторичный ответ; Фиг.18B)

Сравнение	**p-значение**	**Значимость**
Fc Контроль против абатацепта	<0,0001	Да
Fc Контроль против 186 CTLA-4 vIgD-Fc	<0,0001	Да
Fc Контроль против CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	<0,0001	Да
Fc Контроль против TACI 30-110 – Fc	0,0283	Да
Fc Контроль против TACI 13-118 – Fc	0,4653	No
Fc Контроль против 406 BCMA -Fc	0,0971	No

Таблица E19. Статистический анализ уровней ОП анти-KLH IgM (вторичный ответ; Фиг.18B)		
Сравнение	**p-значение**	**Значимость**
Fc Контроль против 381 BCMA -Fc	0,0032	Да
Fc Контроль против 411 BCMA -Fc	0,0218	Да
Fc Контроль против интактных	<0,0001	Да

Таблица E20. Статистический анализ уровней ОП анти-KLH IgG1 (первичный ответ; Фиг.18C)		
Сравнение	**p-значение**	**Значимость**
Fc Контроль против абатацепта	0,0457	Да
Fc Контроль против 186 CTLA-4 vIgD-Fc	0,0057	Да
Fc Контроль против CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	<0,0001	Да
Fc Контроль против TACI 30-110 – Fc	0,0218	Да
Fc Контроль против TACI 13-118 – Fc	0,0093	Да
Fc Контроль против 406 BCMA -Fc	0,0039	Да
Fc Контроль против 381 BCMA -Fc	0,0006	Да
Fc Контроль против 411 BCMA -Fc	0,0002	Да
Fc Контроль против интактных	<0,0001	Да

Таблица E21. Статистический анализ уровней ОП анти-KLH IgG1 (вторичный ответ; Фиг.18D)		
Сравнение	**p-значение**	**Значимость**
Fc Контроль против абатацепта	<0,0001	Да
Fc Контроль против 186 CTLA-4 vIgD-Fc	<0,0001	Да
Fc Контроль против CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	<0,0001	Да
Fc Контроль против TACI 30-110 – Fc	0,5367	Нет
Fc Контроль против TACI 13-118 – Fc	0,1477	Нет
Fc Контроль против 406 BCMA -Fc	0,0397	Да
Fc Контроль против 381 BCMA -Fc	0,0286	Да
Fc Контроль против 411 BCMA -Fc	0,8374	Нет
Fc Контроль против интактных	<0,0001	Да

Как показано на Фиг.19A и 19B, мыши, получавшие все тестируемые препараты, кроме TACI 30-110-Fc или TACI 13-118-Fc, имели значительно меньшие селезенки, оцениваемые по массе и количеству клеток, соответственно, в конце исследования (день 20) по сравнению с контрольными мышами, получавшими Fc (Таблица E22), а мыши, получавшие CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541 (SEQ ID NO:610), имели самую маленькую селезенку из всех групп лечения. У мышей, получавших каждый из испытуемых препаратов, за исключением 186 CTLA-4 vIgD-Fc, также было значительно

меньше клеток селезенки, чем в контрольной группе Fc, а у мышей, получавших CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541 (SEQ ID NO:610), было наименьшее количество спленоцитов среди всех опытных групп. Меньшие размеры селезенки являются показателем уменьшения количества лимфоцитов, которые могут оказывать иммуномодулирующее действие на патогенез аутоиммунных и воспалительных заболеваний, связанных с повышенными иммунными реакциями, особенно теми, которые вызваны B- и/или T-клетками. Статистические анализы массы селезенки и общего количества клеток приведены в Таблице E22 и Таблице E23, соответственно.

Таблица E22. Статистическое сравнение всех опытных групп по массе селезенки (Фиг 19A):

Опытная группа	Fc контроль	Абатацепт	186 CTLA-4 vIgD-Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	406 BCMA -Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA -Fc
Абатацепт	0,0084								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	0,0056	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	<0,0001	0,0033	0,0124						
TACI 30-110 – Fc	ns	0,0228	0,0148	<0,0001					
TACI 13-118 – Fc	ns	0,0415	0,0267	<0,0001	ns				
406 BCMA - Fc	0,0253	ns	ns	0,0009	ns	ns			
381 BCMA - Fc	0,0101	ns	ns	0,0027	0,0269	0,0483	ns		
411 BCMA - Fc	0,0022	ns	ns	0,0122	0,0067	0,013	ns	ns	
Интактные	0,041	ns	ns	0,0002	ns	ns	ns	ns	ns

Таблица E23. Статистическое сравнение всех опытных групп по числу спленоцитов (Фиг.19B)

Опытная группа	Fc контроль	Абатацепт	186 CTLA-4 vIgD-Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	406 BCMA -Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA -Fc
Абатацепт	0,0168								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	ns	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	<0,0001	<0,0001	<0,0001						

Таблица E23. Статистическое сравнение всех опытных групп по числу спленоцитов (Фиг.19B)

Опытная группа	Fc контроль	Абатацепт	186 CTLA-4 vIgD-Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	406 BCMA -Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA -Fc
TACI 30-110 – Fc	0,0022	ns	ns	<0,0001					
TACI 13-118 – Fc	0,0079	ns	ns	<0,0001	ns				
406 BCMA -Fc	<0,0001	ns	0,0174	0,0006	ns	ns			
381 BCMA -Fc	<0,0001	0,0011	0,0003	0,017	0,0094	0,0027	ns		
411 BCMA -Fc	<0,0001	0,0024	0,0005	0,009	0,0176	0,0054	ns	ns	
Интактные	<0,0001	0,0112	0,0025	0,0009	ns	0,0241	ns	ns	ns

Особое значение для патогенеза аутоиммунных и воспалительных заболеваний имеют типы клеток, которые способствуют выживанию и дифференцировке B-клеток, выработке антител и эффекторной памяти T-клеток. Эти типы клеток включают, без ограничения указанными, следующие: общие B-клетки, B-клетки маргинальной зоны (MZ), B-клетки зародышевого центра (GC), фолликулярные T-хелперные клетки (Tfh) и CD4+ и CD8+ T-эффекторные клетки памяти (T_{em}). Ожидается, что терапевтические средства, механизмы действия которых включают уменьшение количества этих типов клеток, будут эффективными при лечении многочисленных заболеваний, опосредованных аутоантителами. Лечение CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541 (SEQ ID NO:610) или любым из тестируемых препаратов BCMA-Fc существенно уменьшило количество множественных субпопуляций B-клеток селезенки по сравнению с остальными группами лечения, включая воздействие на переходные-2 (B220+ CD19+ CD23+ $CD21^{high}$ IgM^{high}), фолликулярные (B220+ CD19+ CD23+ CD21+ IgM+), краевой зоны (B220+ CD19+ $CD23^{neg}$ $CD21^{high}$ IgM^{high}), зародышевого центра (B220+ CD19+ GL7+ CD95+) и плазматические клетки ($B220^{low}$ CD19+ $CD138^{high}$) (Фиг.20 и Фиг.21). Эти BCMA vTD-содержащие одиночные или TACI vTD- или BCMA vTD-содержащие мультидоменные молекулы были столь же эффективны или лучше, чем абатацепт или две молекулы TACI -Fc дикого типа (TACI 13-188-Fc и TACI 30-110-Fc) в их способности снижать процент (не показано) или количество этих популяции, которые важны для выживания и дифференцировки B-клеток и выработки антител. Статистические анализы данных проточной цитометрии спленоцитов 20-го дня показаны в Таблицах E24-E42.

Популяции селезеночных CD3+, CD4+ или CD8+ T-клеток в значительной степени не подвергались воздействию испытуемых препаратов, содержащих vTD BCMA (группы

7-12), хотя лечение мышей CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541 (SEQ ID NO:610) (группа 4) действительно уменьшало количество этих популяций Т-клеток по сравнению с контрольной группой Fc (Фиг.22A-22C). CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541 (SEQ ID NO:610) также уменьшал количество Т-клеток памяти T_{cm} и T_{em} по сравнению с контрольной группой Fc, в то время как испытуемые препараты с одним доменом TACI или BCMA не обеспечивали этого (Фиг.23). По сравнению с контролем Fc, все испытуемые препараты уменьшали количество фолликулярных хелперных Т-клеток (CD45+, CD3+, CD4+, PD-1+, CD185+), которые взаимодействуют с В-клетками в зародышевом центре и являются важными участниками Т-клеточно-зависимых ответов антител (Фиг.22D).

Таблица E24. Статистический анализ субпопуляций В-клеток селезенки – Количество клеток по сравнению с Fc контрольной группой (Фиг. 20)

Сравнение	T1 B клетки	T2 B клетки	Фолликулярные B-клетки	B-клетки маргинальной зоны	B-клетки зародышевого центра	Плазматические клетки
Fc Контроль против абатацепта	0,4773	0,0760	0,0009	0,0022	<0,0001	0,0014
Fc Контроль против 186 CTLA-4 vIgD-Fc	0,5970	0,1130	0,0189	0,0003	<0,0001	0,0580
Fc Контроль против CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	0,0345	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Fc Контроль против TACI 30-110 – Fc	0,2738	0,4820	<0,0001	<0,0001	0,0152	<0,0001
Fc Контроль против TACI 13-118 – Fc	0,5942	0,0045	<0,0001	<0,0001	0,0115	0,0012
Fc Контроль против 406 BCMA -Fc	0,9686	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0030	<0,0001
Fc Контроль против 381 BCMA -Fc	0,5743	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Fc Контроль против 411 BCMA -Fc	0,4039	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0004	<0,0001
Fc Контроль против интактных	0,2333	0,0241		<0,0001	<0,0001	<0,0001

Таблица E25. Статистический анализ субпопуляций Т-клеток селезенки – Количество клеток по сравнению с Fc контрольной группой (Фиг. 22A-22D)

Сравнение	CD3+ T клетки	CD8+ T клетки	CD4+ T клетки	CD4+ Tfh клетки
Fc Контроль против абатацепта	0,1393	0,2757	0,0800	<0,0001
Fc Контроль против 186 CTLA-4 vIgD-Fc	0,4956	0,7235	0,2681	<0,0001

Таблица E25. Статистический анализ субпопуляций Т-клеток селезенки – Количество клеток по сравнению с Fc контрольной группой (Фиг. 22A-22D)				
Сравнение	**CD3+ Т клетки**	**CD8+ Т клетки**	**CD4+ Т клетки**	**CD4+ Tfh клетки**
Fc Контроль против CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	0,0001	0,0034	<0,0001	<0,0001
Fc Контроль против TACI 30-110 – Fc	0,7623	0,5177	0,2474	<0,0001
Fc Контроль против TACI 13-118 – Fc	0,7210	0,6151	0,2739	0,0001
Fc Контроль против 406 BCMA -Fc	0,8262	0,2192	0,4770	<0,0001
Fc Контроль против 381 BCMA -Fc	0,2153	0,7029	0,0565	<0,0001
Fc Контроль против 411 BCMA -Fc	0,2095	0,8683	0,0126	<0,0001
Fc Контроль против интактных	0,0038	0,0086	0,0029	<0,0001

Таблица E26. Статистический анализ субпопуляций Т-клеток селезенки – Количество клеток по сравнению с Fc контрольной группой (Фиг. 27)						
Сравнение	**Наивные CD4+ Т клетки**	**CD4+ Tcm клетки**	**CD4+ Tem клетки**	**Наивные CD8+ Т клетки**	**CD8+ Tcm клетки**	**CD8+ Tem клетки**
Fc Контроль против абатацепта	0,5081	0,0047	<0,0001	0,6246	0,1115	0,3078
Fc Контроль против 186 CTLA-4 vIgD-Fc	0,9715	0,0017	<0,0001	0,9728	0,3248	0,9740
Fc Контроль против CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	0,0017	<0,0001	<0,0001	0,0109	0,0013	0,0391
Fc Контроль против TACI 30-110 – Fc	0,4484	0,0695	0,0088	0,9952	0,2531	0,1411
Fc Контроль против TACI 13-118 – Fc	0,4336	0,1831	0,0355	0,8153	0,3456	0,0729
Fc Контроль против 406 BCMA - Fc	0,7834	0,0995	0,0236	0,4410	0,0847	0,3897
Fc Контроль против 381 BCMA - Fc	0,2029	0,0003	0,0002	0,8184	0,6104	0,6897
Fc Контроль против 411 BCMA - Fc	0,0691	0,0002	<0,0001	0,8360	0,6895	0,5270
Fc Контроль против интактных	0,0433	0,0516	<0,0001	0,0782	0,0016	0,0166

Таблица E27. Статистический анализ всех опытных групп по количеству Т1 В-клеток									
Опытная группа	Fc контроль	Абатацепт	186 CTLA-4 vIgD-Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	406 BCMA -Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA -Fc
Абатацепт	ns								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	ns	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	0,0417	ns	0,0164						

Таблица E27. Статистический анализ всех опытных групп по количеству T1 B-клеток

Опытная группа	Fc контроль	Абатацепт	186 CTLA-4 vIgD-Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	406 BCMA -Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA -Fc
TACI 30-110 – Fc	ns	ns	ns	ns					
TACI 13-118 – Fc	ns	ns	ns	ns	ns				
406 BCMA -Fc	ns	ns	ns	ns	ns	ns			
381 BCMA -Fc	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		
411 BCMA -Fc	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
Интактные	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Таблица E28. Статистическое сравнение всех опытных групп по количеству T2 B-клеток

Опытная группа	Fc контроль	абатацепт	186 CTLA-4 vIgD-Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	406 BCMA -Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA -Fc
Абатацепт	ns								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	ns	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	<0,0001	<0,0001	<0,0001						
TACI 30-110 – Fc	ns	0,0142	0,0257	<0,0001					
TACI 13-118 – Fc	0,0042	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0268				
406 BCMA -Fc	<0,0001	<0,0001	<0,0001	ns	<0,0001	<0,0001			
381 BCMA -Fc	<0,0001	<0,0001	<0,0001	ns	<0,0001	<0,0001	ns		
411 BCMA -Fc	<0,0001	0,0002	0,0002	ns	<0,0001	<0,0001	ns	ns	
Интактные	0,0231	ns	ns	<0,0001	0,0033	<0,0001	0,0001	<0,0001	0,0003

Таблица E29. Статистическое сравнение всех опытных групп по количеству фолликулярных B-клеток

Опытная группа	Fc контроль	Абатацепт	186 CTLA-4 vIgD-Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	406 BCMA -Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA -Fc
Абатацепт	0,0008								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	0,0185	ns							

Таблица E29. Статистическое сравнение всех опытных групп по количеству фолликулярных B-клеток

Опытная группа	Fc контроль	Абатацепт	186 CTLA-4 vIgD-Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	406 BCMA -Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA -Fc
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	<0,0001	<0,0001	<0,0001						
TACI 30-110 – Fc	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001					
TACI 13-118 – Fc	<0,0001	0,0014	0,0001	<0,0001	ns				
406 BCMA -Fc	<0,0001	<0,0001	<0,0001	ns	0,0002	<0,0001			
381 BCMA -Fc	<0,0001	<0,0001	<0,0001	ns	<0,0001	<0,0001	ns		
411 BCMA -Fc	<0,0001	<0,0001	<0,0001	ns	0,0002	<0,0001	ns	ns	
Интактные	<0,0001	0,0002	<0,0001	<0,0001	ns	ns	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Таблица E30. Статистическое сравнение всех опытных групп по количеству B-клеток краевой зоны

Опытная группа	Fc контроль	Абатацепт	186 CTLA-4 vIgD-Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	406 BCMA -Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA -Fc
Абатацепт	0,0021								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	0,0003	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 – TACI 541	<0,0001	<0,0001	<0,0001						
TACI 30-110 – Fc	<0,0001	<0,0001	<0,0001	ns					
TACI 13-118 – Fc	<0,0001	<0,0001	<0,0001	ns	ns				
406 BCMA -Fc	<0,0001	<0,0001	<0,0001	ns	ns	ns			
381 BCMA -Fc	<0,0001	<0,0001	<0,0001	ns	ns	ns	ns		
411 BCMA -Fc	<0,0001	<0,0001	<0,0001	ns	ns	ns	ns	ns	
Интактные	<0,0001	ns	ns	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Таблица E31. Статистическое сравнение всех опытных групп по количеству B-клеток зародышевого центра

Опытная группа	Fc контроль	абатацепт	186 CTLA-4 vIgD-Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	406 BCMA -Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA -Fc
абатацепт	<0,0001								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	<0,0001	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	<0,0001	ns	ns						
TACI 30-110 – Fc	0,0182	<0,0001	0,0002	<0,0001					
TACI 13-118 – Fc	0,0139	<0,0001	0,0002	<0,0001	ns				
406 BCMA -Fc	0,0003	0,0058	0,0105	0,004	ns	ns			
381 BCMA -Fc	0,0001	0,0113	0,0192	0,0079	ns	ns	ns		
411 BCMA -Fc	0,0006	0,003	0,0058	0,002	ns	ns	ns	ns	
Интактные	<0,0001	ns	ns	ns	<0,0001	<0,0001	0,0063	0,0127	0,0032

Таблица E32. Статистическое сравнение всех опытных групп по количеству плазматических клеток

Опытная группа	Fc контроль	абатацепт	186 CTLA-4 vIgD-Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	406 BCMA -Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA -Fc
абатацепт	0,0019								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	ns	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	<0,0001	<0,0001	<0,0001						
TACI 30-110 – Fc	<0,0001	ns	0,0392	<0,0001					
TACI 13-118 – Fc	0,0016	ns	ns	<0,0001	ns				
406 BCMA -Fc	<0,0001	0,0237	0,0013	0,0052	ns	0,0268			
381 BCMA -Fc	<0,0001	0,0002	<0,0001	ns	0,004	0,0003	ns		
411 BCMA -Fc	<0,0001	0,0011	<0,0001	ns	0,0151	0,0012	ns	ns	
Интактные	<0,0001	0,0184	0,0009	0,0036	ns	0,0211	ns	ns	ns

Таблица E33. Статистическое сравнение всех опытных групп по количеству CD3+ Т-клеток

Опытная группа	Fc контроль	абатацепт	186 CTLA-4 vIgD-Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	406 BCMA -Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA -Fc
абатацепт	ns								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	ns	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	0,0001	0,0113	0,0023						
TACI 30-110 – Fc	ns	ns	ns	0,0004					
TACI 13-118 – Fc	ns	ns	ns	0,0004	ns				
406 BCMA -Fc	ns	ns	ns	0,0001	ns	ns			
381 BCMA -Fc	ns	ns	ns	0,0059	ns	ns	ns		
411 BCMA -Fc	ns	ns	ns	0,0062	ns	ns	ns	ns	
Интактные	0,0038	ns	0,0374	ns	0,0089	0,0104	0,0034	ns	ns

Таблица E34. Статистическое сравнение всех опытных групп по количеству CD4+ Т-клеток

Опытная группа	Fc контроль	абатацепт	186 CTLA-4 vIgD-Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	406 BCMA -Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA -Fc
абатацепт	ns								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	ns	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	<0,0001	0,0049	0,0016						
TACI 30-110 – Fc	ns	ns	ns	0,0008					
TACI 13-118 – Fc	ns	ns	ns	0,0007	ns				
406 BCMA -Fc	ns	ns	ns	0,0005	ns	ns			
381 BCMA -Fc	ns	ns	ns	0,0076	ns	ns	ns		
411 BCMA -Fc	0,0126	ns	ns	0,0367	ns	ns	ns	ns	
Интактные	0,0029	ns	ns	ns	0,062	ns	0,033	ns	ns

Таблица E35. Статистическое сравнение всех опытных групп по количеству CD8+ Т-клеток									
Опытная группа	Fc контроль	абатацепт	186 CTLA-4 vIgD-Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	406 BCMA -Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA -Fc
абатацепт	ns								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	ns	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	0,011	ns	0,0337						
TACI 30-110 – Fc	ns	ns	ns	0,0024					
TACI 13-118 – Fc	ns	ns	ns	0,0034	ns				
406 BCMA -Fc	ns	ns	ns	0,0184	ns	ns			
381 BCMA -Fc	ns	ns	ns	0,025	ns	ns	ns		
411 BCMA -Fc	ns	ns	ns	0,0076	ns	ns	ns	ns	
Интактные	0,023	ns	ns	ns	0,0051	0,0072	0,0377	0,0507	0,0159

Таблица E36. Статистическое сравнение всех опытных групп по количеству фолликулярных Т-хелперных клеток									
Опытная группа	Fc контроль	абатацепт	186 CTLA-4 vIgD-Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	406 BCMA -Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA -Fc
абатацепт	<0,0001								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	<0,0001	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 – TACI 541	<0,0001	ns	ns						
TACI 30-110 – Fc	<0,0001	ns	0,0242	0,0047					
TACI 13-118 – Fc	0,0001	0,0193	0,0026	0,0003	ns				
406 BCMA -Fc	<0,0001	ns	ns	0,0314	ns	ns			
381 BCMA -Fc	<0,0001	ns	ns	ns	ns	0,0365	ns		
411 BCMA -Fc	<0,0001	ns	ns	ns	ns	0,0485	ns	ns	
Интактные	<0,0001	ns	0,0159	0,0026	ns	ns	ns	ns	ns

Таблица E37. Статистическое сравнение всех опытных групп по количеству наивных CD4+ Т-клеток

Опытная группа	Fc контроль	абатацепт	186 CTLA-4 vIgD-Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	406 BCMA -Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA -Fc
абатацепт	ns								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	ns	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	0,0017	0,0108	0,0033						
TACI 30-110 – Fc	ns	ns	ns	0,0139					
TACI 13-118 – Fc	ns	ns	ns	0,0148	ns				
406 BCMA -Fc	ns	ns	ns	0,0064	ns	ns			
381 BCMA -Fc	ns	ns	ns	0,0484	ns	ns	ns		
411 BCMA -Fc	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
Интактные	0,0433	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Таблица E38. Статистическое сравнение всех опытных групп по количеству CD4+ Tcm клеток

Опытная группа	Fc контроль	абатацепт	186 CTLA-4 vIgD-Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	406 BCMA -Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA -Fc
абатацепт	0,0047								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	0,0017	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	<0,0001	0,0019	0,0131						
TACI 30-110 – Fc	ns	ns	ns	<0,0001					
TACI 13-118 – Fc	ns	ns	0,0462	<0,0001	ns				
406 BCMA - Fc	ns	ns	ns	0,0001	ns	ns			
381 BCMA - Fc	0,0003	ns	ns	0,0212	0,0495	0,0151	ns		
411 BCMA - Fc	0,0002	ns	ns	0,0291	0,0368	0,0107	0,0414	ns	
Интактные	ns	ns	ns	<0,0001	ns	ns	ns	0,0461	0,0337

Таблица E39. Статистическое сравнение всех опытных групп по количеству CD4+ Tem клеток

Опытная группа	Fc контроль	абатацепт	186 CTLA-4 vIgD-Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	406 BCMA -Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA -Fc
абатацепт	<0,0001								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	<0,0001	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	<0,0001	0,0003	0,0009						
TACI 30-110 – Fc	0,0088	ns	ns	<0,0001					
TACI 13-118 – Fc	0,0355	0,027	0,0288	<0,0001	ns				
406 BCMA -Fc	0,0236	ns	ns	<0,0001	ns	ns			
381 BCMA -Fc	0,0002	ns	ns	<0,0001	ns	ns	ns		
411 BCMA -Fc	<0,0001	ns	ns	0,0012	0,0365	0,0091	0,0282	ns	
Интактные	<0,0001	ns	ns	0,0021	0,0128	0,0026	0,0103	ns	ns

Таблица E40. Статистическое сравнение всех опытных групп по количеству наивных CD8+ Т-клеток

Опытная группа	Fc контроль	абатацепт	186 CTLA-4 vIgD-Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	406 BCMA -Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA -Fc
абатацепт	ns								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	ns	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	0,0109	0,0362	0,0147						
TACI 30-110 – Fc	ns	ns	ns	0,0107					
TACI 13-118 – Fc	ns	ns	ns	0,0197	ns				
406 BCMA - Fc	ns	ns	ns	0,0019	ns	ns			

Таблица E40. Статистическое сравнение всех опытных групп по количеству наивных CD8+ Т-клеток

Опытная группа	Fc контроль	абатацепт	186 CTLA-4 vIgD-Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	406 BCMA -Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA -Fc
381 BCMA - Fc	ns	ns	ns	0,0195	ns	ns	ns		
411 BCMA - Fc	ns	ns	ns	0,0184	ns	ns	ns	ns	
Интактные	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,016	ns	ns

Таблица E41. Статистическое сравнение всех опытных групп по количеству CD8+ Tcm клеток

Опытная группа	Fc контроль	абатацепт	186 CTLA-4 vIgD-Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	406 BCMA -Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA -Fc
абатацепт	ns								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	ns	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	0,0013	ns	0,0303						
TACI 30-110 – Fc	ns	0,0077	0,0422	<0,0001					
TACI 13-118 – Fc	ns	0,0131	ns	<0,0001	ns				
406 BCMA -Fc	ns	0,0019	0,0118	<0,0001	ns	ns			
381 BCMA -Fc	ns	ns	ns	0,0054	ns	ns	0,0294		
411 BCMA -Fc	ns	0,0485	ns	0,0004	ns	ns	ns	ns	
Интактные	0,0016	ns	0,0408	ns	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0072	0,0004

Таблица E42. Статистическое сравнение всех опытных групп по количеству CD8+ Tem клеток									
Опытная группа	Fc контроль	абатацепт	186 CTLA-4 vIgD-Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	406 BCMA -Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA -Fc
абатацепт	ns								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	ns	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	0,0391	ns	0,0476						
TACI 30-110 – Fc	ns	0,0148	ns	0,0007					
TACI 13-118 – Fc	ns	0,0061	ns	0,0002	ns				
406 BCMA -Fc	ns	ns	ns	0,0061	ns	ns			
381 BCMA -Fc	ns	ns	ns	ns	ns	0,03	ns		
411 BCMA -Fc	ns	ns	ns	0,0081	ns	ns	ns	ns	
Интактные	0,0166	ns	0,0223	ns	0,0002	<0,0001	0,0022	0,0447	0,0028

В совокупности эти результаты указывают, что vTD BCMA-содержащие однодоменные Fc-гибридные молекулы или мультидоменные собранные молекулы (CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541 (SEQ ID NO:610)), которые ингибируют активность B- и/или T-клеток, могут снижать иммунную ответы и изменения субпопуляций клеток, опосредованные T-клеточно-зависимым антигеном KLH in vivo (т.е. уровни анти-KLH в сыворотке и изменения в субпопуляциях иммунных клеток). Эти результаты согласуются с оценкой мультидоменных собранных белков CTLA-4 и BCMA/TACI, или молекул, ингибирующих B-клетки, с одним доменом TACI или BCMA, в качестве клинической терапии при лечении аутоиммунных и воспалительных заболеваний, в которых участвуют гиперактивные лимфоциты.

Пример 14. Оценка на модели синдрома Шегрена у мышей с диабетом без ожирения.

Этот пример описывает оценку примерного однодоменного 186-CTLA4 -Fc гибридного белка (вариант CTLA-4 SEQ ID NO:186, гибридизованный с Fc, указанной в SEQ ID NO:589) и мультидоменной собранной молекулы CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541 (мультидоменного собранного Fc-гибрида, указанного в SEQ ID NO:610) в краткосрочной модели синдрома Шегрена in vivo у мышей NOD, включая оценку сиаладенита, сывороточных уровней тестируемых молекул и инсулита.

Модель синдрома Шегрена была индуцирована у самок мышей NOD/ShiLtJ, склонных к диабету (возраст около 6 недель), путем повторного введения антитела против mPD-L1. В частности, 0,1 мг антитела против mPD-L1 вводили путем интраперитонеальной инъекции в дни 0, 2, 4 и 6. Гибридные белки испытуемой молекулы вводили в дозах на 0, 2 и 4-й дни в соответствии с Таблицей E43 ниже.

Таблица E43. Экспериментальные группы и режимы введения

Группа	N	Введение анти-mPD-L1 (IP)	Испытуемый препарат (TA)	Уровень дозы TA (IP)	Лечение mAb и дни введения TA
1	15	0,1 мг	Fc контроль	0,28 мг	0; 2; 4; 6 и 0; 2; 4
2	15	0,1 мг	186-CTLA4 -Fc	0,42 мг	0; 2; 4; 6 и 0; 2; 4
4	15	0,1 мг	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	0,5 мг	0; 2; 4; 6 и 0; 2; 4
6 (интактные)	5	0	n/a	0	n/a

Сокращения: IP = интраперитонеально; мг= миллиграмм; n/a = не применяется

Кровь брали из хвостовой вены мышей (2-5 мкл) на 7, 8, 9 и 10-й дни, помещали на тест-полоску «ReliOn Prime glucose» и измеряли уровень глюкозы в крови (мг/дл) с использованием тест-системы ReliOn Prime Glucose. На 10-й день эксперимента мышей умерщвляли, и собирали и анализировали сыворотку, подчелюстные железы (SMG) и поджелудочную железу.

Левую SMG и поджелудочную железу удаляли, иссекали от соседних лимфатических узлов и помещали в нейтрально-забуференный формалин (NBF) примерно на 72 часа с последующим переносом в 70%-ный этанол. Фиксированные ткани погружали в парафин, разрезали и окрашивали на предметных стеклах гематоксилином и эозином (H&E).

Балльные системы, используемые для оценки степени сиаладенита, были использованы в соответствии с Nandula et al. 2011 (Таблица 6 в нем; воспроизведена в Таблице E44) и для инсулита в соответствии с Gutierrez et al 2014 (Таблица 7 в нем; воспроизведена в Таблице E45).

Таблица E44. Гистологическая система баллов для оценки сиаладенита

Показатель	Критерии
0	Нет очагов воспаления
1	1-5 очагов из >50 воспалительных клеток
2	>5 очагов без паренхимальной деструкции
3	Умеренная паренхимальная деструкция
4	Обширная паренхимальная деструкция

Таблица E45. Гистологическая система баллов для оценки инсулита	
0	Нет инсулита
1	Пери-островковый инсулит
2	Промежуточный инсулит
3	Интра-островковый инсулит
4	Полный островковый инсулит

Статистически значимые различия между группами по гистологическим показателям определяли с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим использованием метода наименьшей значимой разницы (LSD) Фишера. Уровни глюкозы в крови анализировали на существенные различия с помощью непараметрического теста Краскела-Уоллиса с последующим тестом множественного сравнения Данна. Программное обеспечение GraphPad PRISM® (версия 8.1.2) использовали для статистического анализа, и значения $p<0,05$ считали статистически достоверными для всех статистических тестов.

Лечение обоими образцовыми препаратами CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541 снижало частоту сиалоаденита (Фиг.24A) и приводило к значительно более низкому гистологическому баллу ($p<0,01$), чем средние баллы для контроля Fc (Фиг.24B). Эти результаты согласуются с выводом о том, что лечение мышей NOD, которым вводили анти-PD-L1, тестируемыми молекулами снижало как частоту, так и тяжесть сиаладенита на этой модели синдрома Шегрена.

Общая частота возникновения инсулита у этих мышей, склонных к диабету, и степень развития инсулита после лечения испытуемыми молекулами показаны на Фиг.25A и Фиг.25B. CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541 значительно снижал степень инсулита, что было оценено с помощью гистологического анализа (Фиг.25B).

На Фиг.26 показаны средние концентрации глюкозы в крови (мг/дл), измеренные на 7, 8, 9 и 10-й дни для каждой экспериментальной группы. Как показано, уровни глюкозы в крови были значительно ниже в группах, получавших 186-CTLA-4 Fc и CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541, по сравнению с контролем Fc на 7-й день ($p<0,05$; $p<0,01$ и $p<0,001$, соответственно). Наблюдалась тенденция к снижению уровня глюкозы в крови при лечении мультидоменной собранной молекулой CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541 в другие моменты времени по сравнению с контролем Fc.

В совокупности эти результаты указывают на то, что лечение тестируемой примерной мультидоменной молекулой TACI-CTLA-4 снижало частоту и тяжесть сиаладенита на этой мышиной модели синдрома Шегрена и в целом было эффективным

при поддержании более низкого уровня глюкозы в крови в течение исследования. Эти результаты указывают на потенциал для содержащих TACI-CTLA-4 мультидоменных собранных молекул, в терапевтическом применении для лечения синдрома Шегрена, а также для TACI-CTLA-4 мультидоменных собранных молекул в качестве терапевтических средств для воздействия на развитие диабета 1 типа у людей.

Пример 15: Оценка активности мультиспецифичных конструкций на мышиной модели волчанки in vivo.

В этом примере описана оценка влияния примерной мультидоменной молекулы CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541 на иммунные ответы на модели индуцируемой СКВ у bm12 мышей in vivo.

Мыши C57BL/6NJ (C57BL/6) были случайным образом распределены по группам, указанным в Таблице E45. Селезенку самок мышей I-A^{bm12}B6(c)-H2-Ab1^{bm12}/KhEgJ («bm12») асептически обрабатывали до суспензий отдельных клеток в среде RPMI и объединяли в общей сложности в 8 мл. В общей сложности 0,2 мл объединенных спленоцитов bm12 были адоптивно перенесены при доставке интраперитонеальной инъекции 39 мышам-реципиентам C57BL/6. Аллоактивация донорских bm12 CD4+ T-клеток антигенпрезентирующими клетками реципиента приводит к хроническим симптомам РТПХ, очень похожим на СКВ, включая выработку аутоантител, изменения в субпопуляциях иммунных клеток и умеренное заболевание почек. На поздних стадиях модели развивается гломерулонефрит с отложением иммунных комплексов, в основном состоящих из аутоантигенов, связанных с антителами IgG1, IgG2b, IgG2c и IgG3.

Мыши-реципиенты получали дозы тестируемых молекул, описанных в Таблице E45, начиная через 1 час после переноса спленоцитов, а затем каждые 3-4 дня, в общей сложности 22 дозы; последнюю дозу вводили за 1 неделю до прекращения (последняя доза на 75-й день). В качестве контроля мышей лечили Fc-контролем, с полным WT ECD TACI-Fc (абатацептом) и TACI 30-110-Fc (TACI 30-110, SEQ ID NO:718; соответствующем части ECD TACI в атацицепте). Пять мышей C57BL/6 и 5 мышей bm12 были сохранены для использования в качестве интактного контроля без лечения.

Таблица E46. Опытные группы и режимы введения

Группа	N	Перенос спленоцитов в День 0	Испытуемые препараты	Доза (мкг)	Режим введения	Объем дозы (IP)
1	10	bm12→C57BL/6	Fc контроль	250	Q3-4Dx22	0,1 мл
2	9	bm12→C57BL/6	Абатацепт	400	Q3-4Dx22	0,1 мл
3	10	bm12→C57BL/6	TACI-30-110 Fc	350	Q3-4Dx22	0,1 мл
4	10	bm12→C57BL/6	CTLA4 186 -	460	Q3-4Dx22	0,1 мл

			GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541			
5	5	Нет (интактные мыши C57BL/6)	Без лечения (интактные мыши C57BL/6)	n/a	n/a	n/a
6	5	Нет (интактные мыши bm12)	Без лечения (интактные мыши bm12)	n/a	n/a	n/a
Q3-4Dx22: каждые 3-4 дня, в целом 22 дозы.						

Статистически значимые различия между группами по сывороточным уровням антител к дцДНК, изотипам IgG, BUN и CRE в определенные моменты времени были определены с использованием одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA). Проверка нормальности была проведена, чтобы определить, следует ли использовать стандартный ANOVA (используемый для нормально распределенных данных) или непараметрический тест Краскела-Уоллиса. Множественные сравнительные тесты между группами проводили с использованием либо нескорректированного теста Фишера на наименьшую значимую разницу (LSD) (для стандартного ANOVA), либо нескорректированного теста Данна (для Краскела-Уоллиса). Что касается данных проточной цитометрии, то достоверные различия между группами были проанализированы с использованием непарного лвухстороннего Т-критерия Стьюдента. Программное обеспечение GraphPad PRISM® (версия 8.1.2) использовали для статистического анализа, и значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми для всех статистических тестов.

Концентрации азота мочевины в крови (BUN) и креатина в сыворотке крови (CRE)

Сыворотку, собранную на 82-й день (окончание исследования, через 7 дней после последней дозы), анализировали на BUN и CRE. Как показано на Фиг.27, концентрации BUN были значительно повышены на модели, о чем свидетельствуют умеренно повышенные концентрации в контрольной группе Fc по сравнению с интактной группой C57BL/6 ($p<0,05$). Обе группы CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541- и TACI 30-110-FC -Fc показали значительно более низкие концентрации BUN по сравнению с группой, получавшей абатацепт. В целом, увеличение уровней CRE в контрольной группе Fc было минимальным в этом исследовании, и не было никаких существенных различий между какими-либо из групп.

Концентрация изотипа IgG в сыворотке крови

Сыворотку собирали на протяжении исследования, и образцы с 14, 42 и 82-го дня

анализировали на концентрации IgG2b, IgG2c и IgG3 с использованием наборов для иммуноферментного анализа IgG2b, IgG2c и IgG3 мыши в соответствии с инструкциями производителя (Abcam; Кембридж, Великобритания). Только на 82-й день (конечный) образцы сыворотки были проанализированы для интактных мышей bm12. Ранее было показано, что эти изотипы IgG повышены в иммунных комплексах на модели bm12 и, таким образом, являются потенциально патогенными; в частности, было показано, что концентрации в сыворотке крови увеличиваются в течение первых 4-5 недель на модели и постепенно снижаются с течением времени (Akieda et al., 2015 J. Immunol. 194 (9): 4162-74).

Как показано на Фиг.28A-28C, сыворотка, собранная с 14, 42 и 82 дней, показывает, что лечение образцовой мультидоменной собранной молекулой TACI-CTLA-4 CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541 приводило к стабильно низким уровням каждого из изотипов IgG на протяжении всего исследования, что значительно отличается как от контроля Fc, так и от групп TACI 30-110-FC-Fc для каждого изотипа IgG и в каждый из моментов времени испытания. Хотя контрольная молекула WT TACI -Fc (абатацепт) приводила к значительно более низким уровням каждого изотипа IgG по сравнению с контролем только Fc на 14-й день и к более низким концентрациям IgG2b на 82-й день, примерная мультидоменная собранная молекула TACI-CTLA-4 приводила к значительно более низким уровням каждый из изотипов IgG по сравнению с абатацептом на 42-й и 82-й день. В целом, лечение мышей образцовой мультидоменной собранной молекулой TACI-CTLA-4 снижало уровни этих патогенных изотипов IgG в сыворотке так же, как и абатацепт, или в большей степени, чем абатацепт, и всегда в большей степени, чем TACI 30-110-FC -Fc.

Анализ сывороточных антител к дцДНК

Сыворотку собирали с течением времени во время исследования, а образцы со дня 7, 14, 28, 42, 70 и 82 были проанализированы на концентрацию антител к дцДНК с использованием набора для анализа антител IgG к дцДНК мыши в соответствии с инструкциями производителя (Chondrex, Inc; Редмонд, Вашингтон). Подобно закономерностям изотипа IgG в сыворотке крови с течением времени, уровни антител к дцДНК достигли максимума примерно через 6 недель и постепенно снижались в течение следующих нескольких недель. Как показано на Фиг.29, сыворотка, собранная у субпопуляций мышей в каждой опытной группе в дни 7, 14, 28, 42, 70, и 82 и проанализированная с помощью ELISA, показала стабильно низкие уровни антител к дцДНК в каждый момент времени для примерной мультидоменной собранной молекулы TACI-CTLA-4, опытной группы CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 -TACI 541. Лечение WT

TACI-Fc (абатацептом) приводило к значительно более низким концентрациям анти-дцДНК, чем в контрольной группе Fc, на 14, 28 и 42-й день, однако лечение образцовой мультидоменной собранной молекулой TACI-CTLA-4 приводило к существенно более низким показателям, по сравнению с группой абатацепта на 7-й день и день 82. Эти результаты показывают, что примерная мультидоменная собранная молекула TACI-CTLA-4 последовательно снижала концентрации сывороточных антител к дцДНК, важных патогенных антител при СКВ, более эффективно, чем абатацепт.

Иммунофенотипирование субпопуляций лимфоцитов

Мышей умерщвляли на 82-й день, и кровь и ткани собирали следующим образом: шейный лимфатический узел (LN) и часть селезенки помещали в физиологический раствор с фосфатным буфером Дульбекко на льду для проточной цитометрии. Эту половину селезенки и LN механически обрабатывали с получением суспензий отдельных клеток, эритроциты (RBC) в клетках селезенки лизировали 1X буфером для лизиса эритроцитов (BioLegend) и подсчитывали клетки. Один миллион живых клеток из препаратов селезенки и лимфоузла окрашивали реагентами для проточной цитометрии и иммунофенотипировали для определения субпопуляций лимфоцитов.

В Таблице E47 приведены масса селезенки, количество клеток селезенки (# клеток селезенки) и процентные доли различных субпопуляций клеток в селезенке экспериментальных мышей, определенные методом проточного иммунофенотипирования. В Таблице E48 приведены процентные соотношения различных субпопуляций клеток в шейном лимфоузле экспериментальных мышей.

Результаты продемонстрировали множественные эффекты в отношении субпопуляций иммунных клеток, связанных с СКВ, включая снижение процентного содержания и количества B-клеток зародышевого центра (GC) и CD4+ T_{FH}-клеток по сравнению с мышами, получавшими Fc-контроль. Кроме того, лечение мультидоменной собранной молекулой TACI-CTLA4-Fc уменьшило количество клеток B220+ в селезенке и лимфоузле по сравнению с другими опытными группами, сохраняло незрелые T1-клетки, но значительно уменьшило количество более зрелых клеток маргинальной зоны (MZ), T2, фолликулярных B-клеток и плазматических клеток, продуцирующих антитела в селезенке. Без привлечения теории отметим, что эти результаты указывают на то, что компартмент B-клеток может повторно заселиться из незатронутых T1-клеток после вымывания тестируемой молекулы.

Результаты также продемонстрировали, что лечение мультидоменной собранной молекулой TACI-CTLA-Fc уменьшало CD4+ и CD8+ T_{em} и увеличивало субпопуляции клеток CD4+ и CD8+ T_{cm} в селезенке и лимфоузлах по сравнению с лечением Fc-

контролем. Кроме того, лечение мультидоменной собранной молекулой TACI-CTLA-Fc также снижало процент ICOS+ CD4+ и CD8+ клеток в селезенке и лимфоузлах по сравнению с каждой из других опытных групп.

Таблица E47: Иммунофенотипирование селезенки: статистическое сравнение опытных групп

Набор данных	Абатацепт против Fc контроля	TACI-CTLA-4 мультидоменная собранная молекула против Fc контроля	TACI-CTLA-4 мультидоменная собранная молекула против Абатацепта	TACI-CTLA-4 мультидоменная собранная молекула против TACI 30-110-FC
Масса селезенки	0,002	<0,0001	<0,0001	0,0002
Количество клеток селезенки	ns	0,0002	0,0017	0,0009
% CD45+ живых клеток селезенки	ns	ns	ns	ns
CD45+ клетки на селезенку	ns	0,0078	0,0145	0,0312
% B220+ клеток из CD45+ клеток	ns	<0,0001	<0,0001	<0,0001
B220+ клетки на селезенку	ns	<0,0001	<0,0001	0,0011
% CD3+ клеток от CD45+ клеток	ns	<0,0001	<0,0001	<0,0001
CD3+ клетки на селезенку	ns	0,0042	0,0219	ns
% GC B клеток от B220+ клеток	0,0037	0,0056	ns	0,0182
GC B клетки на селезенку	0,0129	0,0011	0,001	0,0062
% плазматических клеток от B220+ клеток	0,0375	<0,0001	0,0013	0,0011
Плазматические клетки на селезенку	0,0152	0,0011	0,0005	0,0279
% MZ B клеток от CD19+ клеток	ns	<0,0001	0,0002	0,0416
MZ B клетки на селезенку	ns	<0,0001	<0,0001	ns
% T1 B клеток от CD19+ клеток	ns	<0,0001	<0,0001	<0,0001
T1 B клетки на селезенку	ns	ns	ns	ns
% T2 B клеток от CD19+ клеток	0,0161	<0,0001	<0,0001	<0,0001
T2 B клетки на селезенку	ns	<0,0001	<0,0001	ns
% фоликулярных B клеток от CD19+ клеток	0,0161	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Фолликулярные B клетки на селезенку	ns	<0,0001	<0,0001	0,0017
% CD4+ T клеток от CD45+ клеток	ns	<0,0001	<0,0001	0,023
CD4+ T клетки на селезенку	ns	0,0217	ns	ns
% CD8+ T клеток от CD45+ клеток	0,0013	<0,0001	<0,0001	<0,0001
CD8+ T клетки на селезенку	ns	0,0009	0,0049	ns
CD4+ T клетки, % hIgG+ клеток	0,0319	<0,0001	0,0005	<0,0001
CD8+ T клетки, % hIgG+ клеток	ns	0,0154	0,0075	ns
CD45+ $CD3^-$ % hIgG+ не-T клеток	ns	<0,0001	<0,0001	<0,0001
CD4+ T клетки, % ICOS+ клеток	<0,0001	<0,0001	0,0082	<0,0001
CD4+ T клетки ICOS+ клетки на селезенку	ns	ns	ns	0,0018
CD8+ T клетки, % ICOS+ клеток	0,0009	<0,0001	0,0171	<0,0001

CD8+ Т клетки, ICOS+ клетки на селезенку	ns	ns	ns	0,0102
CD4+ Т клетки, % CD28+ клеток	<0,0001	<0,0001	0,0494	0,0002
CD4+Т клетки, CD28+ клетки на селезенку	ns	0,0154	ns	ns
CD8+ Т клетки, % CD28+ клеток	0,0379	0,0202	ns	<0,0001
CD8+Т клетки CD28+ клетки на селезенку	ns	0,0005	0,0051	0,0131
CD4+ % Treg клеток	<0,0001	<0,0001	0,0001	0,0002
CD4+ Treg клетки на селезенку	0,01	0,0002	ns	0,0033
CD4+ % T_{FH} клеток	0,0002	<0,0001	<0,0001	0,0005
CD4+ T_{FH} клетки на селезенку	0,0044	0,0009	0,0019	0,0061
CD4+ % наивных Т клеток	ns	<0,0001	0,0001	0,0001
CD4+ наивные Т клетки на селезенку	ns	0,0004	0,0131	ns
CD4+ % Tem клеток	<0,0001	<0,0001	0,0002	<0,0001
CD4+ Tem клетки на селезенку	0,0287	0,0063	ns	<0,0001
CD4+ % Tcm клеток	<0,0001	<0,0001	ns	<0,0001
CD4+ Tcm клетки на селезенку	0,0066	<0,0001	ns	0,0037
CD8+ % наивных Т клеток	ns	0,002	0,0078	49
CD8+ наивные Т клетки на селезенку	ns	<0,0001	0,0013	0,0129
CD8+ % Tem клеток	0,0033	0,0002	0,0026	0,0002
CD8+ Tem клетки на селезенку	0,0156	0,0207	ns	0,0195
CD8+ % Tcm клеток	0,0001	ns	ns	ns
CD8+ Tcm клетки на селезенку	ns	0,001	0,0447	ns

ns = недостоверно

Таблица E48. Иммунофенотипирование цервикального лимфоузла (LN): статистическое сравнение разных опытных групп

Набор данных	Абатацепт против Fc контроля	TaBLI против Fc контроля	TaBLI против абатацепта	TaBLI против TACI 30-110-FC
% CD45+ от живых клеток	ns	ns	ns	ns
% B220+ от CD45+ клеток	ns	<0,0001	<0,0001	0,0003
% CD3+ от CD45+ клеток	ns	<0,0001	<0,0001	<0,0001
% GC B клеток от B220+ клеток	0,0237	ns	0,0324	ns
% плазматических клеток от B220+ клеток	ns	0,0002	0,0057	0,0005
% MZ B клеток от CD19+ клеток	0,0244	0,0029	<0,0001	0,0378
% T1 B клеток от CD19+ клеток	ns	<0,0001	<0,0001	<0,0001
% T2 B клеток от CD19+ клеток	ns	ns	ns	0,0005
% Fol B клеток от CD19+ клеток	ns	<0,0001	<0,0001	<0,0001
% CD4+ от CD45+ клеток	ns	<0,0001	<0,0001	0,0053
% CD8+ от CD45+ клеток	ns	<0,0001	<0,0001	<0,0001
CD4+ % Treg клеток	0,0002	<0,0001	0,0049	<0,0001
CD4+ % Tfh клеток	0,0029	0,0007	0,0002	0,0003
CD4+ % hIgG+ клеток	ns	ns	ns	ns
CD4+ % CD28+ клеток	0,0013	0,0004	ns	0,0001
CD4+ % ICOS+ клеток	0,0012	<0,0001	0,0387	<0,0001

CD8+ % hIgG+ клеток	ns	ns	ns	0,0249
CD8+ % CD28+ клеток	0,0303	0,0001	ns	0,0001
CD8+ % ICOS+ клеток	0,0408	<0,0001	0,0459	<0,0001
CD45+ $CD3^-$ % hIgG+ не-Т клеток	ns	<0,0001	<0,0001	0,0218
CD4+ % наивных Т клеток	ns	ns	ns	0,0002
CD4+ % Tem Т клеток	0,0415	0,0107	ns	ns
CD4+ % Tcm Т клеток	0,0007	0,0003	ns	0,0437
CD8+ % наивных Т клеток	0,0483	ns	ns	ns
CD8+ % Tem Т клеток	0,0192	0,0245	ns	ns
CD8+ % Tcm Т клеток	0,0189	ns	ns	ns

ns = не достоверно

Заключение

Эти результаты подтверждают, что мультидоменная собранная молекула TACI-CTLA-4, такая как примерная мультидоменная собранная молекула CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541, способна ингибировать экспансию ключевых субпопуляций B- и Т-лимфоцитов и уменьшать образование аутоантител и потенциально патогенных IgG на мышиной модели индуцированной хронической РТПХ и СКВ, в большинстве случаев более эффективно, чем TACI 30-110-Fc или абатацепт. Эти данные указывают на то, что одновременное ингибирование как BAFF/APRIL B-клеточных, так и CD80/86-CD28 костимулирующих Т-клеточных путей может привести к значительному облегчению течения заболевания и контролю патогенных лимфоцитов при СКВ. Следовательно, двойной ингибитор пути, полученный с помощью мультидоменной собранной молекулы TACI-CTLA-4, может быть эффективным средством лечения СКВ у людей.

Пример 16. Оценка примерных мономерных и тетрамерных конструкций.

Были получены дополнительные гибридные белки BCMA Fc, содержащие один (мономерный) или четыре (тетрамерный стержневой и тетрамерный тандемный) BCMA-домены, используя WT BCMA, указанный в SEQ ID NO:356, и vTD BCMA, указанный в SEQ ID NO:406 (H19L). Мономерные и тетрамерные WT BCMA и vTD BCMA были отформатированы как WT BCMA и BCMA vTD-Fc гибридные белки с Fc-доменом. Примерные созданные Fc-гибридные белки были получены по существу так, как указано в Примере 4, и описаны в Таблицах E49A-E49C.

Вкратце, чтобы генерировать рекомбинантные мономерные иммуномодулирующие белки в виде одноцепочечных Fc-гибридных белков, кодирующую ДНК генерировали для кодирования белка следующим образом: WT BCMA или вариантный домен BCMA, за которым следует линкер из 12 аминокислот (GSGGGGSGGGGS; SEQ ID NO:805), за которым следует одноцепочечная Fc (scFc), указанная в SEQ ID NO:852 (состоящая из

безэффекторной последовательности Fc IgG1 человека, содержащей мутации L234A, L235E и G237A, в соответствии с системой нумерации EU для иммуноглобулиновых белков (SEQ ID NO:589), за которой следует (GGGGS)13 линкер (SEQ ID NO:806), за которым следует вторая безэффекторная Fc-последовательность IgG1 человека, содержащая мутации L234A, L235E и G237A, в соответствии с системой нумерации EU для иммуноглобулиновых белков). Полученные молекулы описаны в Таблице E49A.

Таблица E49A. Примерные мономерные иммуномодулирующие белки

AA SEQ ID NO	NT SEQ ID NO	Описание	BCMA, SEQ ID NO	Линкер, SEQ ID NO	FC, SEQ ID NO
807	814	BCMA 356 - GS(G4S)2 814-scFc 852	356	805	821
810	817	BCMA 406- GS(G4S)2 814 - scFc 852	406	805	821

Для получения рекомбинантных тетрамерных иммуномодулирующих белков в качестве Fc-гибридных белков были получены белки в различных форматах следующим образом:

В одном формате была получена кодирующая ДНК для кодирования трех различных версий белка следующим образом: BCMA Fc (SEQ ID NO:813): домен vTD BCMA SEQ ID NO:406, за которым следует линкер (G4S)3 SEQ ID NO:595; за которым следует домен vTD BCMA SEQ ID NO:406; за которым следует линкер GSGGGGS SEQ ID NO:590; за которым следует безэффекторная Fc-последовательность IgG1 человека, содержащая мутации L234A, L235E и G237A, в соответствии с системой нумерации индексов EU для иммуноглобулиновых белков (SEQ ID NO:589).

В одном формате была создана кодирующая ДНК для кодирования трех различных версий белка следующим образом: WT BCMA (SEQ ID NO:809): домен WT BCMA SEQ ID NO:356, за которым следует линкер GSGGGGS SEQ ID NO:590; за которым следует безэффекторная Fc-последовательность IgG1 человека, содержащая мутации L234A, L235E и G237A, по системе нумерации индексов EU для иммуноглобулиновых белков (SEQ ID NO:589), за которой следует линкер (G4S)3 SEQ ID NO:595, за которым следует домен WT BCMA SEQ ID NO:356.

В одном формате была создана кодирующая ДНК для кодирования трех различных версий белка следующим образом: BCMA Fc SEQ ID NO:812): vTD BCMA, указанный в SEQ ID NO:406, за которым следует линкер GSGGGGS SEQ ID NO:590; за которым следует безэффекторная Fc-последовательность IgG1 человека, содержащая мутации L234A, L235E и G237A, по системе нумерации индексов EU для иммуноглобулиновых

белков (SEQ ID NO:589), за которой следует линкер (G4S)3 SEQ ID NO:595, за которым следует vTD BCMA, указанный в SEQ ID NO:406.

Таблица E49B. Примерные тетрамерные иммуномодулирующие белки							
AA SEQ ID NO	NT SEQ ID NO	Описание	1-й BCMA	Линкер	2-й BCMA	Линкер	Fc
813	820	BCMA 406--(G4S)3 (595) BCMA 406--GSG4S (590) Fc 589	406	595	406	590	589
Таблица E49C. Примерные тетрамерные иммуномодулирующие белки							
AA SEQ ID NO	NT SEQ ID NO	Описание	1-й BCMA	Линкер	FC	Линкер	2-й BCMA
809	816	BCMA 356 GSG4S (590) Fc 589 (G4S)3 (595) BCMA 356	356	590	589	595	356
812	819	BCMA 406--GSG4S (590) Fc 589- (G4S)3(595) BCMA 406-	406	590	589	595	406

A. Биологическая активность примерных мультидоменных молекул

В одном эксперименте примерные молекулы, приведенные в Таблицах E49A-E49C, оценивали с использованием репортерных клеток Jurkat/NF-κB/TACI для блокады APRIL- или BAFF-опосредованной передачи сигналов. В Таблице E50 приведены значения полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC_{50}) для ингибирования APRIL- и BAFF-опосредованной передачи сигналов TACI. В некоторых случаях тестируемые белки не были сравнены с их исходным контролем дикого типа, и представлены как (-) в таблице ниже. Результаты в Таблице E50 демонстрируют, что все созданные форматы блокируют как APRIL, так и BAFF-опосредованную передачу сигналов.

Таблица E50. Оценка примерных мономерных и тетрамерных иммуномодулирующих белков				
SEQ ID NO	**Формат**	**APRIL IC_{50} (пМ)**	**BAFF IC_{50} (пМ)**	**BAFF 60-мер IC_{50} (пМ)**
807	BCMA 356 - GS(G4S)2 814-Fc 589-$(GGGGS)_{13}$ 815-Fc 589	-	-	-
809	BCMA 356 GSG4S (590) Fc 589 (G4S)3 (595) BCMA 356	3255	3073	84875
810	BCMA 406-- GS(G4S)2 814-Fc 589-$(GGGGS)_{13}$ 815-Fc 589	-	-	-
812	BCMA 406-- GSG4S (590) Fc 589- (G4S)3(595) BCMA 406-	2717	583	2324
813	BCMA 406-- (G4S)3 (595) BCMA 406-- GSG4S (590) Fc 589	775	638	630

Пример 17. Генерация мультидоменных иммуномодулирующих белков, ингибирующих Т- и В-клетки.

Мультидоменные иммуномодулирующие белки были получены в виде гомодимерных Fc-гибридов, содержащих (1) внеклеточный домен CTLA-4 дикого типа в качестве молекулы, ингибирующей Т-клетки (TIM); и (2) часть внеклеточного домена TACI дикого типа или его вариант в качестве молекулы, ингибирующей В-клетки (BIM), которая связывается с рецептором, стимулирующим В-клетки, таким как BCMA или APRIL, в целом как описано в Примере 7А.

TIM (CTLA-4 дикого типа) или BIM (TACI дикого типа или вариант) мультидоменного иммуномодулирующего белка были по-разному связаны с N- или С-концом Fc-области посредством пептидного линкера, такого как GSGGGGS (SEQ ID NO:590) и (GGGGS)4 (SEQ ID NO:600). Для генерации гомодимерных Fc-гибридов использовали различные примерные Fc-области IgG1, включая последовательности, указанные в SEQ ID NO:589, 822, 823 и 824.

В Таблице Е51 ниже приведены примеры созданных мультидоменных гомодимерных иммуномодулирующих Fc-гибридных белков.

Таблица Е51: Мультидоменные иммуномодулирующие белки (гомодимер)

Описание	ДНК, SEQ ID NO	Белок, SEQ ID NO	CTLA-4 (SEQ ID NO)	TACI (SEQ ID NO)	Линкер (SEQ ID NO)	Fc (SEQ ID NO)
(CTLA4 WT ECD 1) GSG4S Fc 589 (G4S)4 (TACI 528)	796	759	CTLA-4 ECD (1)	68-110 WT (528)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
(CTLA4 WT ECD 1) GSG4S Fc 853 (G4S)4 (TACI 528)	797	786	CTLA-4 ECD (1)	68-110 WT (528)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (853)
(CTLA4 WT ECD 1) GSG4S Fc 854 (G4S)4 (TACI 528)	798	787	CTLA-4 ECD (1)	68-110 WT (528)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (854)
(CTLA4 WT ECD 1) GSG4S Fc 589 (G4S)4 (TACI 542)	799	788	CTLA-4 ECD (1)	Q75E, R84Q (68-110) (542)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
(CTLA4 WT ECD 1) GSG4S Fc 853 (G4S)4 (TACI 542)	800	789	CTLA-4 ECD (1)	Q75E, R84Q (68-110) (542)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (853)
(CTLA4 WT ECD 1) GSG4S Fc 854 (G4S)4 (TACI 542)	801	790	CTLA-4 ECD (1)	Q75E, R84Q (68-110) (542)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (854)
(CTLA4 WT ECD 1)	802	791	CTLA-4	68-110 WT	GSG4S	Fc (855)

Таблица E51: Мультидоменные иммуномодулирующие белки (гомодимер)						
Описание	ДНК, SEQ ID NO	Белок, SEQ ID NO	CTLA-4 (SEQ ID NO)	TACI (SEQ ID NO)	Линкер (SEQ ID NO)	Fc (SEQ ID NO)
GSG4S Fc 855 (G4S)4 (TACI 528)			ECD (1)	(528)	(590) (G4S)4 (600)	
(CTLA4 WT ECD 1) GSG4S Fc 855 (G4S)4 (TACI 542)	803	792	CTLA-4 ECD (1)	Q75E, R84Q (68-110) (542)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (855)

Настоящее изобретение не предназначено для ограничения объема конкретными раскрытыми вариантами осуществления, которые предоставлены, например, для иллюстрации различных аспектов изобретения. Различные модификации описанных композиций и способов станут очевидными из описания и инструкций, приведенных в настоящей заявке. Такие изменения могут практиковаться без отступления от истинного объема и сущности изобретения, и предназначены для того, чтобы подпадать под объем настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуномодулирующий белок, включающий:

(1) по меньшей мере одну молекулу, ингибирующую Т-клетки (TIM), которая связывается с (i) рецептором, стимулирующим Т-клетки, или (ii) лигандом рецептора, стимулирующего Т-клетки; и/или которая является антагонистом активности рецептора, стимулирующего Т-клетки; и

(2) по меньшей мере одну молекулу, ингибирующую В-клетки (BIM), которая связывается с лигандом рецептора, стимулирующего В-клетки, и/или является антагонистом активности рецептора, стимулирующего В-клетки.

2. Иммуномодулирующий белок по п.1, в котором TIM связывается с лигандом рецептора, стимулирующего Т-клетки.

3. Иммуномодулирующий белок по п.2, в котором:

- рецептором, стимулирующим Т-клетки, является CD28; и/или

- лигандом рецептора, стимулирующего Т-клетки, является CD80 или CD86.

4. Иммуномодулирующий белок по любому из п.1-3, в котором TIM представляет собой внеклеточный домен CTLA-4 или его связывающую часть, которая связывается с CD80 или CD86.

5. Иммуномодулирующий белок по п.4, в котором внеклеточный домен CTLA-4 или его связывающая часть представляет собой (i) последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2; (ii) вариантную последовательность аминокислот CTLA-4, который имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2; или (iii) часть (i) или (ii), содержащую домен IgV.

6. Иммуномодулирующий белок по п.4 или п.5, в котором внеклеточный домен CTLA-4 или его связывающая часть указаны в SEQ ID NO:1.

7. Иммуномодулирующий белок по п.4 или п.5, в котором внеклеточный домен CTLA-4 или его связывающая часть представляют собой вариантную последовательность аминокислот CTLA-4, который имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO:1 или ее частью, содержащей домен IgV, где вариантная последовательность CTLA-4 содержит одну или несколько аминокислотных замен в SEQ ID NO:1 или ее части, включающей домен IgV.

8. Иммуномодулирующий белок по п.7, в котором вариантная последовательность CTLA-4 содержит аминокислотную замену C122S.

9. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-5, 7 и 8, в котором внеклеточный домен CTLA-4 или его связывающая часть указаны в SEQ ID NO:668.

10. Иммуномодулирующий белок по любому из п.7-9, в котором вариантный CTLA-4 связывается с эктодоменом CD80 и CD86, при необходимости, где аффинность связывания с одним или с обоими из CD80 и CD86 повышена по сравнению с последовательностью, указанной в SEQ ID NO:1, или ее частью, включающей домен IgV.

11. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.7-8 и 10, в котором одна или несколько аминокислотных замен включают аминокислотные замены, выбранные из L12F, R16H, G29W, T53S, M56T, N58S, L63P, L98Q или Y105L, или их комбинации.

12. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.7-8, 10 и 11, в котором одна или несколько аминокислотных замен включают G29W, L98Q и Y105L.

13. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.7-8 и 10-12, в котором одна или несколько аминокислотных замен представляют собой G29W/N58S/L63P/Q82R/L98Q/Y105L, L12F/R16H/G29W/M56T/L98Q/Y105L, T53S/L63P/L98Q или G29W/L98Q/Y105L.

14. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-8 и 10-13, в котором внеклеточный домен CTLA-4 или его связывающая часть указаны в любой из SEQ ID NO:92, 112, 165 или 186 или их части, включающей домен IgV.

15. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-14, в котором:

- лигандом рецептора, стимулирующего В-клетки, является APRIL или BAFF; и/или

- рецептором, стимулирующим В-клетки, является TACI, BCMA или BAFF-рецептор.

16. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-15, в котором BIM представляет собой внеклеточный домен TACI или его связывающую часть, которая связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером BAFF/APRIL.

17. Иммуномодулирующий белок по п.16, в котором внеклеточный домен TACI или его связывающая часть представляет собой последовательность внеклеточного домена, указанную как (i) последовательность аминокислот, указанная в SEQ ID NO:709, (ii) последовательность аминокислот, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:709; или (iii) часть (i) или (ii), содержащая один или оба домена CRD1 и CRD2, которые связываются с APRIL, BAFF или гетеротримером BAFF/APRIL.

18. Иммуномодулирующий белок по п.16 или п.17, в котором внеклеточный домен TACI или его связывающая часть включает домен CRD1 и домен CRD2.

19. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.16-18, в котором внеклеточный домен TACI или его связывающая часть представляет собой укороченный внеклеточный

домен TACI дикого типа, указанный в SEQ ID NO:516.

20. Иммуномодулирующий белок по п.16 или п.17, в котором внеклеточный домен TACI или его связывающая часть представляет собой укороченный внеклеточный домен TACI дикого типа, который содержит богатый цистеином домен 2 (CRD2), но не содержит всего богатого цистеином домена 1 (CRD1).

21. Иммуномодулирующий белок по п.16, п.17 или п.20, в котором внеклеточный домен TACI или его связывающая часть представляет собой укороченный внеклеточный домен TACI дикого типа, который состоит из непрерывной последовательности, содержащейся в аминокислотных остатках 67-118, которая включает аминокислотные остатки 71-104, со ссылкой на положения, указанные в SEQ ID NO:709.

22. Иммуномодулирующий белок по п.20 или п.21, в котором укороченный внеклеточный домен TACI дикого типа или его связывающая часть составляют 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 59, 50 или 51 аминокислоту по длине.

23. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.16, 17 и 20-22, в котором внеклеточный домен TACI или его связывающая часть указаны в SEQ ID NO:528.

24. Иммуномодулирующий белок по п.16 или п.17, в котором внеклеточный домен TACI или его связывающая часть представляет собой вариантный полипептид TACI, который содержит одну или несколько аминокислотных замен во внеклеточном домене (ECD) эталонного полипептида TACI или его фрагмента специфического связывания в положениях, выбранных из 40, 59, 60, 61, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 92, 95, 97, 98, 99, 101, 102 и 103, соответствующие нумерации положений, указанной в SEQ ID NO:709.

25. Иммуномодулирующий белок по п.24, в котором эталонный полипептид TACI представляет собой укороченный полипептид, состоящий из внеклеточного домена TACI или его части специфического связывания, которая связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером BAFF/APRIL.

26. Иммуномодулирующий белок по п.24 или п.25, в котором эталонный полипептид TACI содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:709, или ее часть, содержащую один или оба домена CRD1 и CRD2, которые связываются с APRIL, BAFF или гетеротримером BAFF/APRIL.

27. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.24-26, в котором эталонный полипептид TACI содержит домен CRD1 и домен CRD2.

28. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.24-27, в котором эталонный полипептид TACI указан в SEQ ID NO:516.

29. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.24-26, в котором эталонный

полипептид TACI представляет собой укороченный внеклеточный домен TACI дикого типа, который содержит богатый цистеином домен 2 (CRD2), но полностью лишен богатого цистеином домена 1 (CRD1), где вариантный полипептид TACI содержит одну или несколько аминокислотных замен в укороченном внеклеточном домене TACI дикого типа.

30. Иммуномодулирующий белок по п.29, в котором укороченный внеклеточный домен TACI дикого типа состоит из непрерывной последовательности, содержащейся в пределах аминокислотных остатков 67-118, которая включает аминокислотные остатки 71-104, со ссылкой на положения, указанные в SEQ ID NO:122.

31. Иммуномодулирующий белок по п.29 или п.30, в котором укороченный внеклеточный домен TACI дикого типа составляет 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 59, 50 или 51 аминокислоту по длине.

32. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.24-26 и 29-31, в котором эталонный полипептид TACI состоит по существу из домена CRD2.

33. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.24-26 и 29-31, в котором эталонный полипептид TACI содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:528.

34. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.24-26 и 29-33, в котором эталонный полипептид TACI указан в SEQ ID NO:528.

35. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.24-34, в котором вариантный полипептид TACI содержит одну или несколько аминокислотных замен в положениях, выбранных из 74, 75, 76, 77, 78, 79, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 92, 95, 97, 98, 99, 101, 102 и 103, соответствующих нумерации, указанной в SEQ ID NO:709.

36. Иммуномодулирующий белок по п.35, в котором одна или несколько аминокислотных замен выбраны из E74V, Q75E, Q75R, G76S, K77E, F78Y, Y79F, L82H, L82P, L83S, R84G, R84L, R84Q, D85E, D85V, C86Y, I87L, I87M, S88N, I92V, Q95R, P97S, K98T, Q99E, A101D, Y102D, F103S, F103V, F103Y или их консервативной аминокислотной замены.

37. Иммуномодулирующий белок по п.35 или п.36, в котором одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере одну из E74V, K77E, Y79F, L82H, L82P, R84G, R84L, R84Q, D85V или C86Y.

38. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.35-37, в котором одна или несколько аминокислотных замен включают аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из Q75E, K77E, F78Y, R84G, R84Q, A101D и Y102D, или любой их комбинации.

39. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.35-38, в котором одна или

несколько аминокислотных замен представляют собой D85E/K98T, I87L/K98T, L82P/I87L, G76S/P97S, K77E/R84L/F103Y, Y79F/Q99E, L83S/F103S, K77E/R84Q, K77E/A101D, K77E/F78Y/Y102D, Q75E/R84Q, Q75R/R84G/I92V, K77E/A101D/Y102D, R84Q/S88N/A101D, R84Q/F103V, K77E/Q95R/A101D или I87M/A101D.

40. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.35-39, в котором одна или несколько аминокислотных замен представляют собой K77E/F78Y/Y102D, Q75E/R84Q или R84G.

41. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.35-40, в котором вариантный полипептид TACI обладает повышенной аффинностью связывания с одним или обоими из APRIL и BAFF по сравнению с эталонным полипептидом TACI.

42. Иммуномодулирующий белок по п.41, в котором повышенная аффинность к BAFF или APRIL независимо увеличивается более чем в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или 60 раз.

43. Иммуномодулирующий белок по любому из п.35-42, в котором:

- вариантный полипептид TACI содержит последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO:517-527, 536, 537, 682-701; или

- вариантный полипептид TACI содержит последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO:529-535, 538-550, 673-681 или 760-772.

44. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.35-43, в котором вариантный полипептид TACI указан в любой из SEQ ID NO:535, 541, 542 или 688.

45. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-15, в котором BIM представляет собой внеклеточный домен BCMA или его связывающую часть, которая связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером BAFF/APRIL.

46. Иммуномодулирующий белок по п.45, в котором внеклеточный домен BCMA или его связывающая часть представляет собой последовательность внеклеточного домена, указанную как (i) последовательность аминокислот, указанная в SEQ ID NO:356, (ii) последовательность аминокислот, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:356; или (iii) часть (i) или (ii), содержащая домен CRD.

47. Иммуномодулирующий белок по п.45 или п.46, в котором полипептид BCMA или его связывающая часть указаны в SEQ ID NO:356.

48. Иммуномодулирующий белок по п.45 или п.46, в котором внеклеточный домен BCMA или его связывающая часть представляет собой вариантный полипептид BCMA, содержащий одну или несколько аминокислотных замен во внеклеточном домене (ECD) эталонного полипептида BCMA в положениях, выбранных из 9, 10, 11, 14, 16, 19, 20, 22, 25, 27, 29, 30, 31, 32, 35, 36, 39, 43, 45, 46, 47 и 48, соответствующих нумерации, указанной

в SEQ ID NO:710.

49. Иммуномодулирующий белок, включающий вариантный полипептид BCMA, который содержит одну или несколько аминокислотных замен во внеклеточном домене (ECD) эталонного полипептида BCMA в положениях, выбранных из 9, 10, 11, 14, 16, 19, 20, 22, 25, 27, 29, 30, 31, 32, 35, 36, 39, 43, 45, 46, 47 и 48, соответствующих нумерации положений, указанной в SEQ ID NO:710.

50. Иммуномодулирующий белок, включающий вариантный гибридный белок BCMA-Fc, содержащий вариантный полипептид BCMA, Fc-область и линкер между полипептидом BCMA и Fc-областью, где вариантный полипептид BCMA содержит одну или несколько аминокислотных замен во внеклеточном домене. (ECD) эталонного полипептида BCMA, соответствующих положениям, выбранным из 9, 10, 11, 14, 16, 19, 20, 22, 25, 27, 29, 30, 31, 32, 35, 36, 39, 43, 45, 46, 47 и 48 со ссылкой на положения, указанные в SEQ ID NO:710.

51. Иммуномодулирующий белок по любому из п.48-50, в котором эталонный полипептид BCMA представляет собой внеклеточный домен BCMA или его связывающую часть, которая связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером BAFF/APRIL.

52. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.48-51, в котором в эталонном BCMA отсутствует N-концевой метионин.

53. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.48-52, в котором эталонный полипептид BCMA содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:356, или ее часть, содержащую домен CRD.

54. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.48-53, в котором эталонный полипептид BCMA указан в SEQ ID NO:356.

55. Иммуномодулирующий белок по любому из п.48-54, в котором одна или несколько аминокислотных замен выбраны из S9G, S9N, S9Y, Q10E, Q10P, N11D, N11S, F14Y, S16A, H19A, H19C, H19D, H19E, H19F, H19G, H19I, H19K, H19L, H19M, H19N, H19P, H19Q, H19R, H19S, H19T, H19V, H19W, H19Y, A20T, I22L, I22V, Q25E, Q25F, Q25G, Q25H, Q25I, Q25K, Q25L, Q25M, Q25S, Q25V, Q25Y, R27H, R27L, S29P, S30G, S30Y, N31D, N31G, N31H, N31K, N31L, N31M, N31P, N31S, N31V, N31Y, T32I, T32S, L35A, L35M, L35P, L35S, L35V, L35Y, T36A, T36G, T36N, T36M, T36S, T36V, R39L, R39Q, A43E, A43S, V45A, V45D, V45I, T46A, T46I, N47D, N47Y, S48G, или их консервативной аминокислотной замены.

56. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.48-55, в котором одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере одну аминокислотную

замену, выбранную из H19F, H19K, H19L, H19M, H19R или H19Y.

57. Иммуномодулирующий белок по любому из п.48-56, в котором одна или несколько аминокислотных замен представляют собой H19Y/S30G; H19Y/V45A; F14Y/H19Y; H19Y/V45D; H19Y/A43E; H19Y/T36A; H19Y/I22V; N11D/H19Y; H19Y/T36M; N11S/H19Y; H19Y/L35P/T46A; H19Y/N47D; S9D/H19Y; H19Y/S30G/V45D; H19Y/R39Q; H19Y/L35P; S9D/H19Y/R27H; Q10P/H19Y/Q25H; H19Y/R39L/N47D; N11D/H19Y/N47D; H19Y/T32S; N11S/H19Y/S29P; H19Y/R39Q/N47D; S16A/H19Y/R39Q; S9N/H19Y/N31K/T46I; H19Y/R27L/N31Y/T32S/T36A; N11S/H19Y/T46A; H19Y/T32I; S9G/H19Y/T36S/A43S; H19Y/S48G; S9N/H19Y/I22V/N31D; S9N/H19Y/Q25K/N31D; S9G/H19Y/T32S; H19Y/T36A/N47Y; H19Y/V45A/T46I; H19Y/Q25K/N31D; H19Y/Q25H/R39Q/V45D; H19Y/T32S/N47D; Q10E/H19Y/A20T/T36S; H19Y/T32S/V45I; H19F/Q25E/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25F/N31S/T36S; H19I/Q25F/N31S/T36V; H19F/Q25V/N31M/T36S; H19Y/Q25Y/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25I/N31M/L35A/T36S; H19I/Q25L/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25L/N31G/L35P/T36A; H19Y/I22L/N31G; H19F/I22V/Q25M/N31P/T36M; H19Y/N31L/L35Y/T36S; H19L/S30G/N31H/L35A; H19L/Q25S/N31V/L35S/T36V; H19L/Q25S/S30Y/N31G/L35M/T36V; H19F/Q25F/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25F/N31S/T36G; H19F/I22V/Q25S/N31V/L35S/T36V; H19F/Q25G/N31S/L35V/T36N; H19L/Q25H/N31D/L35S; или H19F/Q25F/N31S/L35Y/T36S.

58. Иммуномодулирующий белок по любому из п.48-57, в котором одна или несколько аминокислотных замен представляют собой или включают H19F, H19L, H19K, H19M, H19R, H10Y, N11D/H19Y/N47D, H19Y/R39Q/N47D; S16A/H19Y/R39Q, S9G/H19Y/T32S; H19Y/T36A/N47Y; или Q10E/H19Y/A20T/T36S.

59. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.48-58, в котором одна или несколько аминокислотных замен представляют собой или включают S16A/H19Y/R39Q.

60. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.48-59, в котором вариантный полипептид BCMA обладает повышенной аффинностью связывания с одним или обоими из APRIL и BAFF по сравнению с эталонным полипептидом TACI.

61. Иммуномодулирующий белок по п.60, в котором повышенная аффинность к BAFF или APRIL независимо увеличивается более чем в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или 60 раз.

62. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.48-61, в котором вариантный полипептид BCMA имеет до 10 аминокислотных замен по сравнению с эталонным полипептидом BCMA.

63. Иммуномодулирующий белок по п.48-61, в котором вариантный полипептид BCMA имеет до 5 аминокислотных замен по сравнению с эталонным полипептидом

BCMA.

64. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.48-63, в котором вариантный полипептид BCMA имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO:356.

65. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.48-64, в котором вариантный полипептид BCMA имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:356.

66. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.48-65, в котором вариантный полипептид BCMA содержит последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO:357-435.

67. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.48-66, в котором вариантный полипептид BCMA указан в любой из SEQ ID NO:357, 377, 380, 381, 390, 391, 396, 402, 405, 406, 407 или 411.

68. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.49 и 51-67, содержащий гетерологичный фрагмент, который связан с вариантным полипептидом BCMA.

69. Иммуномодулирующий белок по п.68, в котором гетерологичный фрагмент представляет собой фрагмент, продлевающий период полужизни, домен мультимеризации, таргетинговый фрагмент, который связывается с молекулой на поверхности клетки, или обнаруживаемую метку.

70. Иммуномодулирующий белок по п.69, в котором фрагмент, продлевающий период полужизни, включает домен мультимеризации, альбумин, альбуминсвязывающий полипептид, Pro/Ala/Ser (PAS), С-концевой пептид (CTP) бета-субъединицы человеческого хорионического гонадотропина, полиэтиленгликоль (PEG), длинные неструктурированные гидрофильные последовательности аминокислот (XTEN), гидроксиэтилкрахмал (HES), малую молекулу, связывающую альбумин, или их комбинацию.

71. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.49 и 51-67, который представляет собой гибридный белок BCMA-Fc, где вариантный полипептид BCMA связан с Fc-областью иммуноглобулина, при необходимости через линкер.

72. Иммуномодулирующий белок по любому из п.п.50-71, где линкер включает пептидный линкер, а пептидный линкер выбран из GSGGS (SEQ ID NO:592), GGGGS (G4S; SEQ ID NO:593), GSGGGGS (SEQ ID NO:590), GGGGSGGGGS (2xGGGGS; SEQ ID NO:594), GGGGSGGGGSGGGGS (3xGGGGS; SEQ ID NO:595), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (4xGGGGS, SEQ ID NO:600), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (5XGGGGS, SEQ ID NO:671), GGGGSSA (SEQ ID

NO:596), или их комбинаций.

73. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-48 и 51-67, который представляет собой одну полипептидную цепь, содержащую по меньшей мере одну TIM и по меньшей мере одну BIM, разделенные линкером.

74. Иммуномодулирующий белок по п.73, в котором по меньшей мере одна TIM является аминоконцевой по отношению по меньшей мере к одной BIM в полипептиде.

75. Иммуномодулирующий белок по п.73, в котором по меньшей мере одна TIM является карбоксиконцевой по отношению по меньшей мере к одной BIM в полипептиде.

76. Иммуномодулирующий белок по любому из п.73-75, в котором линкер включает пептидный линкер, а пептидный линкер выбран из GSGGS (SEQ ID NO:592), GGGGS (G4S; SEQ ID NO:593), GSGGGGS (SEQ ID NO:590), GGGGSGGGGS (2xGGGGS; SEQ ID NO:594), GGGGSGGGGSGGGGS (3xGGGGS; SEQ ID NO:595), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (4xGGGGS, SEQ ID NO:600), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (5XGGGGS, SEQ ID NO:671), GGGGSSA (SEQ ID NO:596), SEQ ID NO:711 (1xEAAAK), SEQ ID NO:712 (2xEAAAK), SEQ ID NO:713 (3xEAAAK), SEQ ID NO:714 (4xEAAAK), SEQ ID NO:715 (5xEAAAK), SEQ ID NO:665 (6xEAAAK), или их комбинаций.

77. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-48, 51-67 и 73-76, который содержит последовательность аминокислот, указанную в любой из SEQ ID NO:618-623 или 703-708, или последовательность, которая проявляет по меньшей мере 85% 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности с ними и сохраняет активность.

78. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-48 и 51-67, в котором по меньшей мере одна TIM или по меньшей мере одна BIM связана с фрагментом мультимеризации, который способствует димеризации, причем иммуномодулирующий белок является димером.

79. Иммуномодулирующий белок по п.78, в котором домен мультимеризации представляет собой Fc-область иммуноглобулина.

80. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.50-72 и 79, в котором Fc-область иммуноглобулина представляет собой гомодимерную Fc-область, а иммуномодулирующий белок представляет собой гомодимер, содержащий две идентичные копии одного и того же полипептида.

81. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.50-72, 79 и 80, в котором Fc-область иммуноглобулина представляет собой Fc-домен IgG2, при необходимости, в котором Fc-домен IgG2 содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID

NO:726 или 822, или последовательность аминокислот, которая проявляет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:726 или 822.

82. Иммуномодулирующий белок по любому из п.п.50-72, 79 и 80, в котором Fc-область иммуноглобулина представляет собой Fc-домен IgG4, содержащий аминокислотную замену S228P, при необходимости, где Fc-домен содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:728 или 823, или последовательность аминокислот, проявляющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO:728 или 823.

83. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.50-72, 79 и 80, в котором Fc иммуноглобулина представляет собой Fc-домен IgG1 или его вариант, который проявляет пониженную аффинность связывания с Fc-рецептором и/или пониженную эффекторную функцию, при необходимости по сравнению с Fc-доменом IgG1 дикого типа.

84. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.50-72, 79, 80 и 83, в котором Fc иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:597.

85. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.50-72, 79, 80 и 83, в котором Fc иммуноглобулина представляет собой вариантный Fc-домен IgG1, содержащий одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из L234A, L234V, L235A, L235E, G237A, S267K, R292C, N297G и V302C, по нумерации EU.

86. Иммуномодулирующий белок по п.85, в котором Fc область иммуноглобулина содержит аминокислотные замены L234A, L235E и G237A по нумерации EU.

87. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.50-72, 79, 80, 83, 85 и 86, в котором Fc представляет собой вариантную Fc, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:589 или SEQ ID NO:824.

88. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.50-72, 80 и 83-87, в котором гибридный белок BCMA-Fc содержит структуру: полипептид BCMA (BCMA)-Линкер-Fc-область.

89. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.50-72, 80 и 83-88, в котором гибридный белок BCMA-Fc указан в SEQ ID NO:629.

90. Иммуномодулирующий гибридный белок BCMA-Fc, который является гомодимером, содержащим две идентичные копии гибридного белка BCMA-Fc, указанного в SEQ ID NO:629, соединенные ковалентной дисульфидной связью.

91. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.50-72, 80 и 83-87, в котором гибридный белок BCMA-Fc содержит структуру: (BCMA)-Линкер-Fc-область-Линкер-(BCMA).

92. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.50-72, 80, 83-87 и 91, в котором гибридный белок BCMA-Fc указан в SEQ ID NO:809 или SEQ ID NO:812.

93. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.50-72, 80 и 83-87, в котором гибридный белок BCMA-Fc содержит структуру: (BCMA)-Линкер-(BCMA)-Линкер-Fc область.

94. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.50-72, 80, 83-87 и 93, в котором гибридный белок BCMA-Fc указан в SEQ ID NO:813.

95. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.50-72, 80 и 83-94, в котором Fc-гибридный белок нейтрализует APRIL и BAFF.

96. Иммуномодулирующий белок по п.95, в котором:

- IC50 для нейтрализации APRIL составляет менее 100 пМ, менее 50 пМ, менее 40 пМ, менее 30 пМ, менее 20 пМ, менее 10 пМ, менее 5 пМ или менее 1 пМ, или является любым значением между любым из вышеперечисленных; и/или

- IC50 для нейтрализации BAFF составляет менее 400 пМ, менее 300 пМ, менее 200 пМ, менее 100 пМ, менее 75 пМ, менее 50 пМ, менее 25 пМ или менее 10 пМ, или является любым значением между любым из вышеперечисленных.

97. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.50-72, 80 и 83-96, в котором:

- Fc-гибридный белок блокирует связывание APRIL, BAFF или гетеротримера APRIL/BAFF с BCMA или TACI; и/или

- Fc-гибридный белок снижает уровни циркулирующих APRIL, BAFF или APRIL/BAFF в крови после введения субъекту.

98. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.80-87, в котором каждый полипептид гомодимера содержит по меньшей мере одну TIM и по меньшей мере одну BIM, и в котором по меньшей мере одна TIM является аминоконцевой по отношению по меньшей мере к одной BIM в каждом полипептиде.

99. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.80-87, в котором каждый полипептид гомодимера содержит по меньшей мере одну TIM и по меньшей мере одну BIM, и в котором по меньшей мере одна TIM является карбоксиконцевой по отношению по меньшей мере к одной BIM в каждом полипептиде.

100. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-44, 78-87, 98 и 99, который содержит последовательность аминокислот, указанную в любой из SEQ ID NO: 610-617, 624-627, 637, 638, 643, 644, 648, 653 654, и 759-792, или последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 85% 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности с ними и сохраняет активность.

101. Иммуномодулирующий белок по любому из п.п.1-44, 78-87 и 98-100, в

котором TIM представляет собой внеклеточный домен CTLA-4 дикого типа или его связывающую часть, а BIM представляет собой внеклеточный домен TACI или его связывающую часть, содержащую аминокислотные замены K77E/F78Y/Y102D, Q75E/R84Q, или R84G, соответствующие положениям, указанным в SEQ ID NO:709, при необходимости, где TIM указана в SEQ ID NO:1, а BIM указана в SEQ ID NO:535, 541, 542 или 688.

102. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-44, 78-87 и 98-101, который содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:611, SEQ ID NO:788, SEQ ID NO:789, SEQ ID NO:790 или SEQ ID NO:792.

103. Иммуномодулирующий белок, который является гомодимером, содержащим две идентичные копии Fc-гибридного белка, указанного в SEQ ID NO:611, соединенные ковалентной дисульфидной связью.

104. Иммуномодулирующий белок, который является гомодимером, содержащим две идентичные копии Fc-гибридного белка, указанного в SEQ ID NO:788, соединенные ковалентной дисульфидной связью.

105. Иммуномодулирующий белок, который является гомодимером, содержащим две идентичные копии Fc-гибридного белка, указанного в SEQ ID NO:789, соединенные ковалентной дисульфидной связью.

106. Иммуномодулирующий белок, который является гомодимером, содержащим две идентичные копии Fc-гибридного белка, указанного в SEQ ID NO:790, соединенные ковалентной дисульфидной связью.

107. Иммуномодулирующий белок, который является гомодимером, содержащим две идентичные копии Fc-гибридного белка, указанного в SEQ ID NO:792, соединенные ковалентной дисульфидной связью.

108. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-44, 78-87 и 98-100, где TIM представляет собой внеклеточный домен CTLA-4 дикого типа или его связывающую часть, а BIM представляет собой укороченный внеклеточный домен TACI, содержащий домен CRD2, при необходимости, где TIM указана в SEQ ID NO:1, а BIM указана в SEQ ID NO:528.

109. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-44, 78-87, 98-100 и 108, который содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:759, SEQ ID NO:786, SEQ ID NO:787 или SEQ ID NO:791.

110. Иммуномодулирующий белок, который является гомодимером, содержащим две идентичные копии Fc-гибридного белка, указанного в SEQ ID NO:759, соединенные ковалентной дисульфидной связью.

111. Иммуномодулирующий белок, который является гомодимером, содержащим две идентичные копии Fc-гибридного белка, указанного в SEQ ID NO:786, соединенные ковалентной дисульфидной связью.

112. Иммуномодулирующий белок, который является гомодимером, содержащим две идентичные копии Fc-гибридного белка, указанного в SEQ ID NO:787, соединенные ковалентной дисульфидной связью.

113. Иммуномодулирующий белок, который является гомодимером, содержащим две идентичные копии Fc-гибридного белка, указанного в SEQ ID NO:791, соединенные ковалентной дисульфидной связью.

114. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-44, 78-87 и 98-100, в котором TIM представляет собой внеклеточный домен CTLA-4 или его связывающую часть, содержащую аминокислотные замены G29W/L98Q/Y105L, соответствующие положениям, указанным в SEQ ID NO:1, а BIM представляет собой внеклеточный домен TACI или его связывающую часть, содержащую аминокислотные замены K77E/F78Y/Y102D, Q75E/R84Q или R84G, соответствующие положениям, указанным в SEQ ID NO:709, при необходимости, где TIM указана в SEQ ID NO:186, а BIM указана в SEQ ID NO:535, 541, 542 или 688.

115. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-44, 78-87, 98-100 и 114, который содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:610.

116. Иммуномодулирующий белок, содержащий две идентичные копии Fc-гибридного белка, указанного в SEQ ID NO:610, соединенные ковалентной дисульфидной связью.

117. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-15, 45-48, 51-67, 78-87, 98 и 99, который содержит последовательность аминокислот, указанную в любой из SEQ ID NO: 601-609, 631-636, 645-647, 649-652, 655-659, или последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 85% 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности с ними и сохраняет активность.

118. Иммуномодулирующий белок по любому из п.п.1-15, 45-48, 51-67, 78-87, 98, 99 и 117, где TIM представляет собой внеклеточный домен CTLA-4 дикого типа или его связывающую часть, а BIM представляет собой внеклеточный домен BCMA или его связывающую часть, содержащую аминокислотную замену H19L, соответствующую положениям, указанным в SEQ ID NO:710, при необходимости, где TIM указана в SEQ ID NO:1, а BIM указана в SEQ ID NO:406, при необходимости, где иммуномодулирующий белок содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:602.

119. Иммуномодулирующий белок, который является гомодимером, содержащим

две идентичные копии Fc-гибридного белка, указанного в SEQ ID NO:602, соединенные ковалентной дисульфидной связью.

120. Иммуномодулирующий белок по любому из п.п.1-15, 45-48, 51-67, 78-87, 98, 99 и 117, где TIM представляет собой внеклеточный домен CTLA-4 или его связывающую часть, содержащую аминокислотные замены G29W/L98Q/Y105L, соответствующие положениям, указанным в SEQ ID NO:1, а BIM представляет собой внеклеточный домен BCMA или его связывающую часть, содержащую аминокислотную замену H19L со ссылкой на положения, указанные в SEQ ID NO:710, при необходимости, где TIM указана в SEQ ID NO:186, а BIM указана в SEQ ID NO:406, при необходимости, где иммуномодулирующий белок содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:601.

121. Иммуномодулирующий белок, который является гомодимером, содержащим две идентичные копии Fc-гибридного белка, указанного в SEQ ID NO:601, соединенные ковалентной дисульфидной связью.

122. Иммуномодулирующий белок по п.79, в котором Fc-область иммуноглобулина представляет собой гетеродимерную Fc-область, а иммуномодулирующий белок представляет собой гетеродимер, содержащий первый и второй полипептиды, причем первый полипептид содержит одну из по меньшей мере одной BIM или по меньшей мере одной TIM, а второй полипептид содержит другую из по меньшей мере одной BIM и по меньшей мере одной TIM.

123. Иммуномодулирующий белок по п.122, в котором гетеродимерная Fc содержит одну или несколько аминокислотных модификаций в Fc-домене дикого типа для осуществления образования гетеродимера между полипептидами, при необходимости, где Fc-область дикого типа является Fc-областью IgG1.

124. Иммуномодулирующий белок по п.123, в котором одна или несколько аминокислотных модификаций выбраны из модификации «выступ-во-впадину» и мутации заряда для уменьшения или предотвращения самоассоциации из-за отталкивания зарядов.

125. Иммуномодулирующий белок по любому из п.122-124, в котором гетеродимерная Fc-область дополнительно содержит одну или несколько аминокислотных замен для снижения аффинности к Fc-рецептору и/или снижения эффекторной функции, при необходимости по сравнению с Fc-доменом IgG1 дикого типа.

126. Иммуномодулирующий белок по п.125, в котором одна или несколько аминокислотных замен выбраны из L234A, L234V, L235A, L235E, G237A, S267K, R292C, N297G и V302C, по нумерации EU.

127. Иммуномодулирующий белок по п.125 или п.126, в котором Fc-область иммуноглобулина содержит аминокислотные замены L234A, L235E и G237A по

нумерации EU.

128. Иммуномодулирующий белок по любому из п.122-127, в котором гетеродимер включает первый полипептид, содержащий последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:662 или 663, и второй полипептид, содержащий последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:660.

129. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-128, где:

- иммуномодулирующий белок блокирует связывание APRIL, BAFF или гетеротримера APRIL/BAFF с BCMA или TACI; и/или

- иммуномодулирующий белок снижает уровни циркулирующих APRIL, BAFF или APRIL/BAFF в крови после введения субъекту.

130. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-129, который уменьшает или ингибирует созревание, дифференцировку и/или пролиферацию B-клеток.

131. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-48, 51-87 и 98-130, где:

- иммуномодулирующий белок блокирует связывание CD80 или CD86 с костимулирующим рецептором, при необходимости, где костимулирующим рецептором является CD28; и/или

- иммуномодулирующий белок уменьшает или ингибирует костимуляцию T-клеток.

132. Молекула (молекулы) нуклеиновой кислоты, кодирующая иммуномодулирующий белок по любому из п.п.1-131.

133. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.132.

134. Вектор по п.133, который является вектором экспрессии.

135. Вектор по п.133 или п.134, который представляет собой вектор экспрессии млекопитающих или вирусный вектор.

136. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по п.132 или вектор по любому из п.п.133-135.

137. Способ получения иммуномодулирующего белка, включающий введение молекулы нуклеиновой кислоты по п.132 или вектора по любому из п.133-135 в клетку-хозяина в условиях для экспрессии белка в клетке.

138. Способ по п.137, дополнительно включающий выделение или очистку иммуномодулирующего белка из клетки.

139. Иммуномодулирующий белок, полученный способом по п.137 или п.138.

140. Фармацевтическая композиция, содержащая иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-131 и 139.

141. Фармацевтическая композиция по п.140, содержащая фармацевтически

приемлемое вспомогательное вещество.

142. Изделие, включающее фармацевтическую композицию по любому из п.140 или п.141 в ампуле или контейнере.

143. Набор, включающий изделие по п.142 и инструкции по применению.

144. Способ снижения иммунного ответа у субъекта, включающий введение иммуномодулирующего белка по любому из пп.1-131 или фармацевтической композиции по п.140 или п.141 субъекту, нуждающемуся в этом.

145. Способ по п.144, в котором у субъекта снижается иммунный ответ В-клеток, где снижается или ингибируется созревание, дифференцировка и/или пролиферация В-клеток.

146. Способ по п.144 или п.145, в котором циркулирующие уровни APRIL, BAFF или гетеротримера APRIL/BAFF снижаются у субъекта.

147. Способ по любому из пп.144-146, в котором у субъекта снижается Т-клеточный иммунный ответ, посредством чего снижается или ингибируется костимуляция Т-клеток.

148. Способ по любому из пп.144-147, в котором снижение иммунного ответа лечит заболевание, расстройство или состояние у субъекта.

149. Способ снижения циркулирующих уровней APRIL, BAFF или гетеротримера APRIL/BAFF у субъекта, включающий введение субъекту иммуномодулирующего белка по любому из пп.1-131 или фармацевтической композиции по п.140 или п.141.

150. Способ лечения заболевания, расстройства или состояния у субъекта, включающий введение иммуномодулирующего белка по любому из пп.1-131 или фармацевтической композиции по п.140 или п.141 субъекту, нуждающемуся в этом.

151. Способ по п.148 или 150, в котором заболевание, расстройство или состояние представляет собой аутоиммунное заболевание и воспалительное состояние, В-клеточный рак, патологию, опосредованную антителами, заболевание почек, отторжение трансплантата, болезнь «трансплантат против хозяина» или вирусную инфекцию.

152. Способ по п.п.148, 150 или 151, в котором заболевание, расстройство или состояние выбрано из группы, состоящей из системной красной волчанки (СКВ); синдрома Шегрена, склеродермии, рассеянного склероза, диабета, полимиозита, первичного билиарного цирроза, IgA-нефропатии, IgA-васкулита, неврита зрительного нерва, амилоидоза, синдрома антифосфолипидных антител (APS), аутоиммунного полигландулярного синдрома II типа (APS II), аутоиммунного заболевания щитовидной железы (AITD), болезни Грейвса, аутоиммунного адреналита и вульгарной пузырчатки.

153. Способ по любому из пп.148 и 150-152, в котором заболеванием, расстройством или состоянием является В-клеточный рак, а раком является миелома.

154. Фармацевтическая композиция по п.140 или п.141 для применения в снижении иммунного ответа у субъекта.

155. Применение иммуномодулирующего белка по любому из пп.1-131 или фармацевтической композиции по п.140 или п.141 в производстве лекарственного средства для снижения иммунного ответа у субъекта.

156. Фармацевтическая композиция для применения по п.154 или применение по п.155, где иммунный ответ представляет собой В-клеточный иммунный ответ, где снижение иммунного ответа уменьшает или ингибирует созревание, дифференцировку и/или пролиферацию В-клеток.

157. Фармацевтическая композиция для применения, или применение по любому из п.п.154-156, где снижение иммунного ответа уменьшает циркулирующие уровни APRIL, BAFF или гетеротримера APRIL/BAFF у субъекта.

158. Фармацевтическая композиция для применения, или применение по любому из пп.154-157, где у субъекта снижается Т-клеточный иммунный ответ, при этом снижается или ингибируется костимуляция Т-клеток.

159. Фармацевтическая композиция для применения, или применение по любому из п.п.154-158, где снижение иммунного ответа лечит заболевание, расстройство или состояние у субъекта.

160. Фармацевтическая композиция по п.140 или п.141 для применения при лечении заболевания, расстройства или состояния у субъекта.

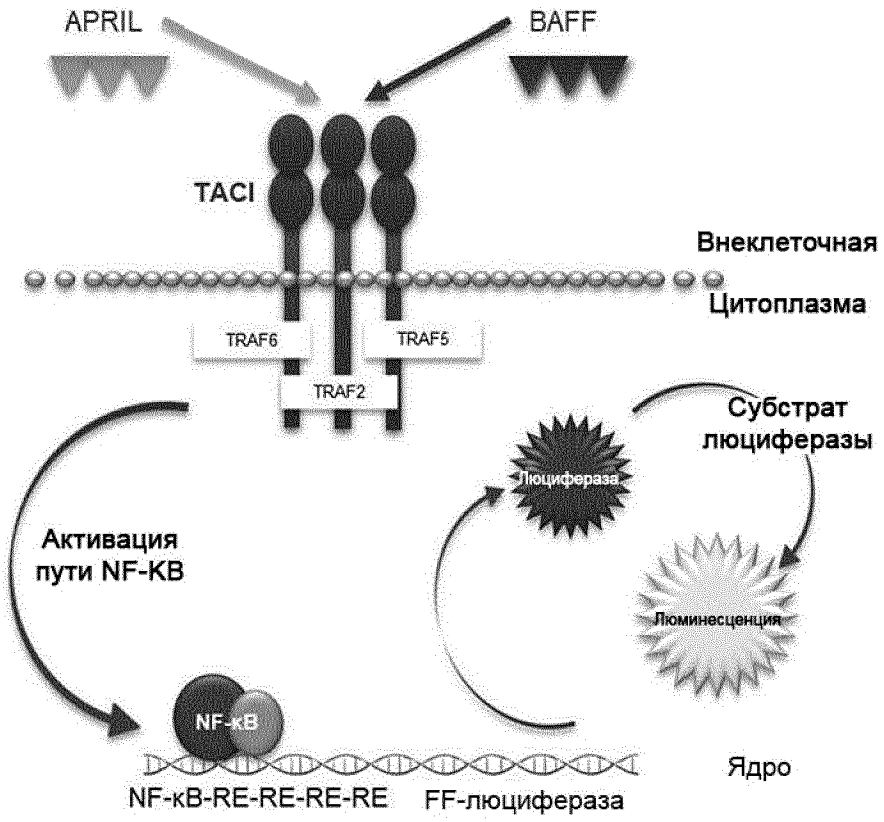
161. Применение иммуномодулирующего белка по любому из пп.1-131 или фармацевтической композиции по п.140 или п.141 в производстве лекарственного средства для лечения заболевания, расстройства или состояния у субъекта.

162. Фармацевтическая композиция для применения по п.160 или применение по п.161, где заболевание, расстройство или состояние представляет собой аутоиммунное заболевание, воспалительное состояние, В-клеточный рак, патологию, опосредованную антителами, заболевание почек, отторжение трансплантата, болезнь «трансплантат против хозяина» или вирусную инфекцию.

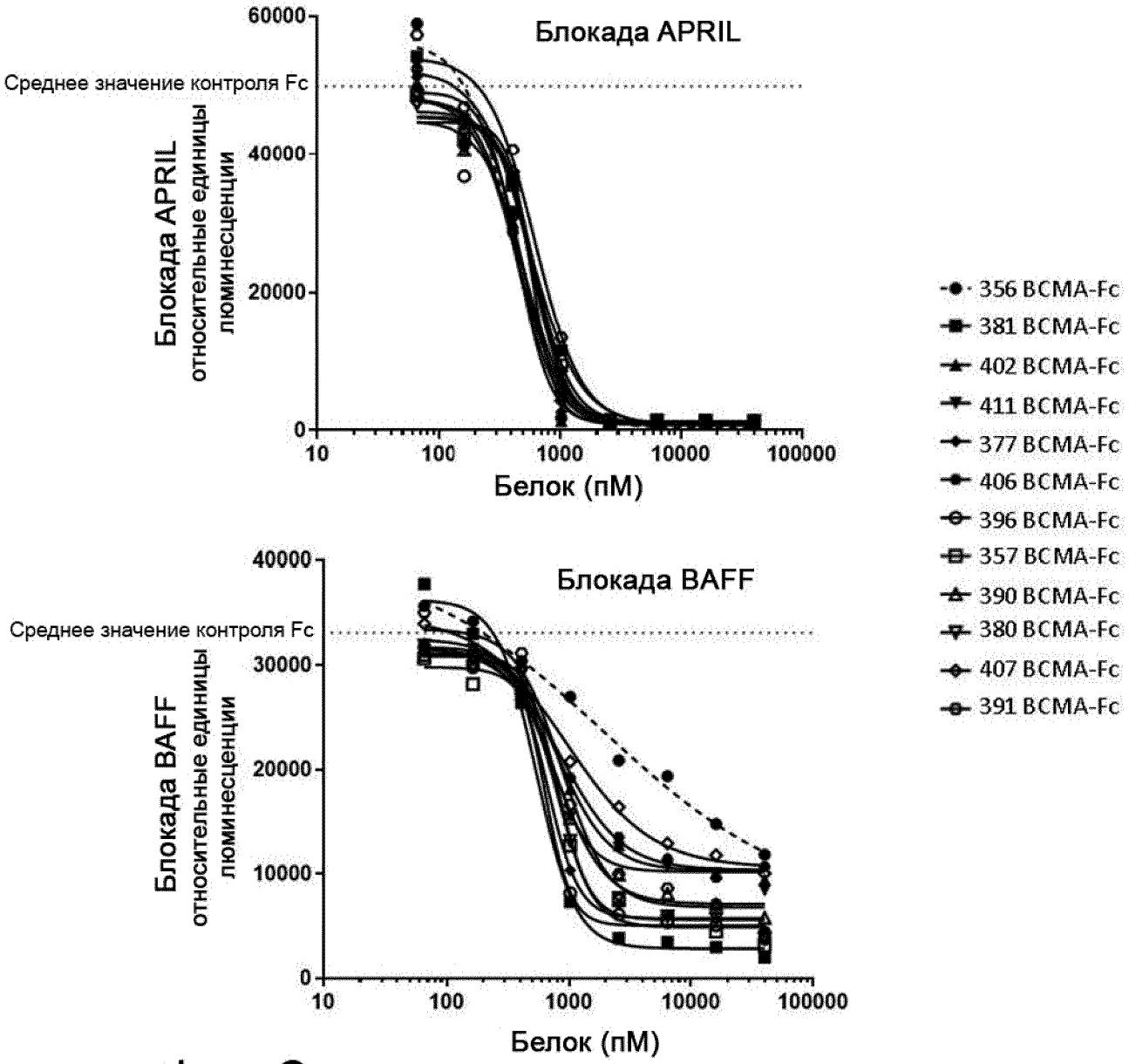
163. Фармацевтическая композиция для применения, или применение по любому из п.п.159-162, где заболевание, расстройство или состояние выбрано из группы, состоящей из системной красной волчанки (СКВ); синдрома Шегрена, склеродермии, рассеянного склероза, диабета, полимиозита, первичного билиарного цирроза, IgA-нефропатии, IgA-васкулита, неврита зрительного нерва, амилоидоза, синдрома

антифосфолипидных антител (APS), аутоиммунного полигландулярного синдрома II типа (APS II), аутоиммунного заболевания щитовидной железы (AITD), болезни Грейвса, аутоиммунного адреналита и вульгарной пузырчатки.

164. Фармацевтическая композиция для применения, или применение по любому из п.п.159-162, где заболевание, расстройство или состояние представляет собой В-клеточный рак, а рак представляет собой миелому.

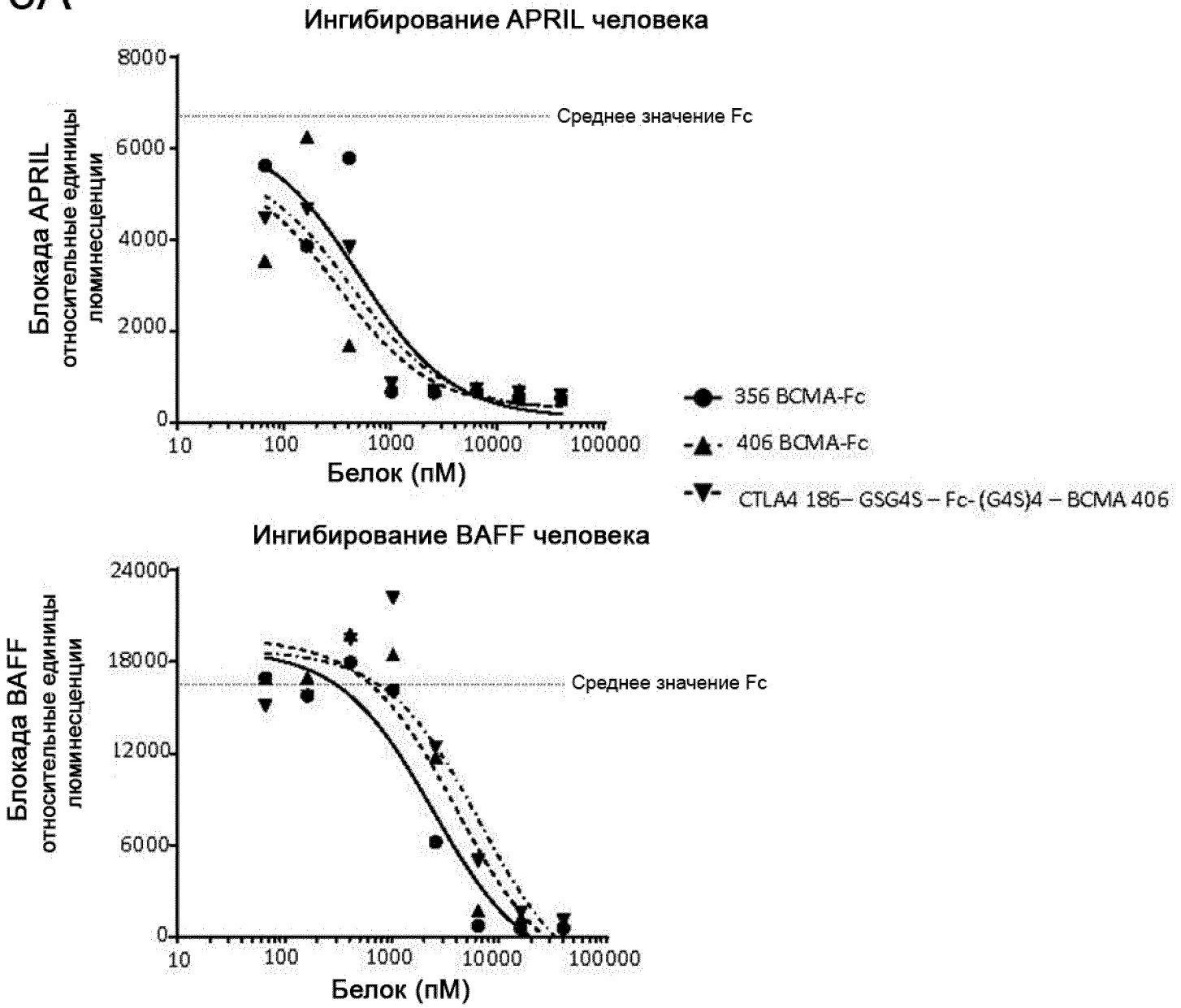

APRIL
BAFF
TACI
Внеклеточная
Цитоплазма
TRAF6
TRAF5
TRAF2
Субстрат
люциферазы
Люцифераза
Активация
пути NF-KB
Люминесценция
NF-κB
Ядро
NF-κB-RE-RE-RE-RE
FF-люцифераза

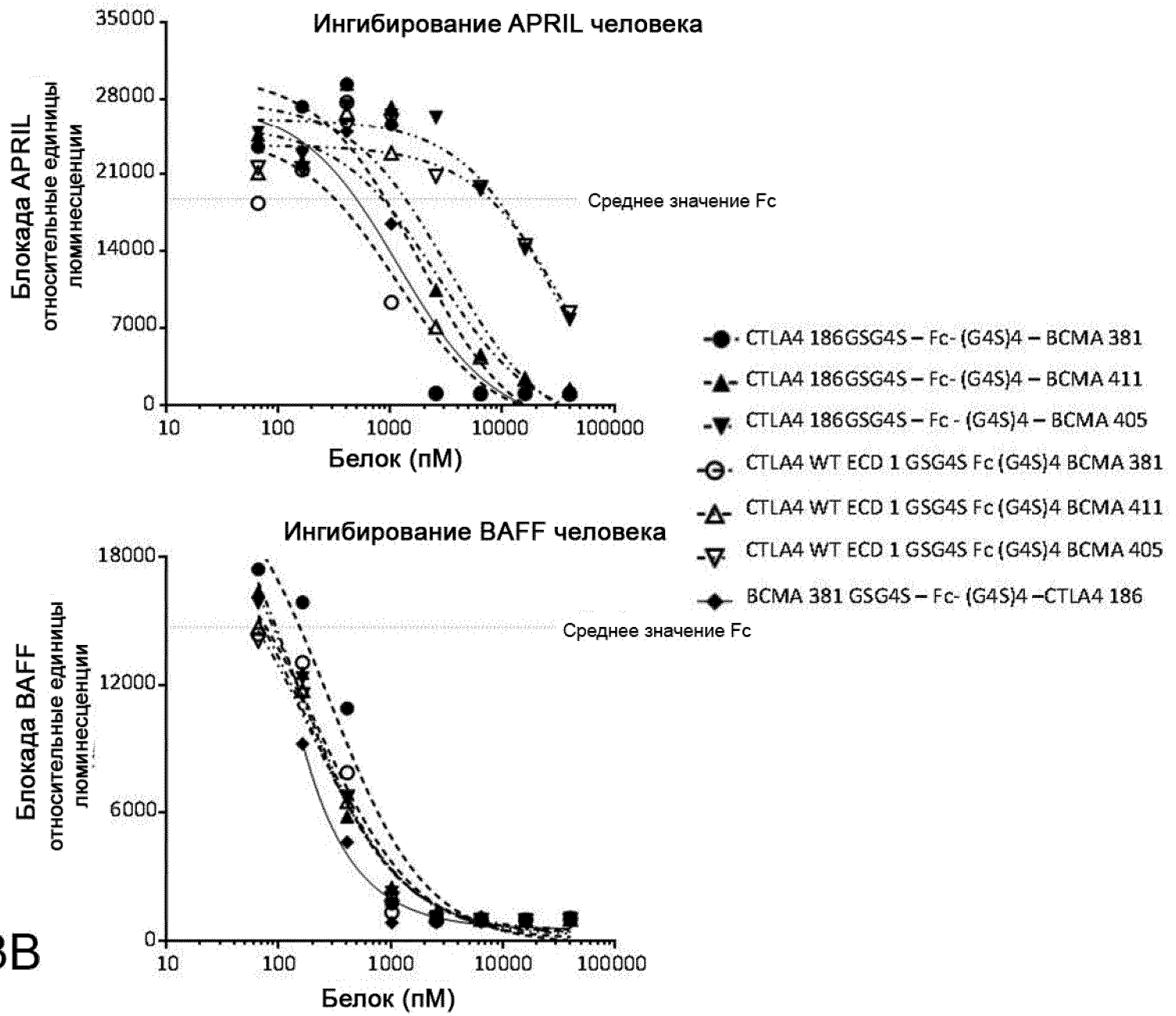
Фиг. 1


Блокада APRIL
Среднее значение контроля Fc
Блокада APRIL
относительные единицы
люминесценции
60000
40000
20000
0
10
100
1000
10000
100000
Белок (пМ)
Блокада BAFF
Среднее значение контроля Fc
Блокада BAFF
относительные единицы
люминесценции
40000
30000
20000
10000
0
10
100
1000
10000
100000
Белок (пМ)
356 BCMA-Fc
381 BCMA-Fc
402 BCMA-Fc
411 BCMA-Fc
377 BCMA-Fc
406 BCMA-Fc
396 BCMA-Fc
357 BCMA-Fc
390 BCMA-Fc
380 BCMA-Fc
407 BCMA-Fc
391 BCMA-Fc

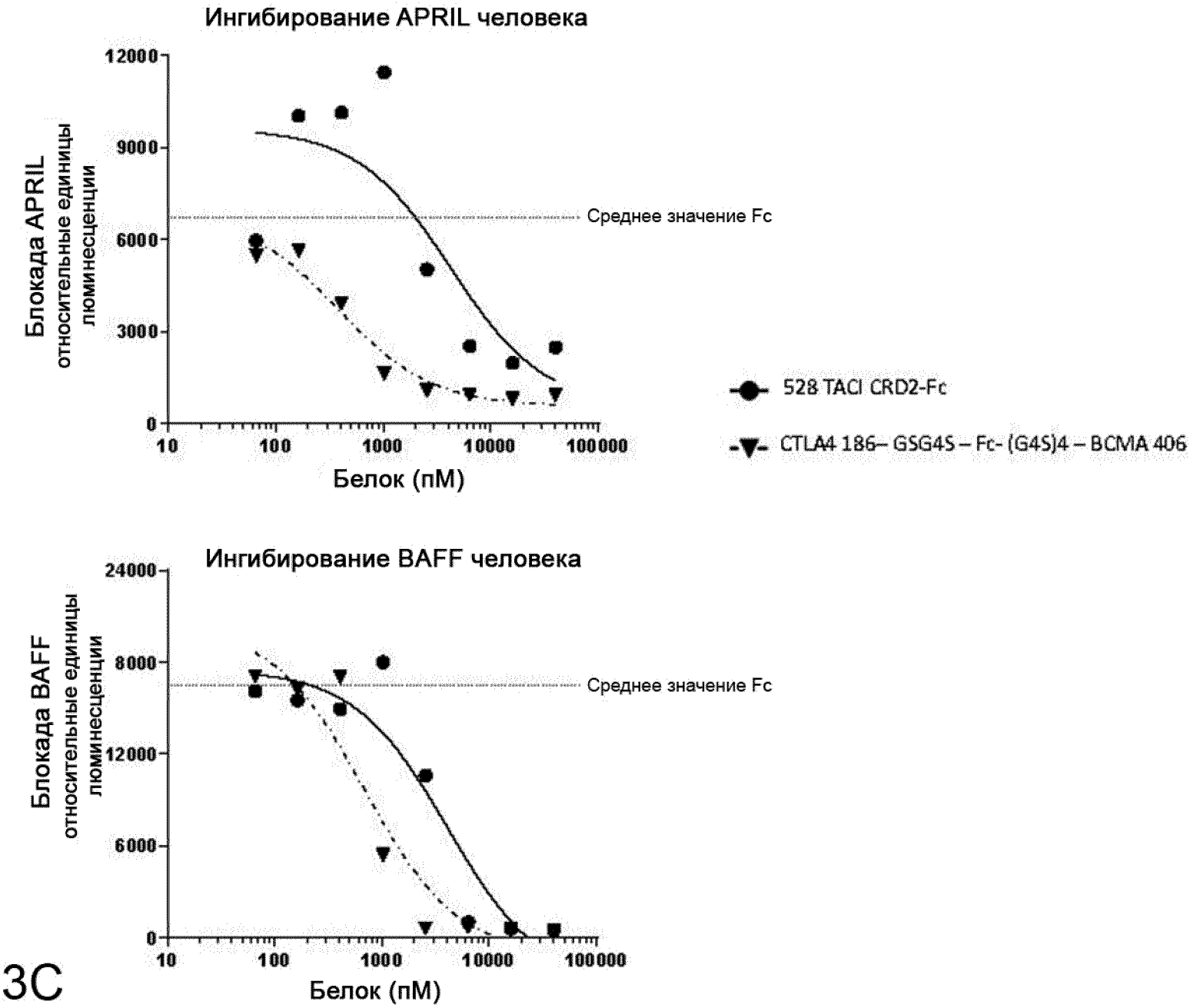
Фиг. 2

Фиг. 3A

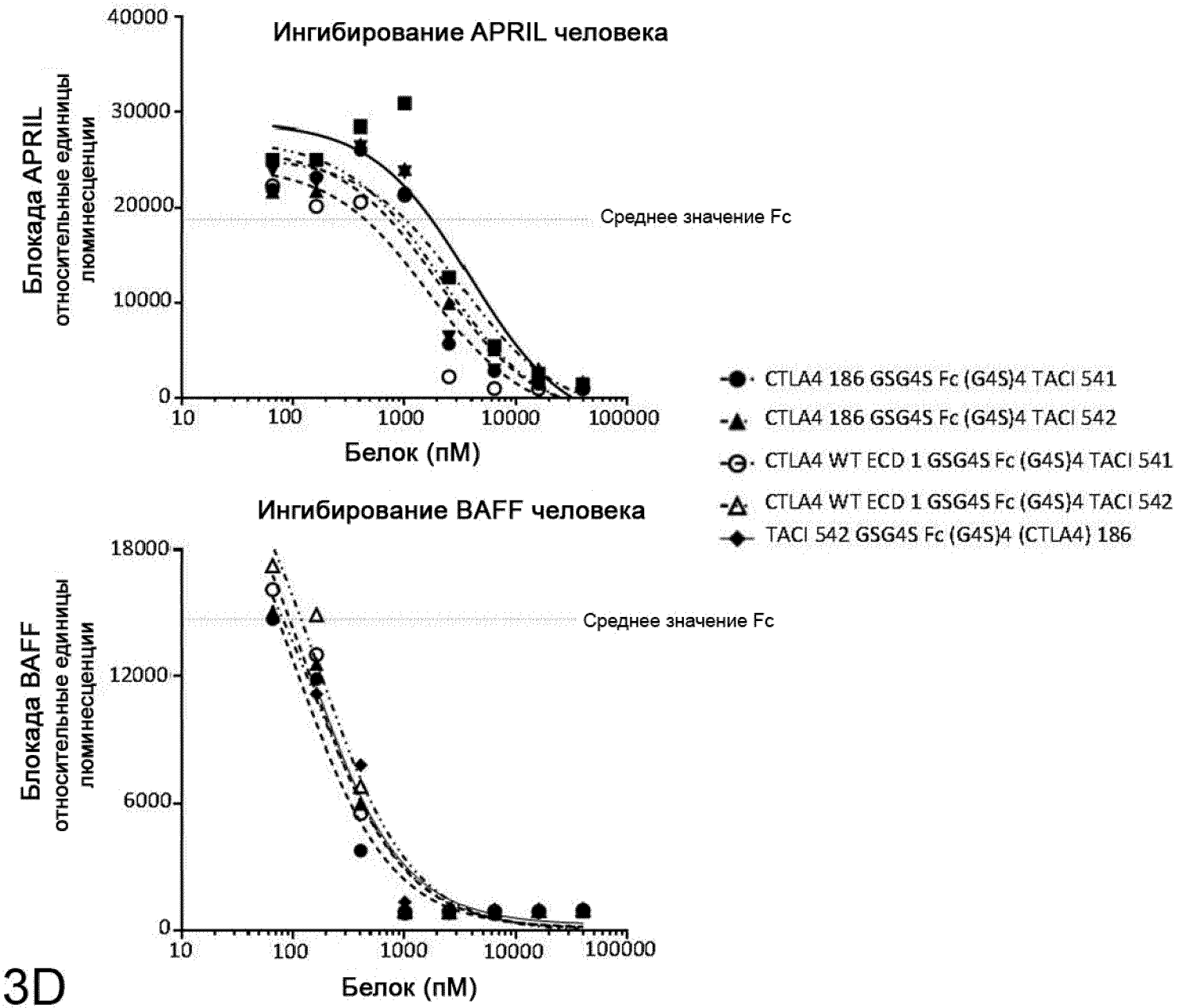

Ингибирование APRIL человека
Блокада APRIL
относительные единицы
люминесценции
8000
6000
4000
2000
0
Среднее значение Fc
10
100
1000
10000
100000
Белок (пМ)
356 BCMA-Fc
406 BCMA-Fc
CTLA4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 – BCMA 406
Ингибирование BAFF человека
Блокада BAFF
относительные единицы
люминесценции
24000
18000
12000
6000
0
Среднее значение Fc
10
100
1000
10000
100000
Белок (пМ)


Ингибирование APRIL человека
Блокада APRIL
относительные единицы
люминесценции
35000
28000
21000
14000
7000
0
10
100
1000
10000
100000
Белок (пМ)
Среднее значение Fc
CTLA4 186GSG4S – Fc- (G4S)4 – BCMA 381
CTLA4 186GSG4S – Fc- (G4S)4 – BCMA 411
CTLA4 186GSG4S – Fc - (G4S)4 – BCMA 405
CTLA4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 381
CTLA4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 411
CTLA4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 405
BCMA 381 GSG4S – Fc- (G4S)4 –CTLA4 186
Ингибирование BAFF человека
Блокада BAFF
относительные единицы
люминесценции
18000
12000
6000
0
10
100
1000
10000
100000
Белок (пМ)
Среднее значение Fc

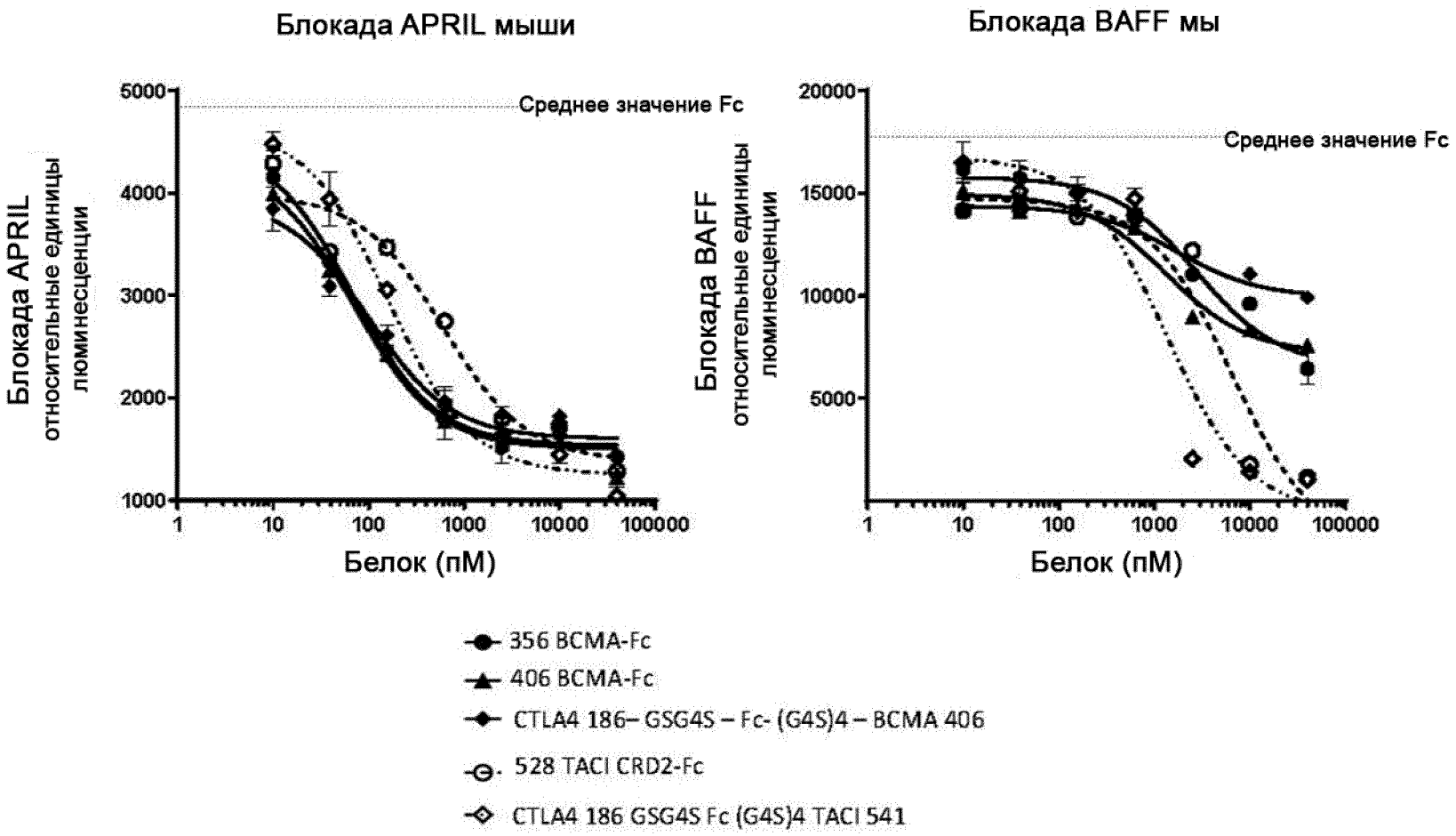
Фиг. 3B


Ингибирование APRIL человека
Блокада APRIL
относительные единицы
люминесценции
12000
9000
6000
3000
0
10
100
1000
10000
100000
Белок (пМ)
Среднее значение Fc
528 TACI CRD2-Fc
CTLA4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 – BCMA 406
Ингибирование BAFF человека
Блокада BAFF
относительные единицы
люминесценции
24000
8000
12000
6000
0
10
100
1000
10000
100000
Белок (пМ)
Среднее значение Fc

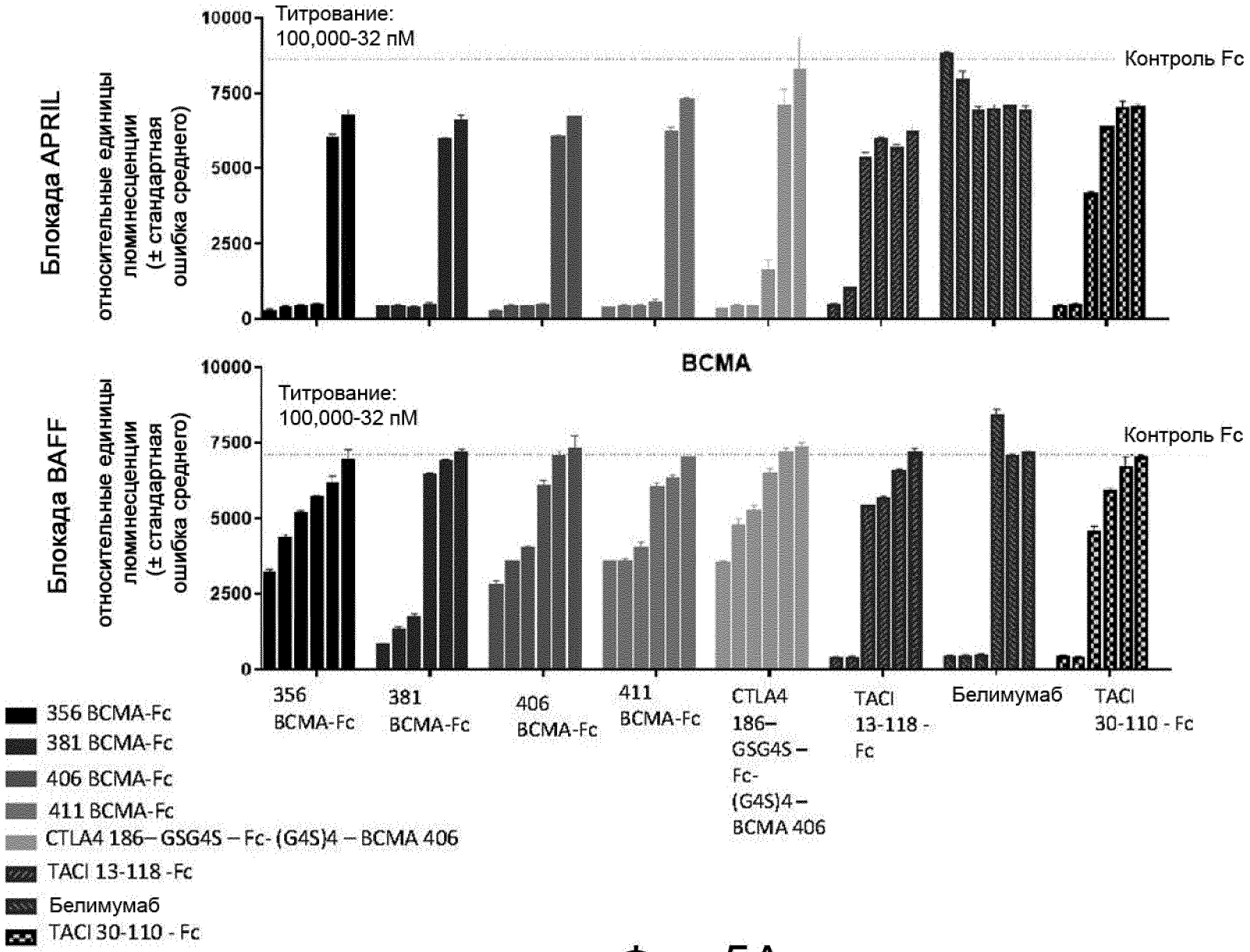
Фиг. 3C


Ингибирование APRIL человека
Блокада APRIL
относительные единицы люминесценции
40000
30000
20000
10000
0
10
100
1000
10000
100000
Белок (пМ)
Среднее значение Fc
CTLA4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541
CTLA4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 542
CTLA4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541
CTLA4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 542
TACI 542 GSG4S Fc (G4S)4 (CTLA4) 186
Ингибирование BAFF человека
Блокада BAFF
относительные единицы люминесценции
18000
12000
6000
0
10
100
1000
10000
100000
Белок (пМ)
Среднее значение Fc

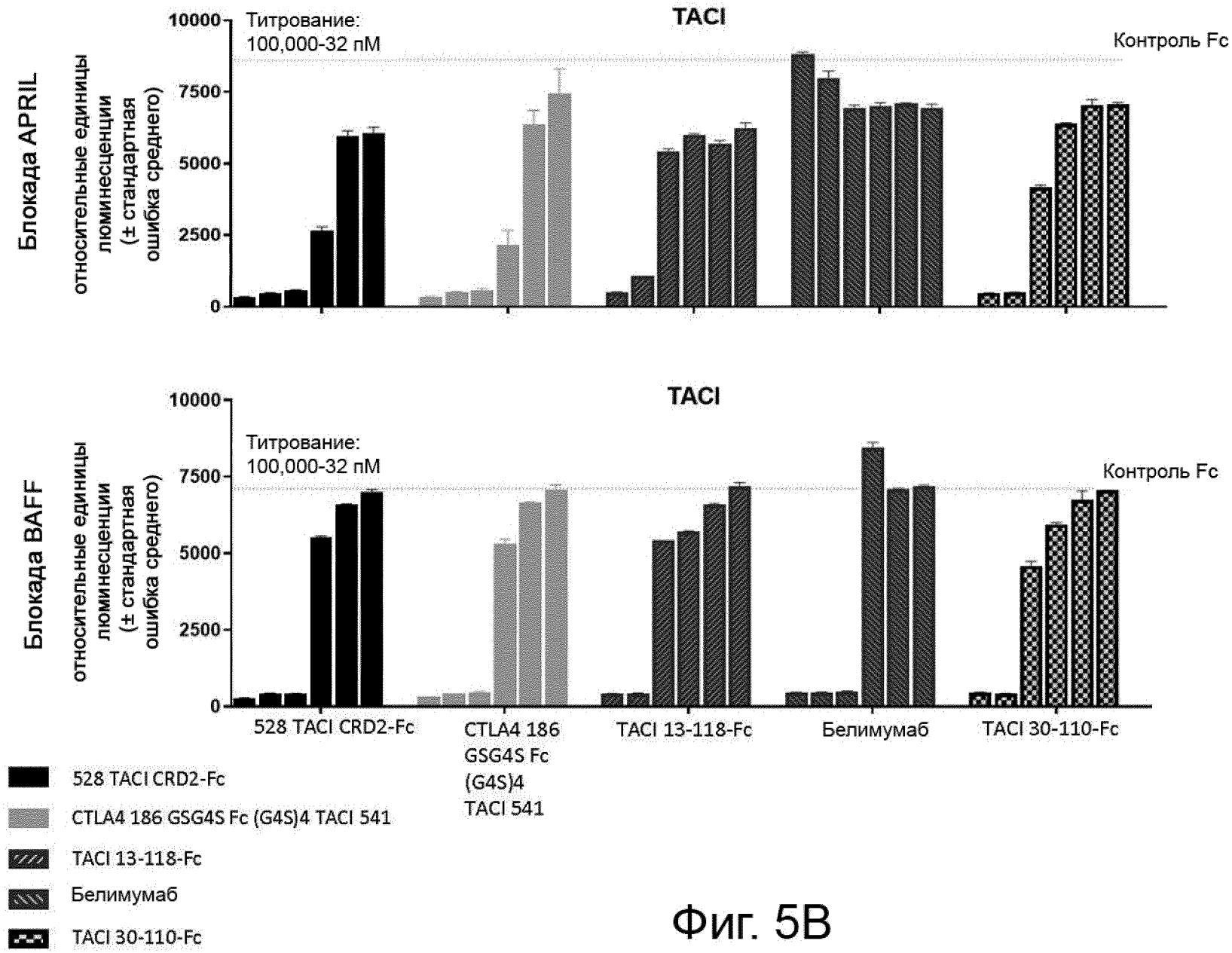
Фиг. 3D


Блокада APRIL мыши
Блокада APRIL
относительные единицы люминесценции
Среднее значение Fc
5000
4000
3000
2000
1000
1
10
100
1000
10000
100000
Белок (пМ)
Блокада BAFF мы
Блокада BAFF
относительные единицы люминесценции
Среднее значение Fc
20000
15000
10000
5000
1
10
100
1000
10000
100000
Белок (пМ)
356 BCMA-Fc
406 BCMA-Fc
CTLA4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 – BCMA 406
528 TACI CRD2-Fc
CTLA4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541

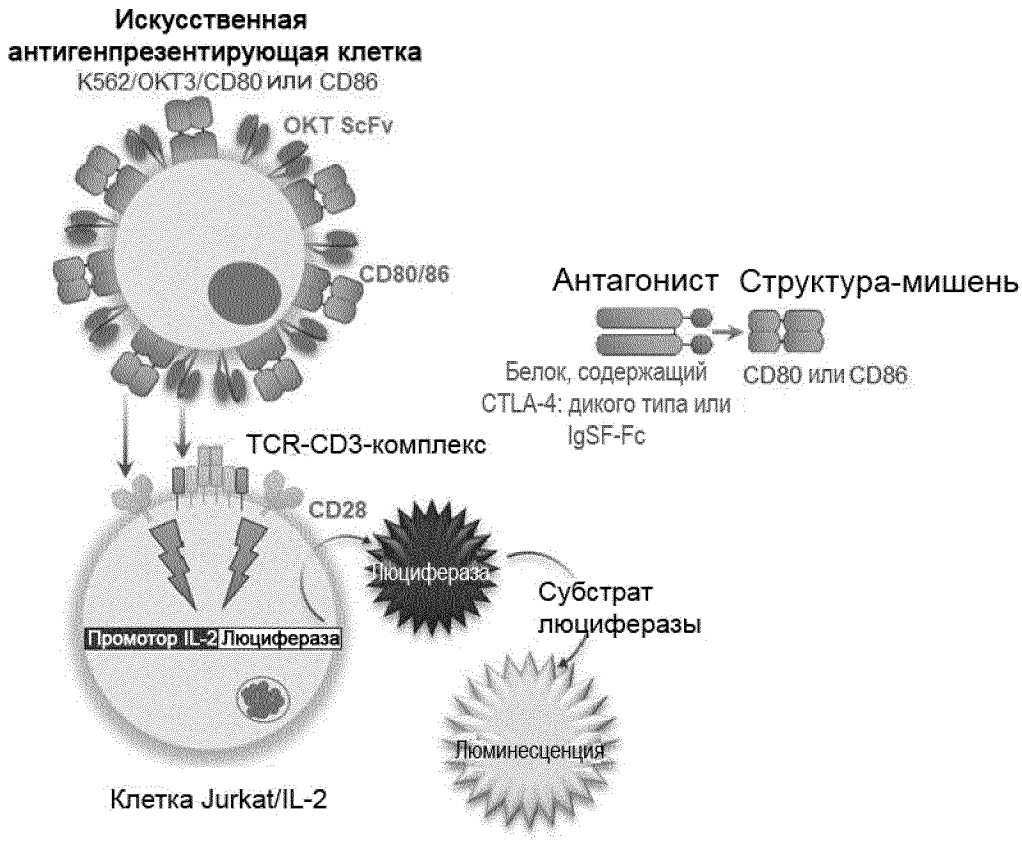
Фиг. 4


Блокада APRIL
относительные единицы люминесценции (± стандартная ошибка среднего)
Титрование: 100,000-32 пМ
Контроль Fc
10000
7500
5000
2500
0
BCMA
Блокада BAFF
относительные единицы люминесценции (± стандартная ошибка среднего)
Титрование: 100,000-32 пМ
Контроль Fc
10000
7500
5000
2500
0
356 BCMA-Fc
381 BCMA-Fc
406 BCMA-Fc
411 BCMA-Fc
CTLA4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 – BCMA 406
TACI 13-118 -Fc
Белимумаб
TACI 30-110 - Fc
356 BCMA-Fc
381 BCMA-Fc
406 BCMA-Fc
411 BCMA-Fc
CTLA4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 – BCMA 406
TACI 13-118 - Fc
Белимумаб
TACI 30-110 - Fc

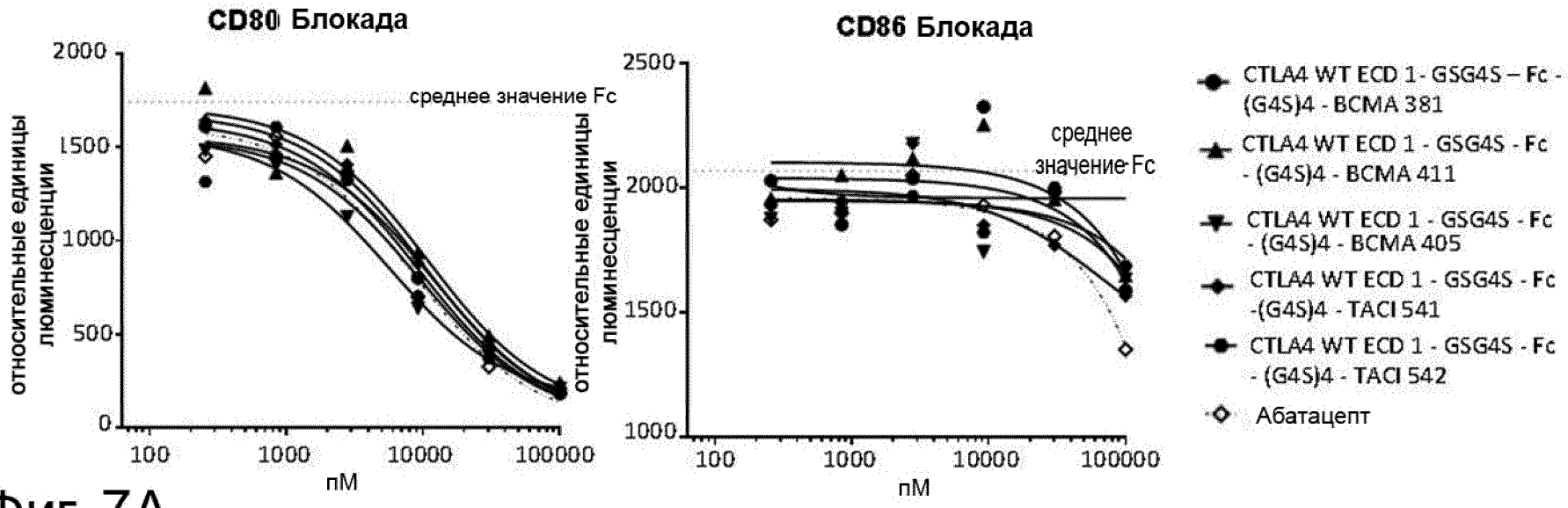
Фиг. 5A


Блокада APRIL
относительные единицы люминесценции (± стандартная ошибка среднего)
10000
7500
5000
2500
0
Титрование: 100,000-32 пМ
TACI
Контроль Fc
Блокада BAFF
относительные единицы люминесценции (± стандартная ошибка среднего)
10000
7500
5000
2500
0
Титрование: 100,000-32 пМ
TACI
Контроль Fc
528 TACI CRD2-Fc
CTLA4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541
TACI 13-118-Fc
Белимумаб
TACI 30-110-Fc
528 TACI CRD2-Fc
CTLA4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541
TACI 13-118-Fc
Белимумаб
TACI 30-110-Fc

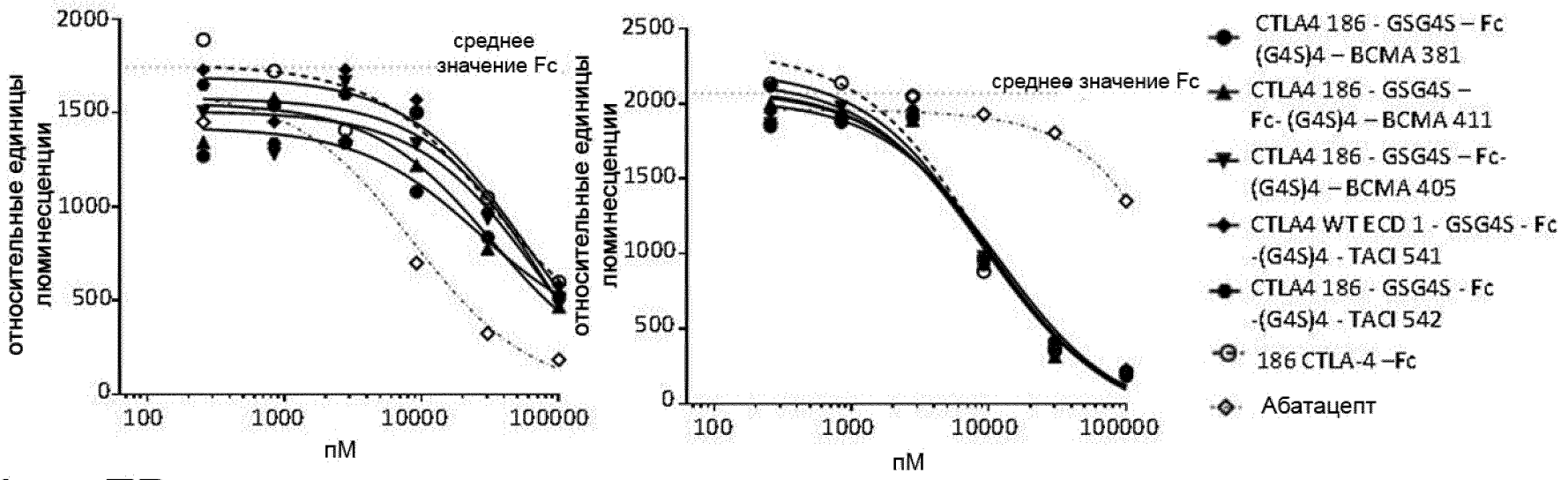
Фиг. 5B


Искусственная
антигенпрезентирующая клетка
K562/OKT3/CD80 или CD86
OKT ScFv
CD80/86
Антагонист
Структура-мишень
Белок, содержащий
CTLA-4: дикого типа или
IgSF-Fc
CD80 или CD86
TCR-CD3-комплекс
CD28
Люцифераза
Субстрат
люциферазы
Промотор IL-2
Люцифераза
Люминесценция
Клетка Jurkat/IL-2

Фиг. 6

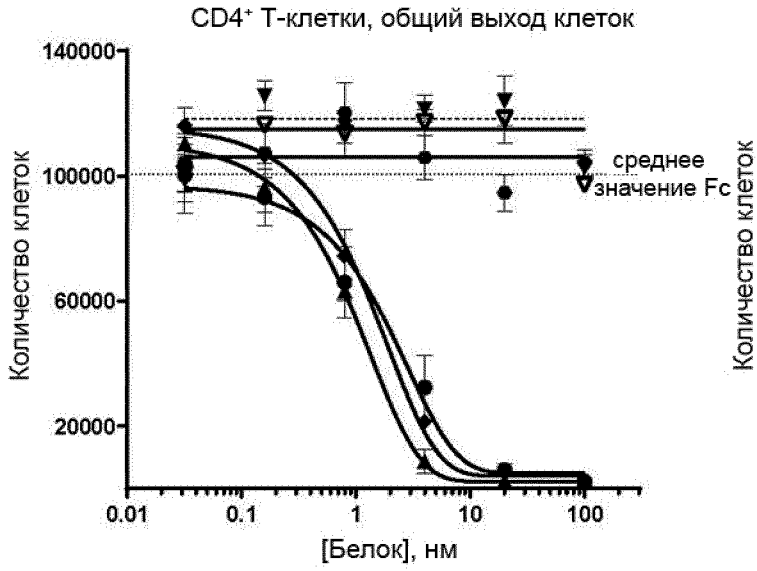

CD80 Блокада
CD86 Блокада
относительные единицы люминесценции
среднее значение Fc
пМ
CTLA4 WT ECD 1- GSG4S – Fc - (G4S)4 - BCMA 381
CTLA4 WT ECD 1 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - BCMA 411
CTLA4 WT ECD 1 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - BCMA 405
CTLA4 WT ECD 1 - GSG4S - Fc -(G4S)4 - TACI 541
CTLA4 WT ECD 1 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 542
Абатацепт

Фиг. 7A

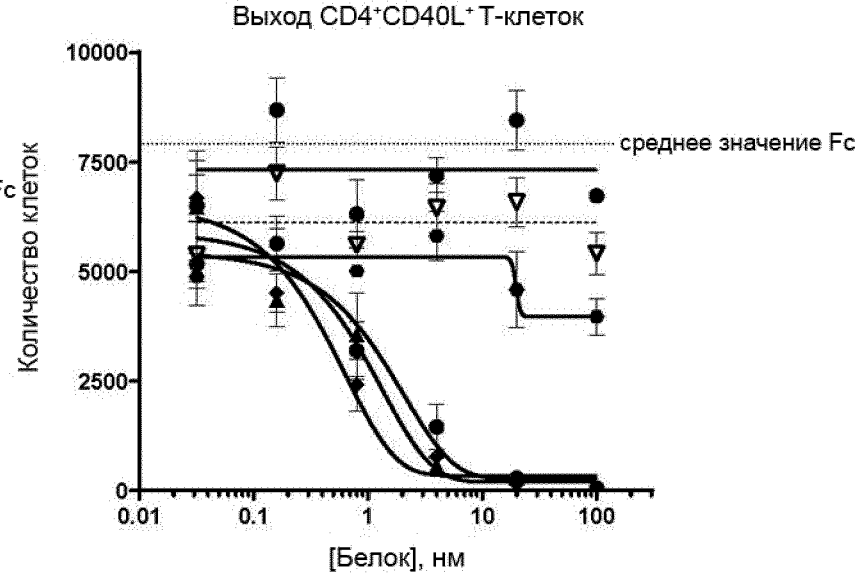

относительные единицы люминесценции
среднее значение Fc
пМ
CTLA4 186 - GSG4S – Fc (G4S)4 – BCMA 381
CTLA4 186 - GSG4S – Fc- (G4S)4 – BCMA 411
CTLA4 186 - GSG4S – Fc- (G4S)4 – BCMA 405
CTLA4 WT ECD 1 - GSG4S - Fc -(G4S)4 - TACI 541
CTLA4 186 - GSG4S - Fc -(G4S)4 - TACI 542
186 CTLA-4 –Fc
Абатацепт

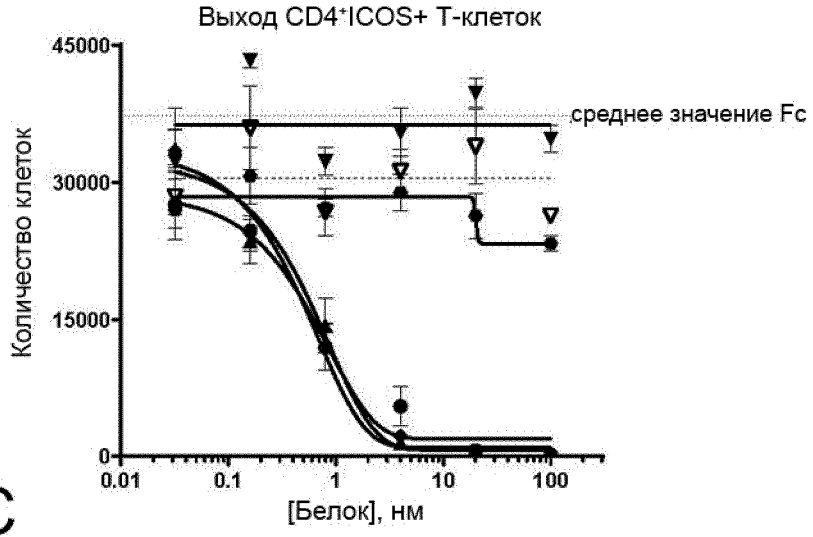
Фиг. 7B

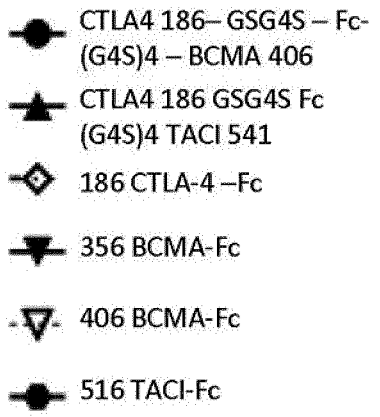
Фиг. 8A



Фиг. 8B

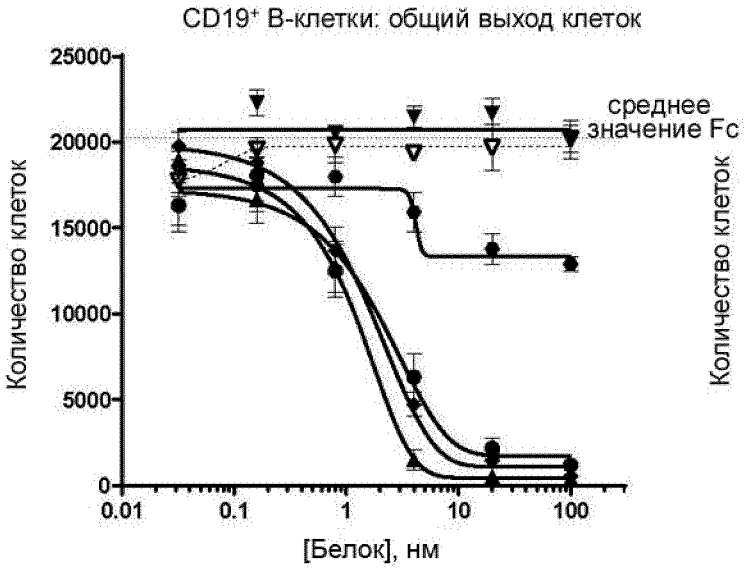




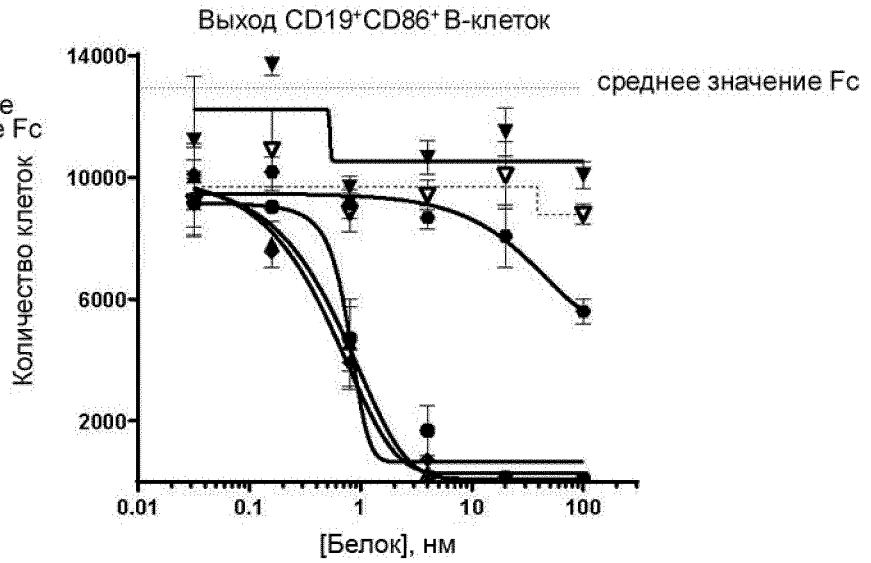


Фиг. 8C

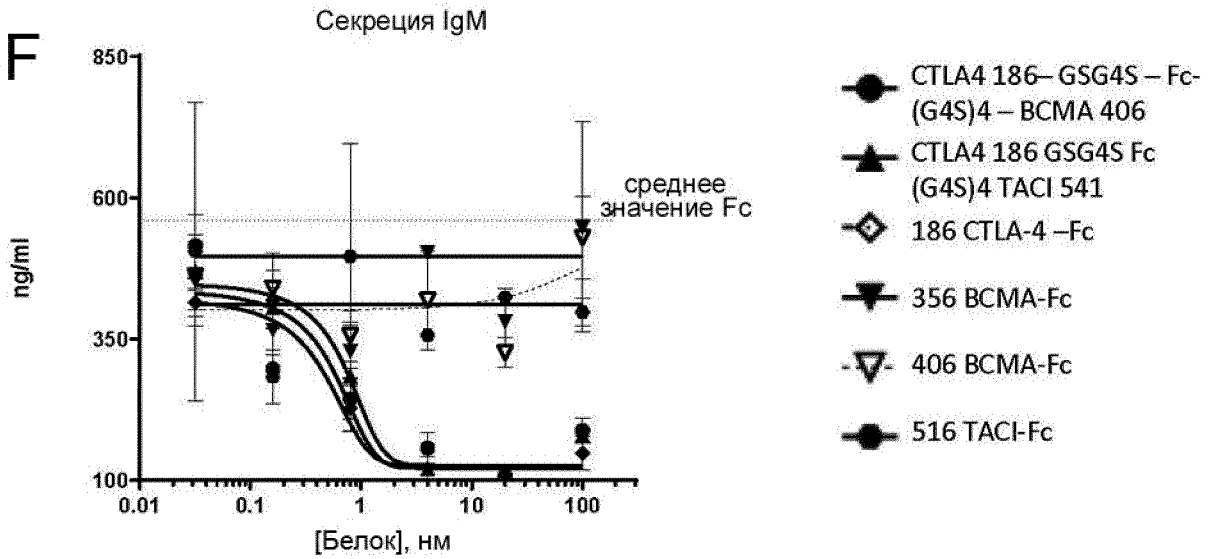
Фиг. 8D



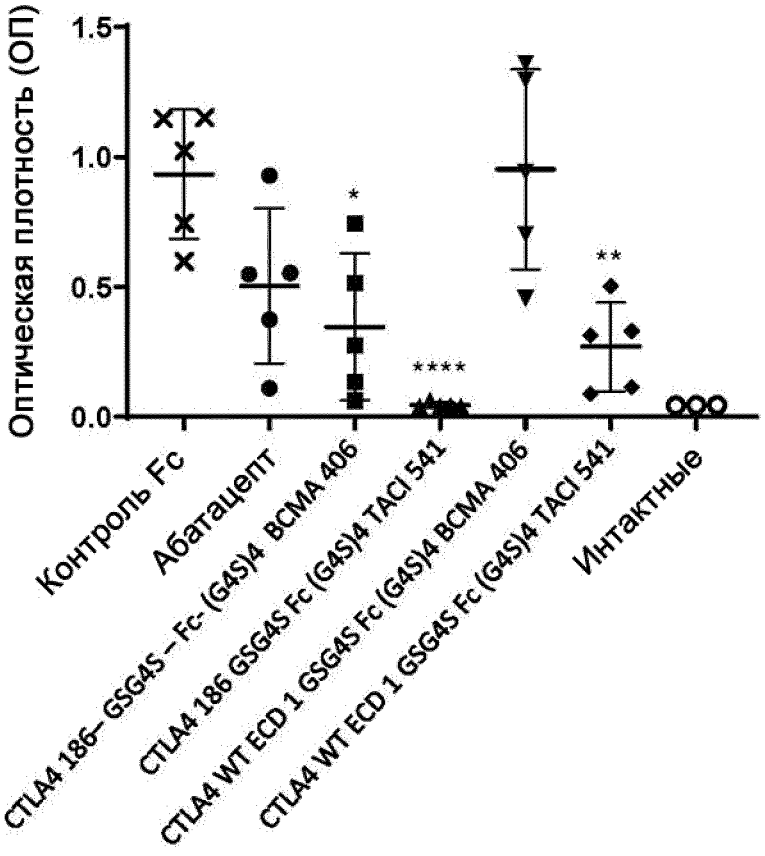
Фиг. 8E



Фиг. 8F

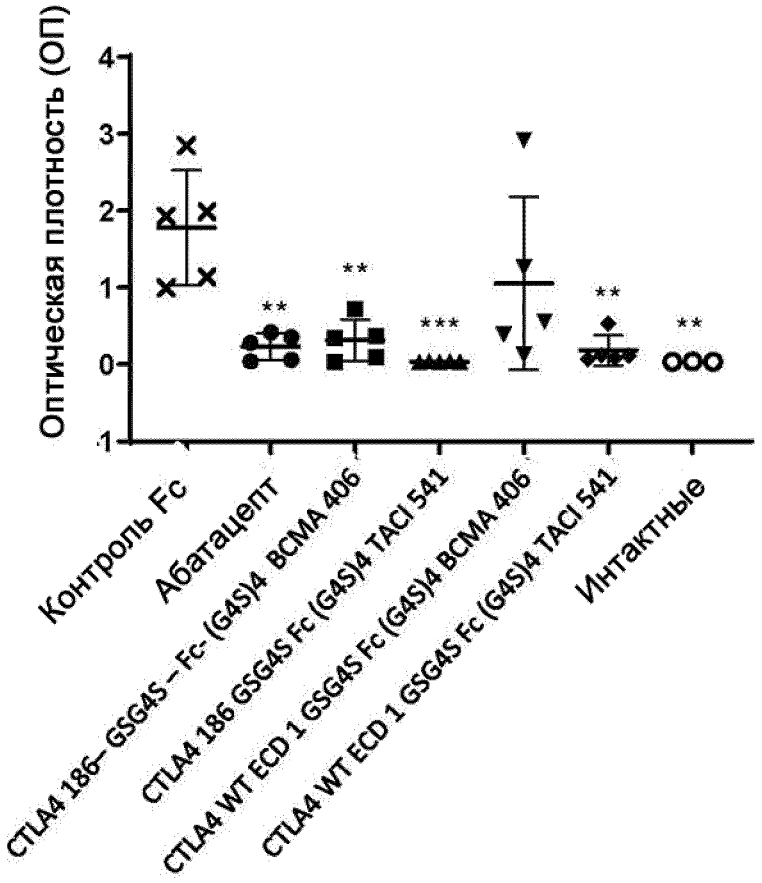


Детекция посредством антител к IgM мыши мышиных анти-KLH в сыворотке, собранной при окончании испытания (день 19 исследования) (ОП при разведении 1:1000)

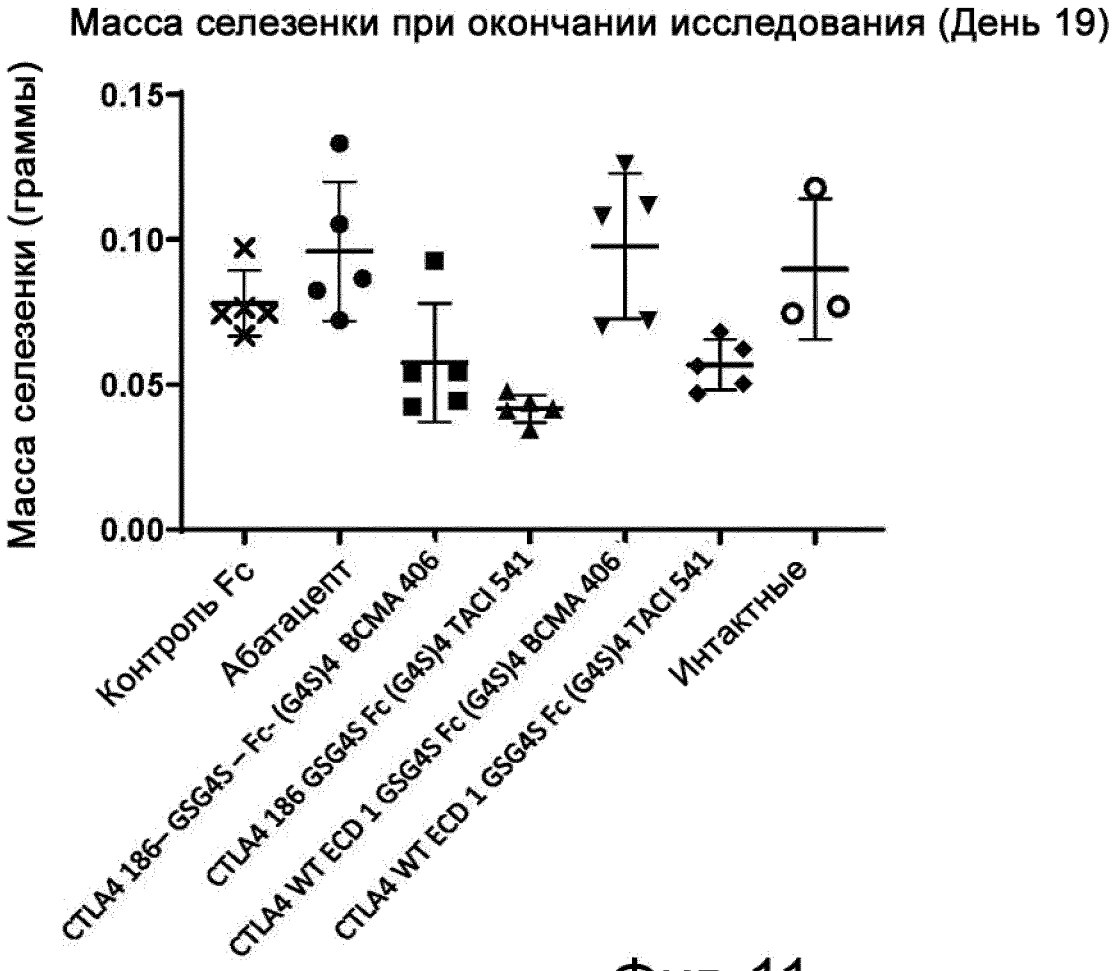


Фиг. 9

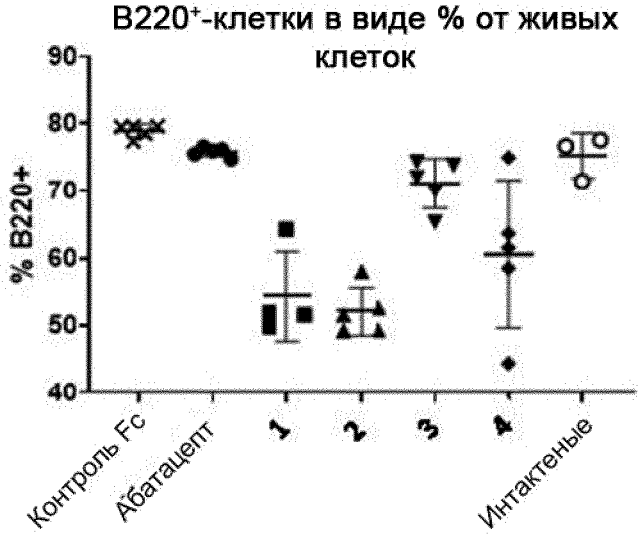
Детекция посредством антител к IgG мыши мышиных анти-KLH в сыворотке, собранной при окончании испытания (день 19 исследования) (ОП при разведении 1:1000)



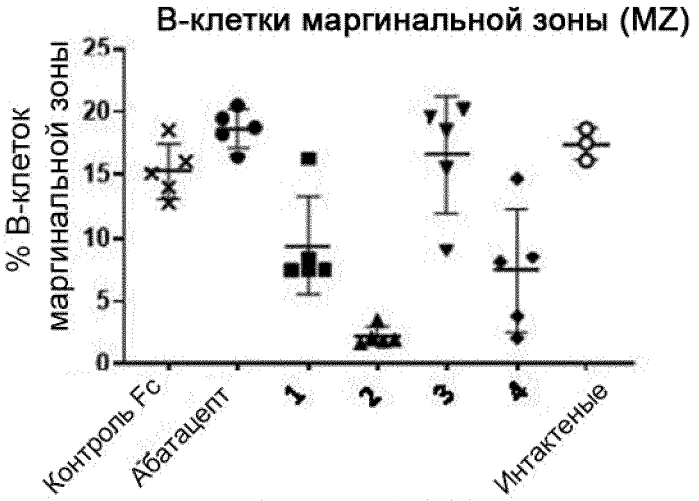
Фиг. 10


Масса селезенки при окончании исследования (День 19)
Масса селезенки (граммы)
0.15
0.10
0.05
0.00
Контроль Fc
Абатацепт
CTLA4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 BCMA 406
CTLA4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541
CTLA4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 406
CTLA4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541
Интактные

Фиг. 11



Фиг. 12A



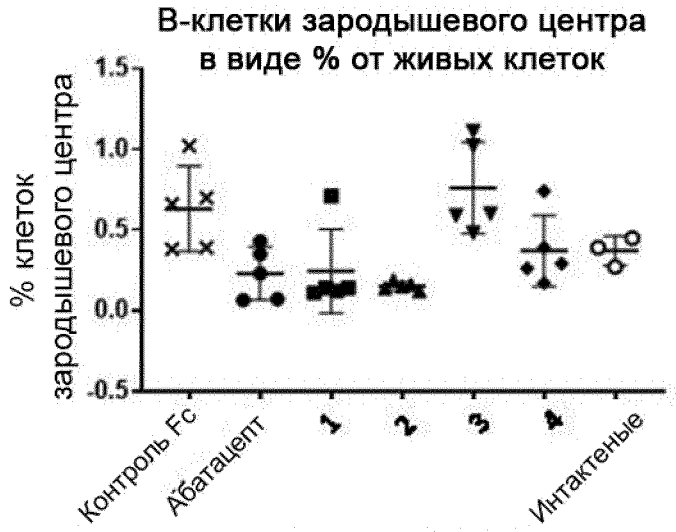
Фиг. 12B

1 CTLA4 186–GSG4S - Fc - (G4S)4 - BCMA 406

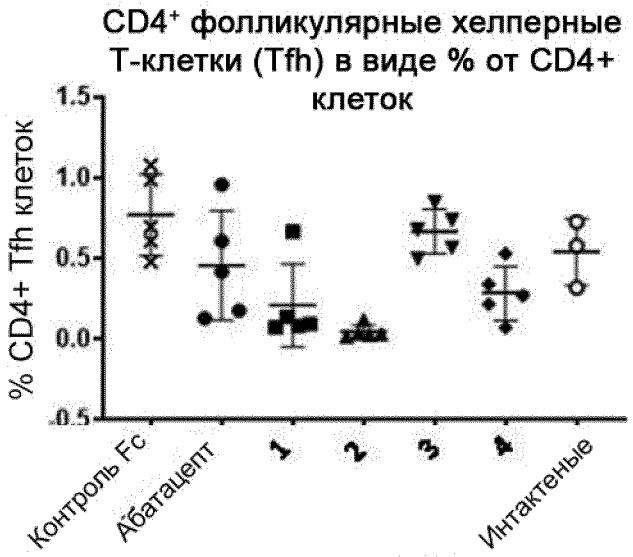
2 CTLA4 186 - GSG4S – Fc - (G4S)4 - TACI 541

3 CTLA4 WT ECD 1 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - BCMA 406

4 CTLA4 WT ECD 1 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541

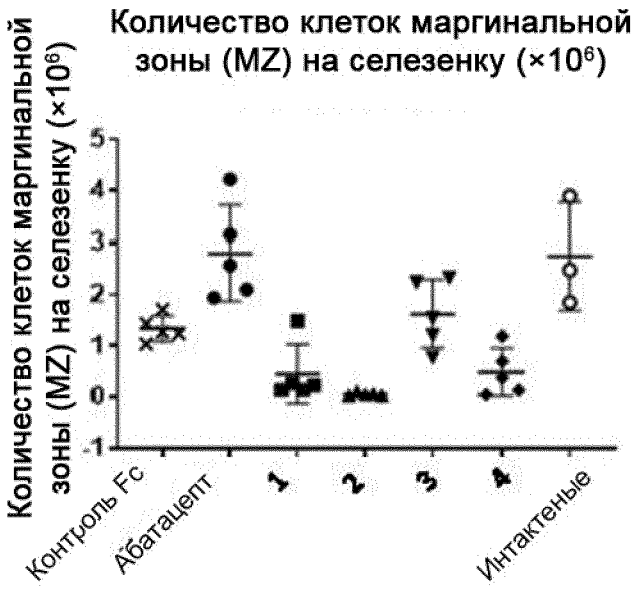


Фиг. 12C



Фиг. 12D

Фиг. 12E



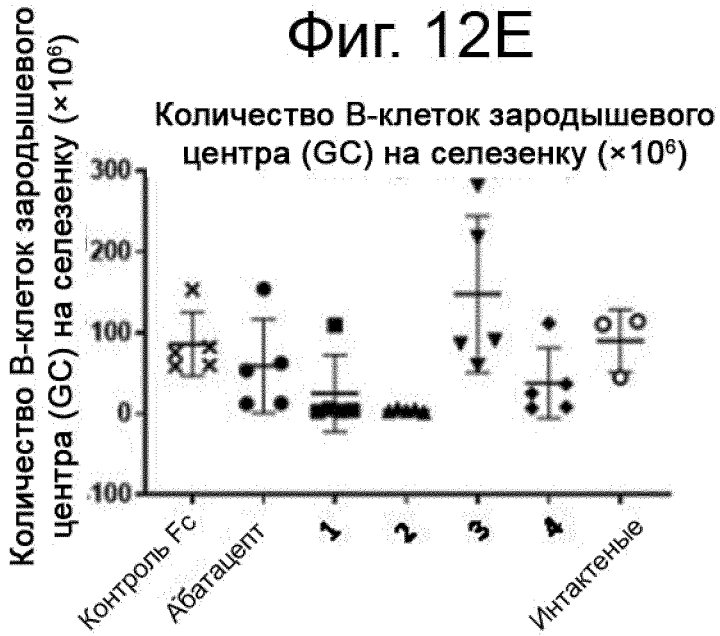
Фиг. 12F

1 CTLA4 186– GSG4S - Fc - (G4S)4 - BCMA 406

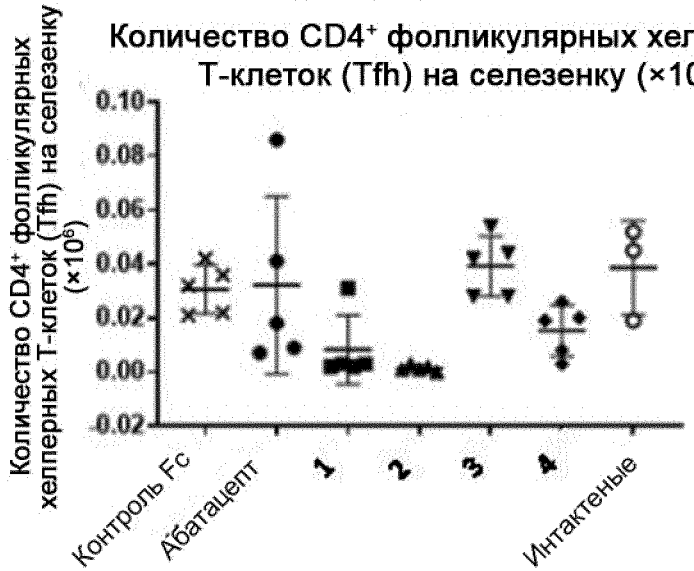
2 CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541

3 CTLA4 WT ECD 1 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - BCMA 406

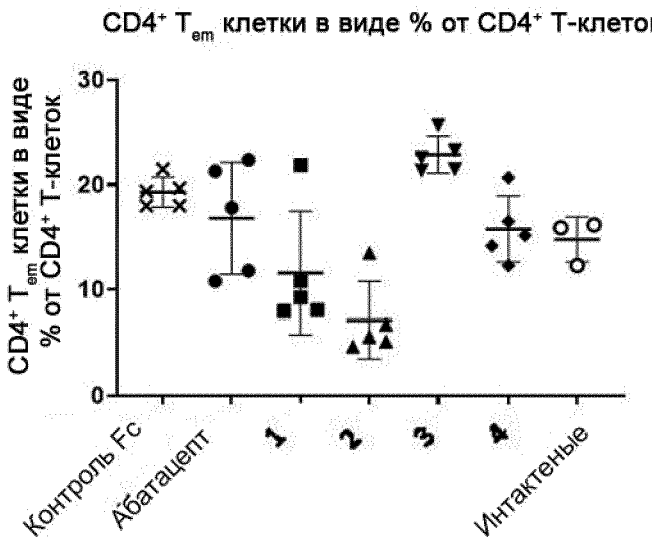
4 CTLA4 WT ECD 1 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541



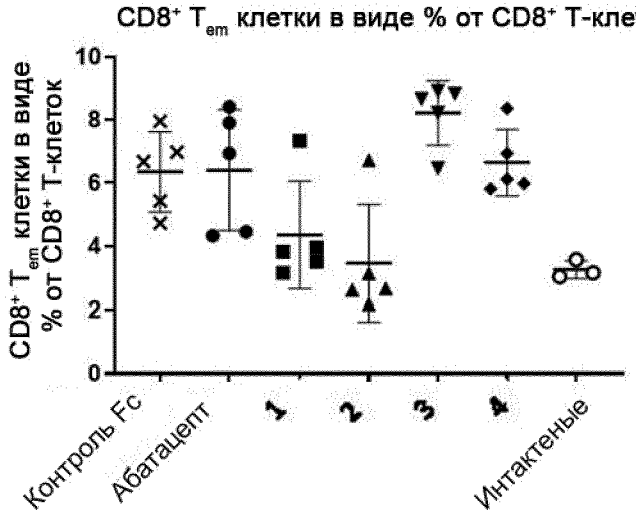
Фиг. 12G



Фиг. 12H



Фиг. 13A



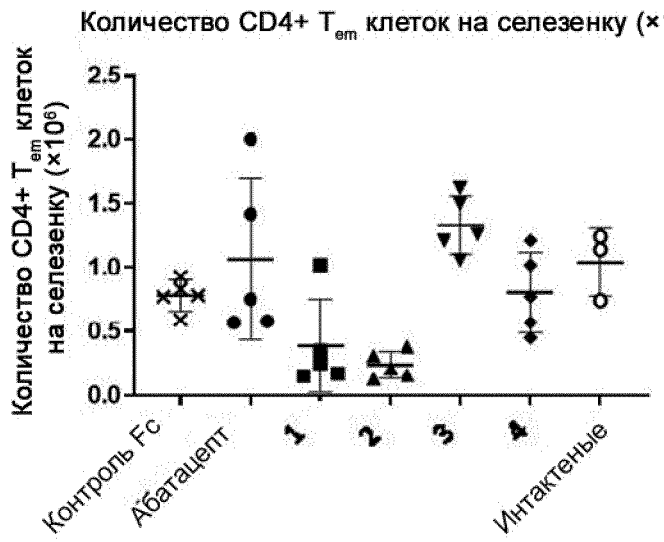
Фиг. 13B

1 CTLA4 186– GSG4S - Fc - (G4S)4 - BCMA 406

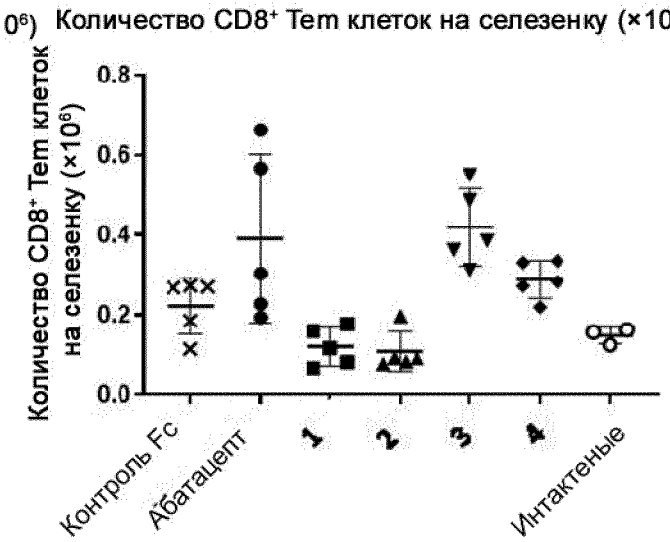
2 CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541

3 CTLA4 WT ECD 1 - GSG4S - Fc (G4S)4 - BCMA 406

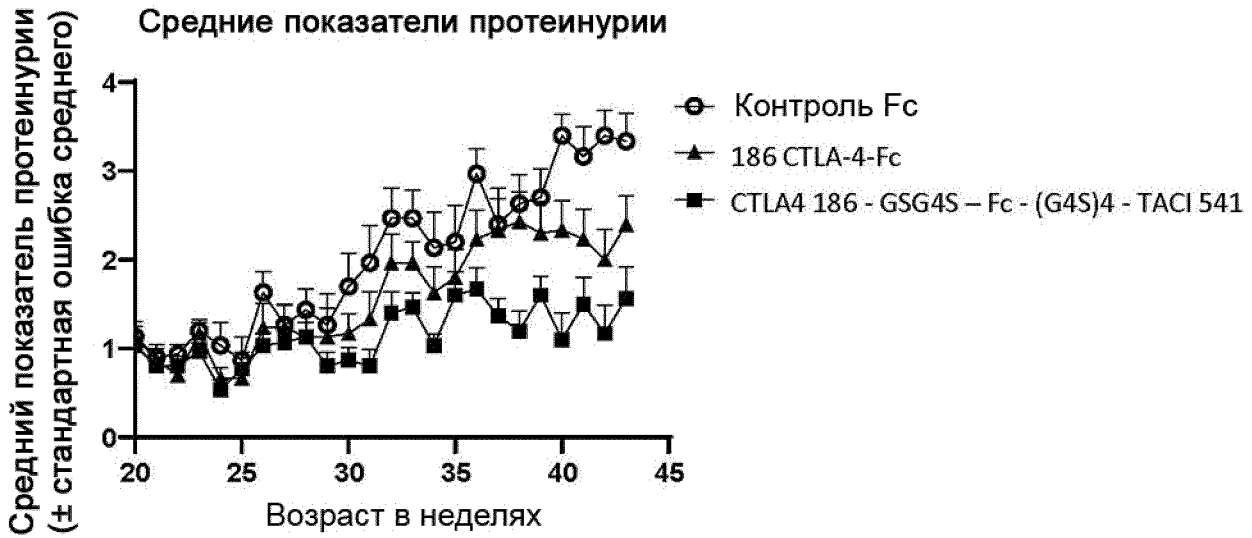
4 CTLA4 WT ECD 1 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541



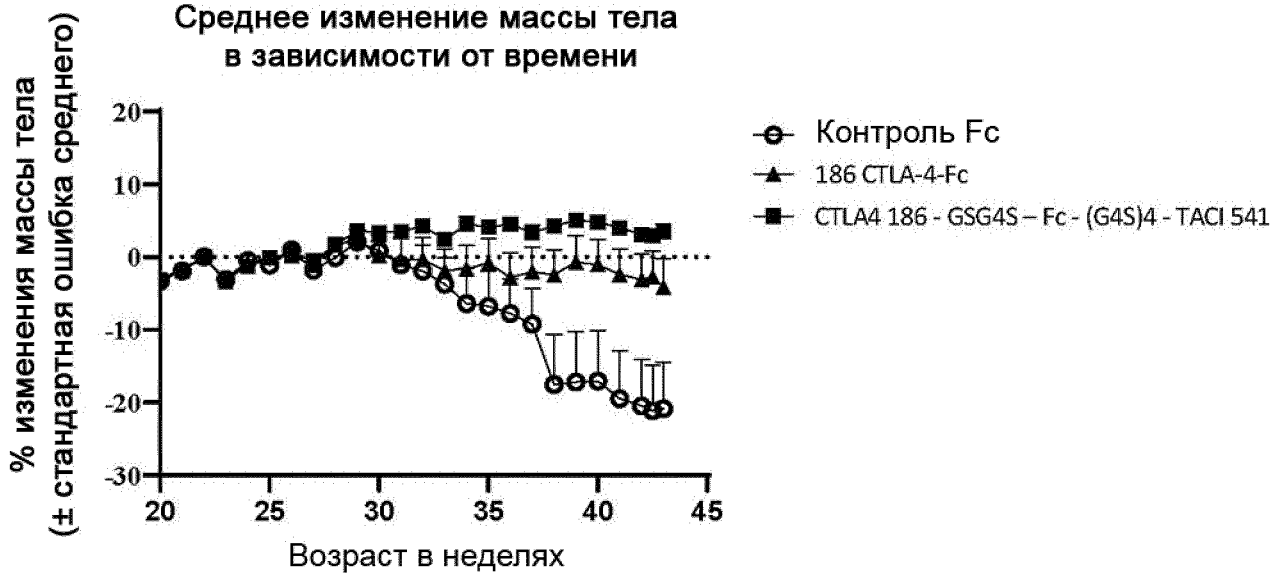
Фиг. 13C



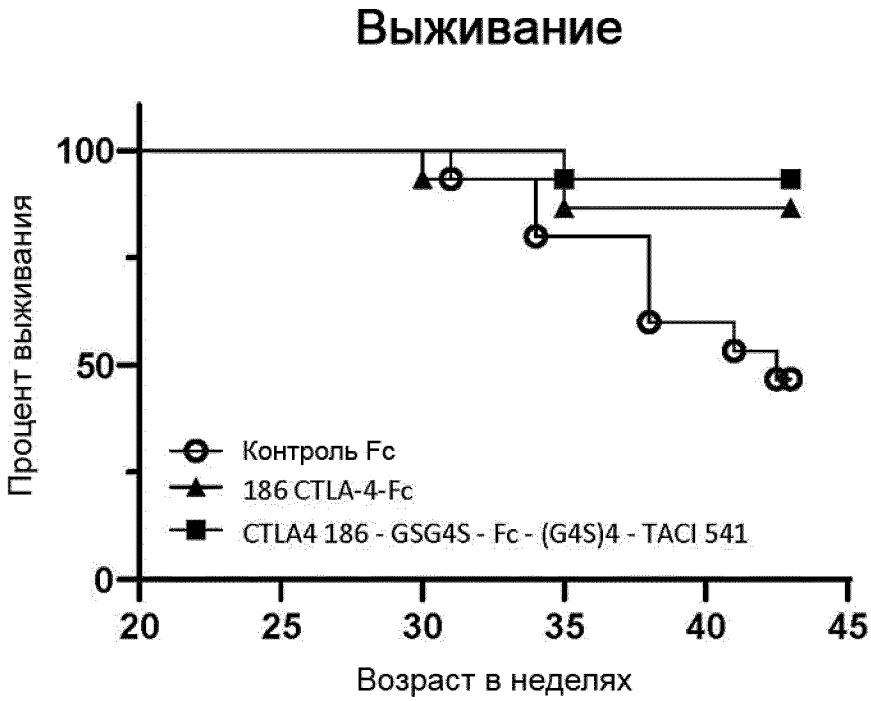
Фиг. 13D



Фиг. 14A

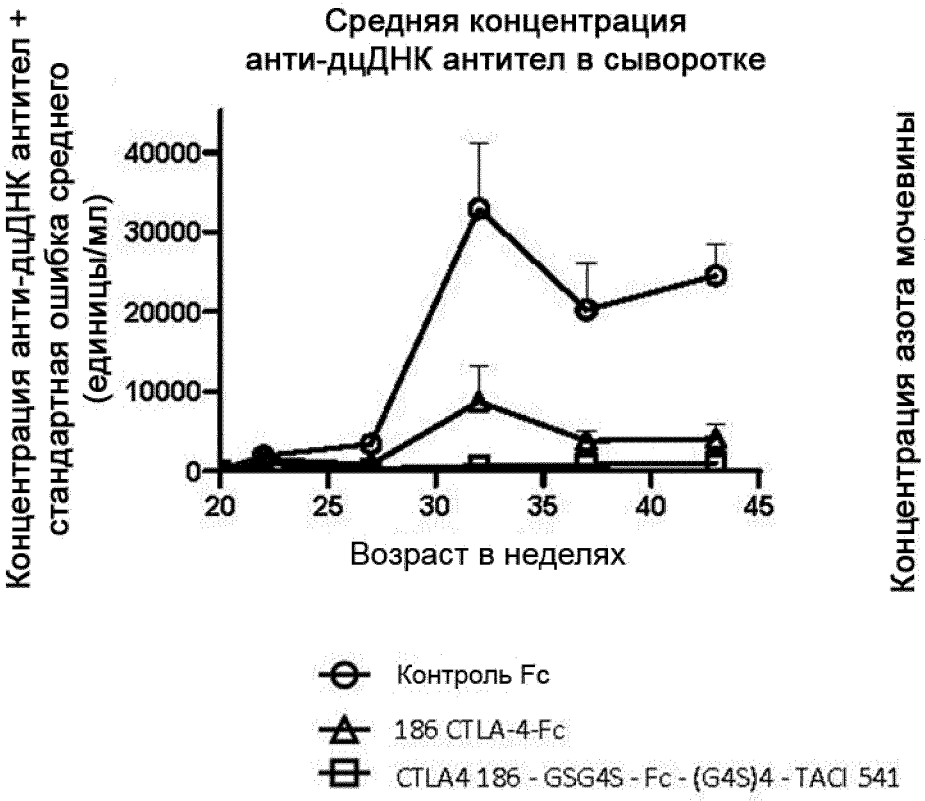


Фиг. 14B

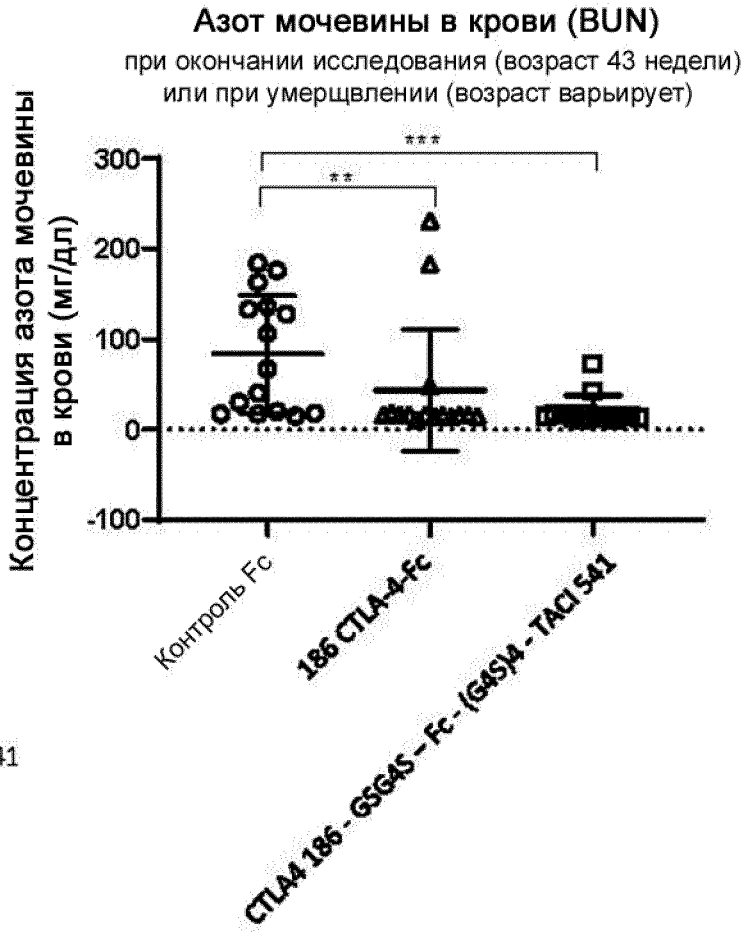

Выживание
Процент выживания
100
50
0
20
25
30
35
40
45
Возраст в неделях
Контроль Fc
186 CTLA-4-Fc
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541

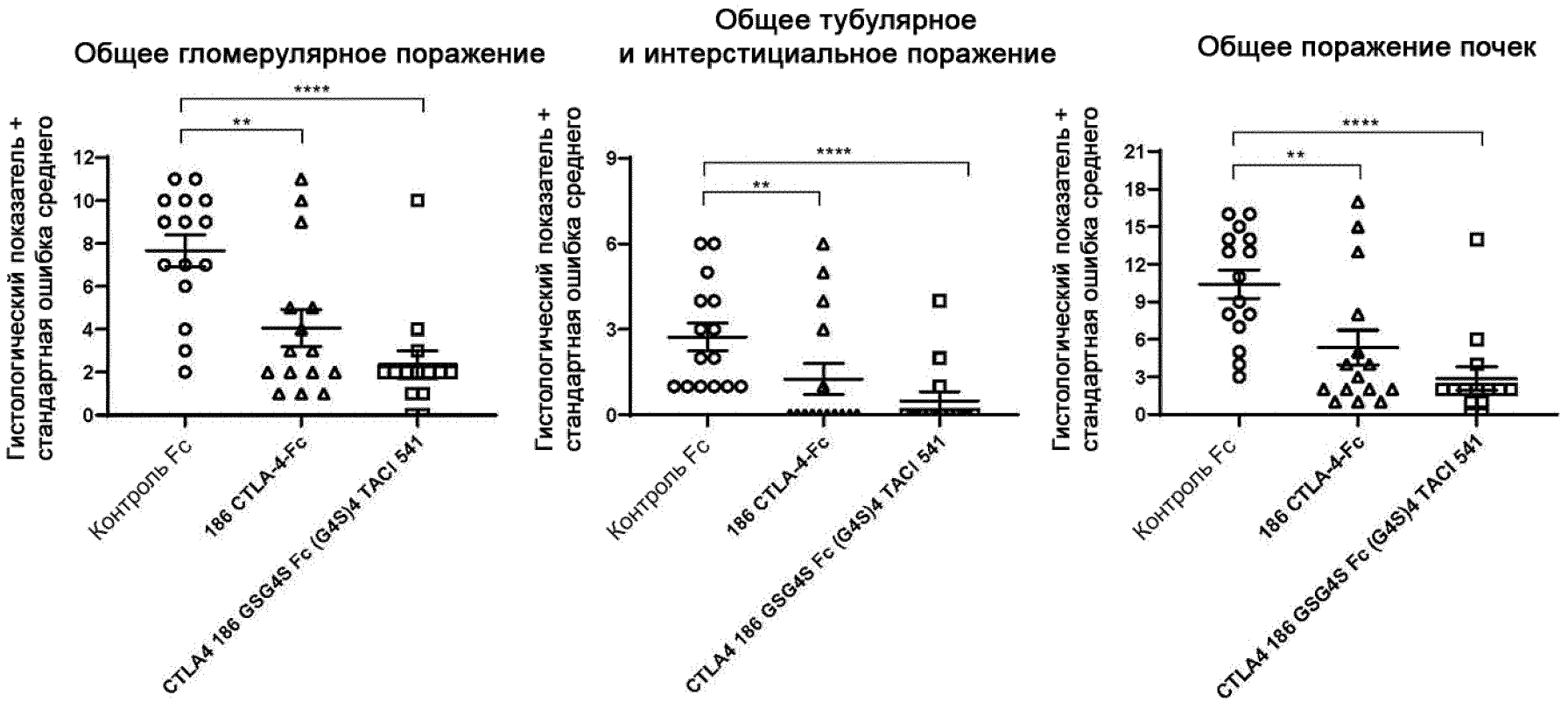
Фиг. 14C

Фиг. 14D



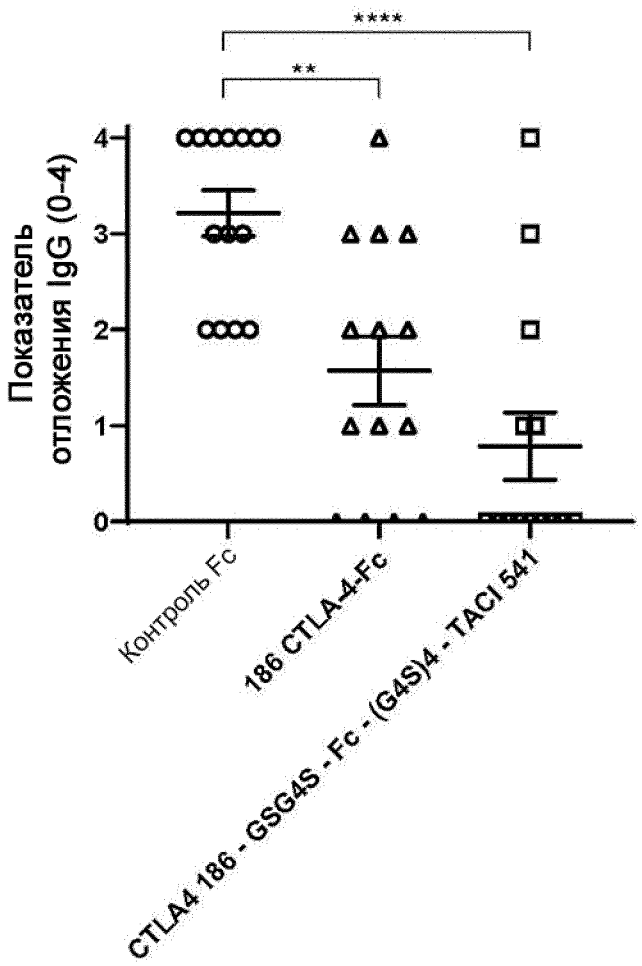
Фиг. 14E



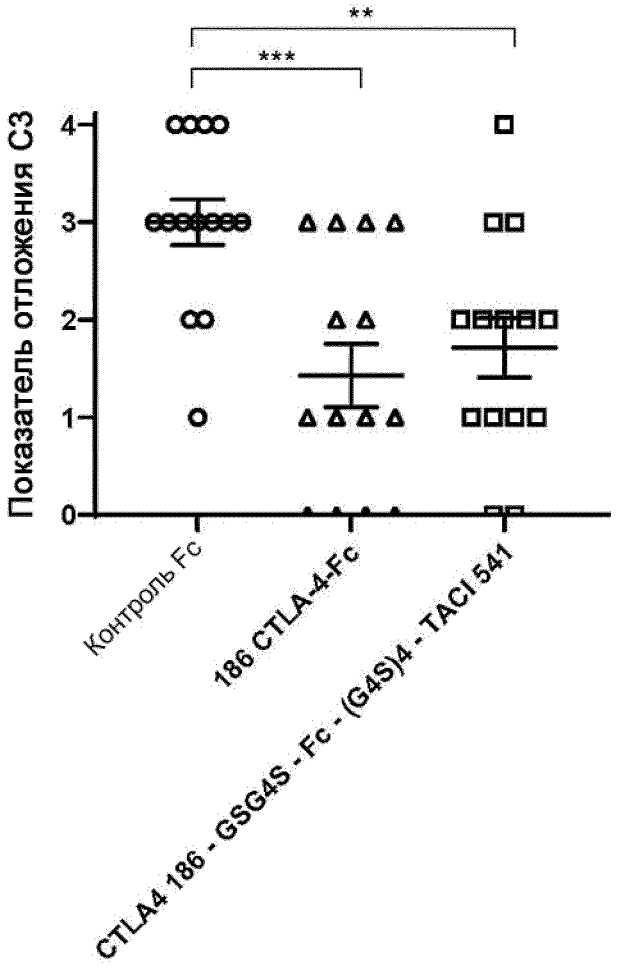

Общее гломерулярное поражение
Гистологический показатель + стандартная ошибка среднего
****
**
12
10
8
6
4
2
0
Контроль Fc
186 CTLA-4-Fc
CTLA4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541
Общее тубулярное и интерстициальное поражение
Гистологический показатель + стандартная ошибка среднего
****
**
9
6
3
0
Контроль Fc
186 CTLA-4-Fc
CTLA4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541
Общее поражение почек
Гистологический показатель + стандартная ошибка среднего
****
**
21
18
15
12
9
6
3
0
Контроль Fc
186 CTLA-4-Fc
CTLA4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541

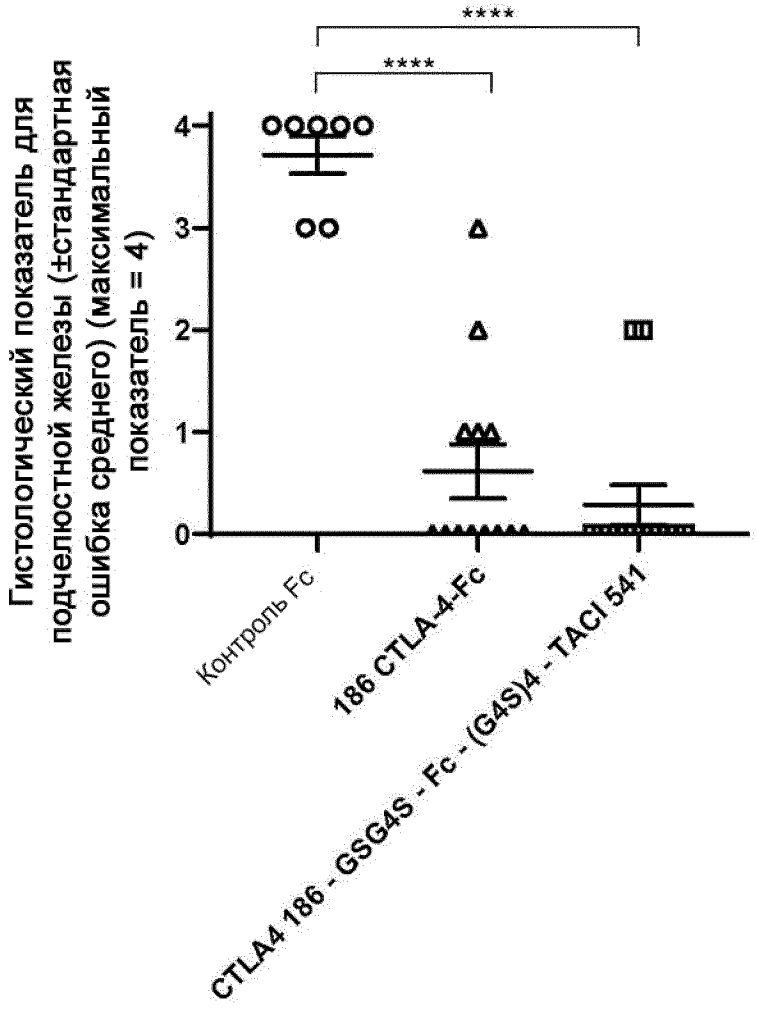
Фиг. 14F

Фиг. 14G



Фиг. 14H

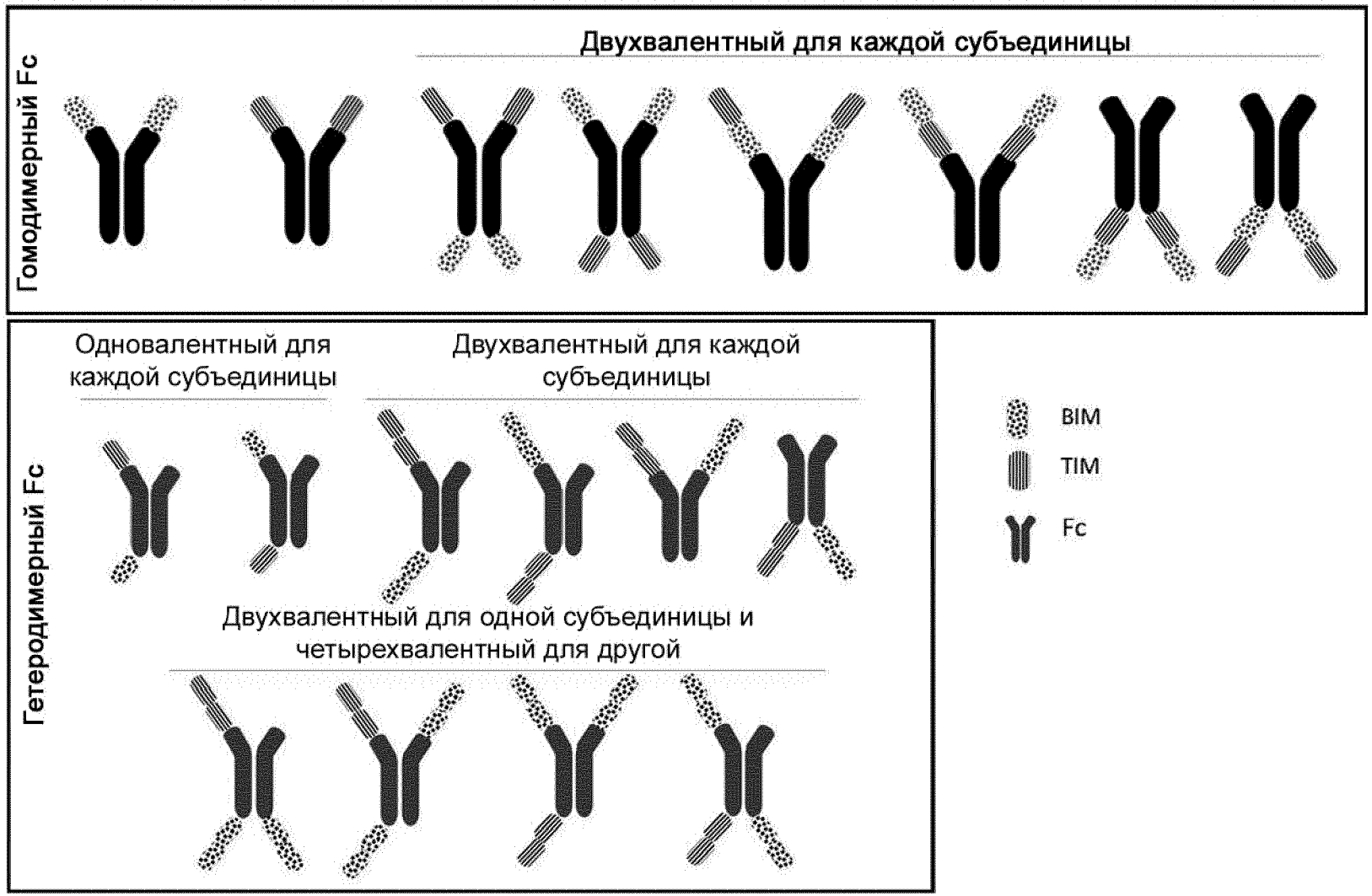



****
****
Гистологический показатель для подчелюстной железы (±стандартная ошибка среднего) (максимальный показатель = 4)
4
3
2
1
0
Контроль Fc
186 CTLA-4-Fc
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541

Фиг. 14I

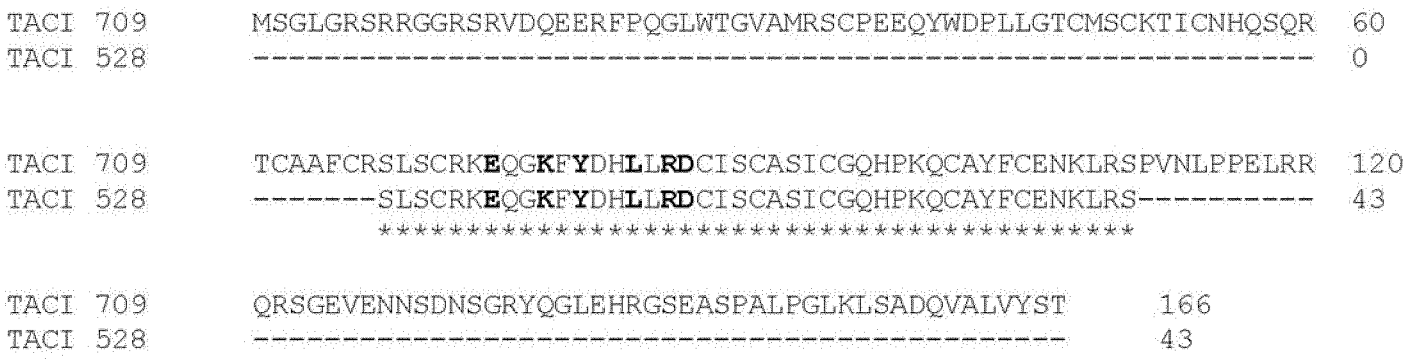
Растворимый BCMA-Fc

Фиг. 15


Гомодимерный Fc
Двухвалентный для каждой субъединицы
Гетеродимерный Fc
Одновалентный для каждой субъединицы
Двухвалентный для каждой субъединицы
Двухвалентный для одной субъединицы и четырехвалентный для другой
BIM
TIM
Fc

Фиг. 16

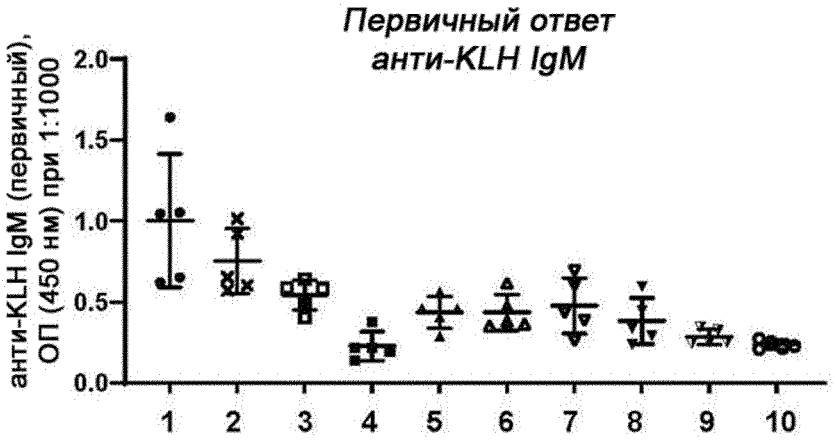
Фиг. 17A


TACI 709 MSGLGRSRRGGRSRVDQEERFPQGLWTGVAMRSCPEEQYWDPLLGTCMSCKTICNHQSQR 60
TACI 528 ---------- 0
TACI 709 TCAAFCRSLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPVNLPPELRR 120
TACI 528 -------SLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRS---------- 43
TACI 709 QRSGEVENNSDNSGRYQGLEHRGSEASPALPGLKLSADQVALVYST 166
TACI 528 ---------- 43

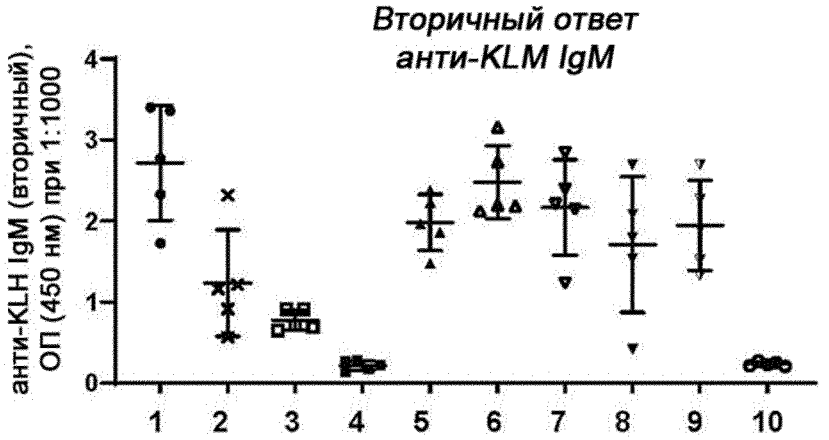
Фиг. 17B

```
BCMA 710      MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNA  54
BCMA 356      -LQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNA  53
               ******************************************************
```

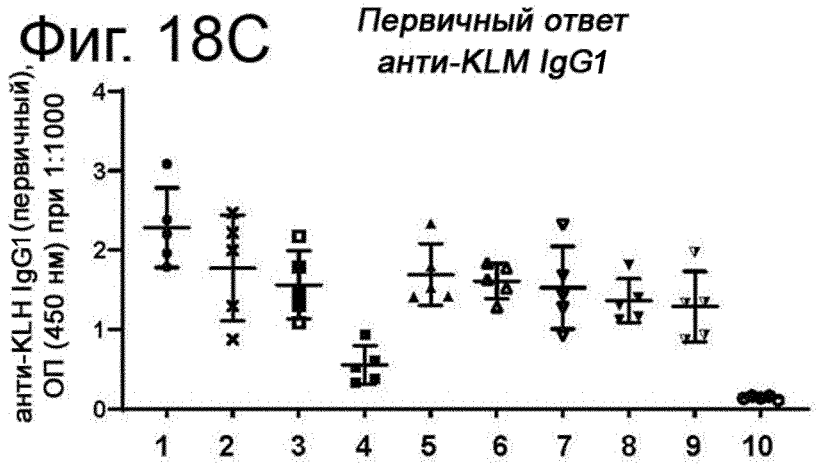
Фиг. 18A



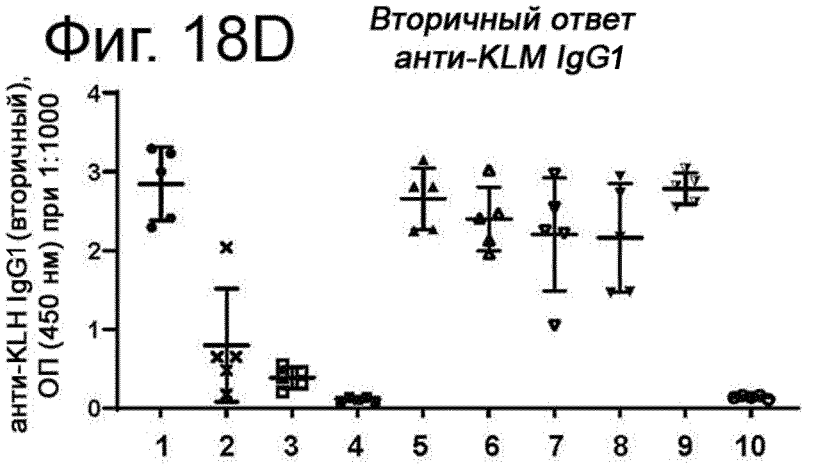
Фиг. 18B



Фиг. 18C

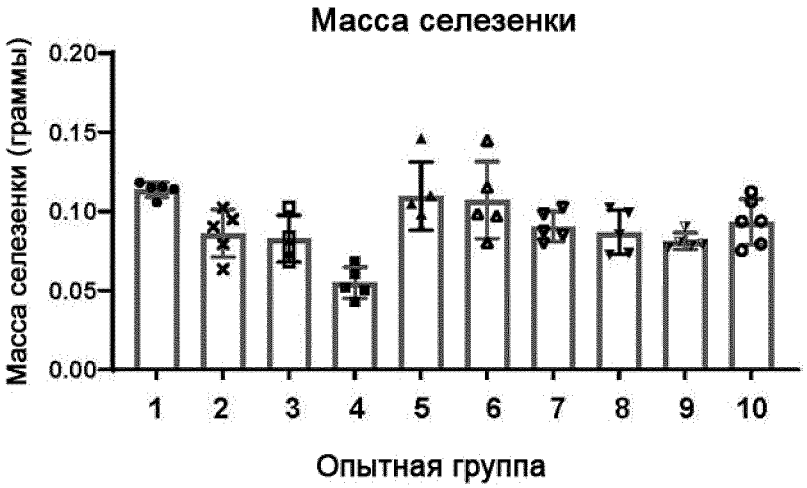


Фиг. 18D

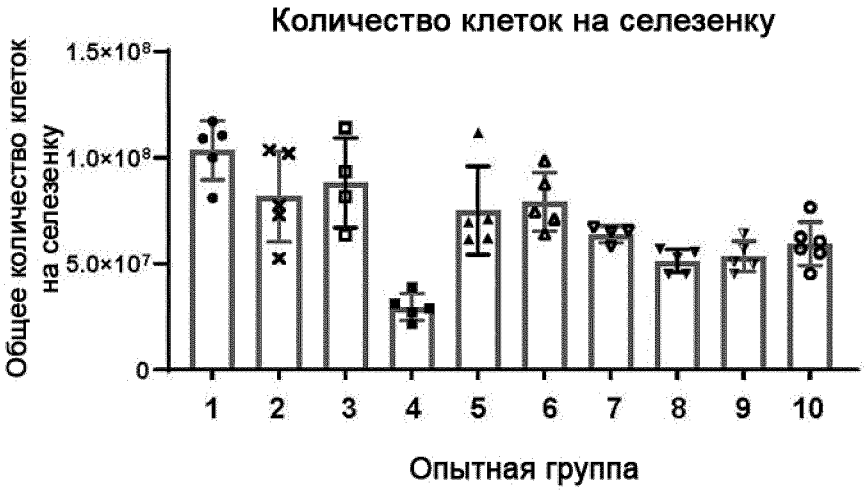


1. Контроль Fc
2. Абатацепт
3. 186 CTLA-4-Fc
4. CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541
5. TACI 30-110 – Fc
6. TACI 13-118 – Fc
7. 406 BCMA -Fc
8. 381 BCMA -Fc
9. 411 BCMA -Fc
10. Интактные

Фиг. 19A

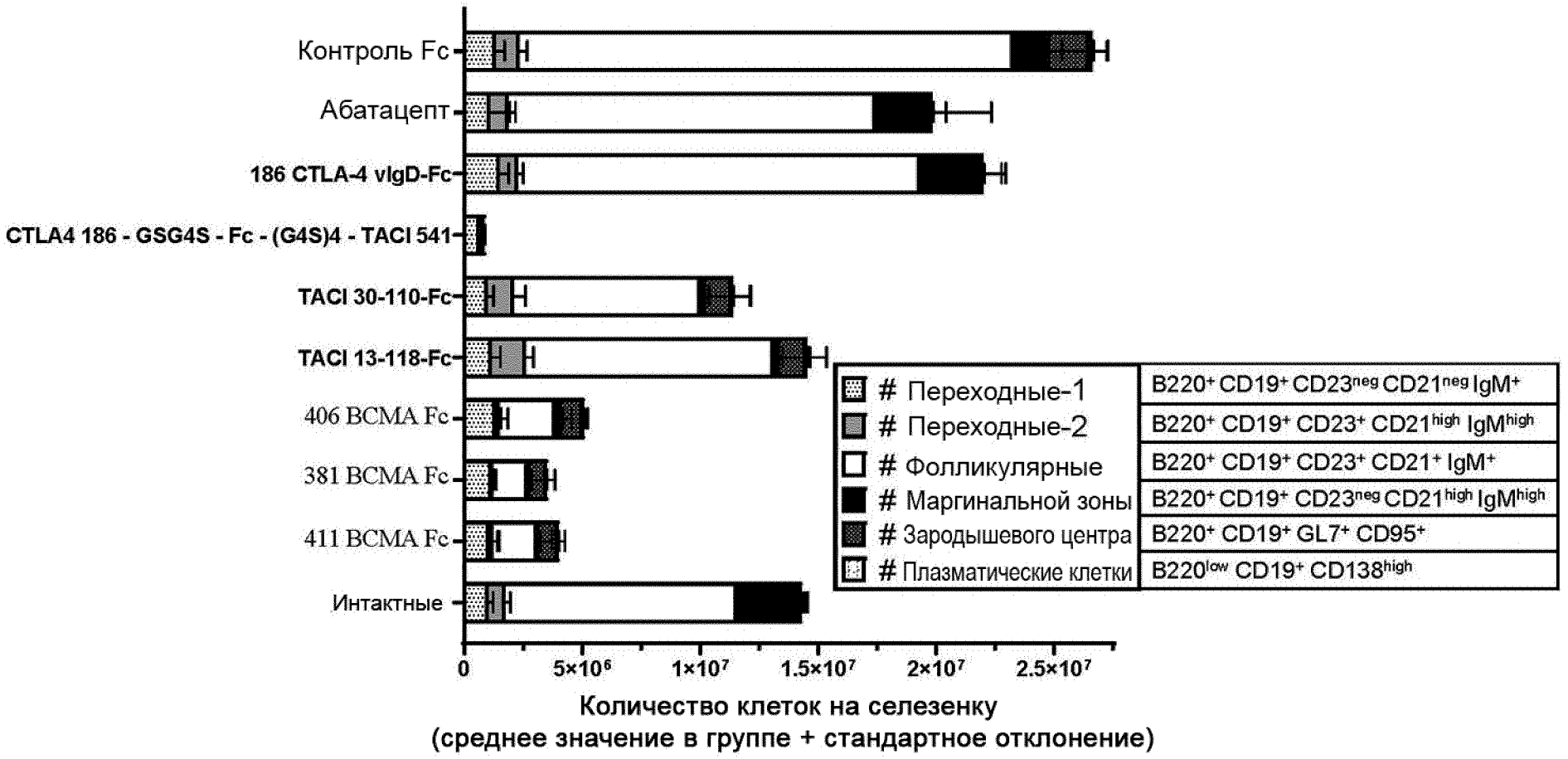


Фиг. 19B

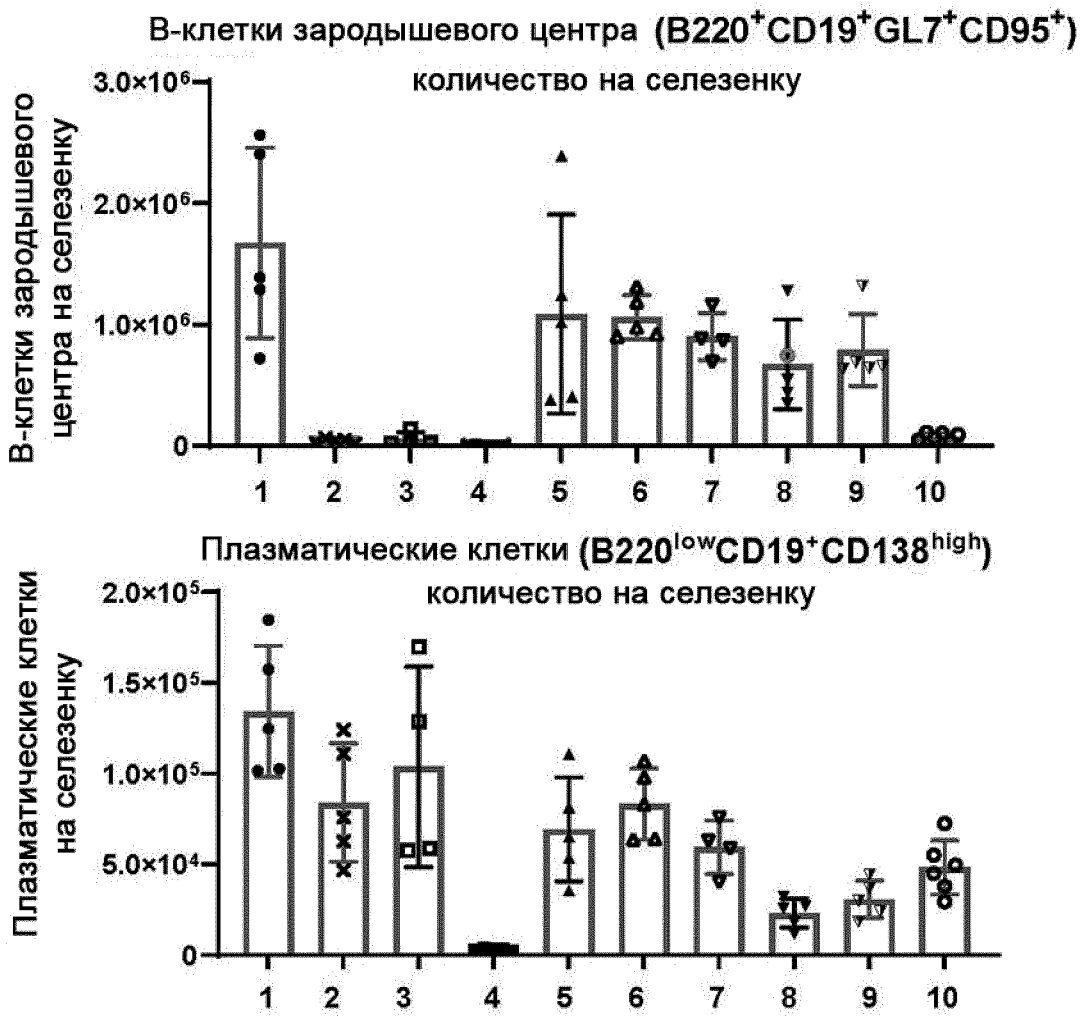


1. Контроль Fc
2. Абатацепт
3. 186 CTLA-4-Fc
4. CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541
5. TACI 30-110 – Fc
6. TACI 13-118 – Fc
7. 406 BCMA-Fc
8. 381 BCMA -Fc
9. 411 BCMA -Fc
10. Интактные

Фиг. 20

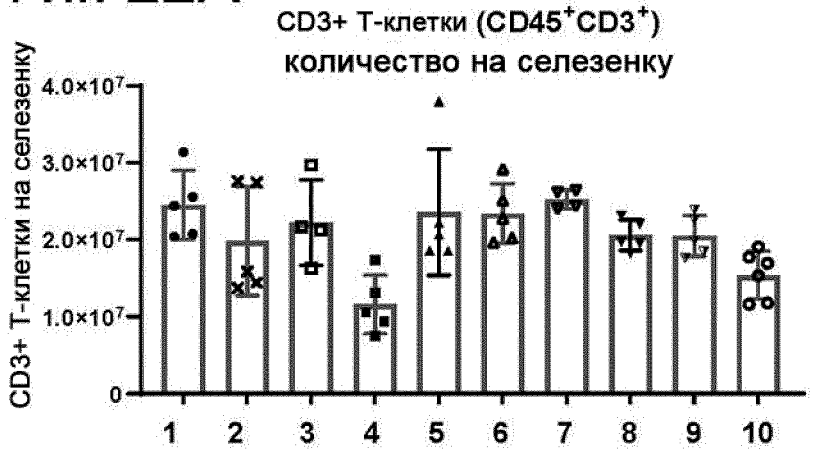

Контроль Fc
Абатацепт
186 CTLA-4 vIgD-Fc
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541
TACI 30-110-Fc
TACI 13-118-Fc
406 BCMA Fc
381 BCMA Fc
411 BCMA Fc
Интактные
0
5×10⁶
1×10⁷
1.5×10⁷
2×10⁷
2.5×10⁷
Количество клеток на селезенку
(среднее значение в группе + стандартное отклонение)
Переходные-1
Переходные-2
Фолликулярные
Маргинальной зоны
Зародышевого центра
Плазматические клетки
B220+ CD19+ CD23neg CD21neg IgM+
B220+ CD19+ CD23+ CD21high IgMhigh
B220+ CD19+ CD23+ CD21+ IgM+
B220+ CD19+ CD23neg CD21high IgMhigh
B220+ CD19+ GL7+ CD95+
B220low CD19+ CD138high

Фиг. 21

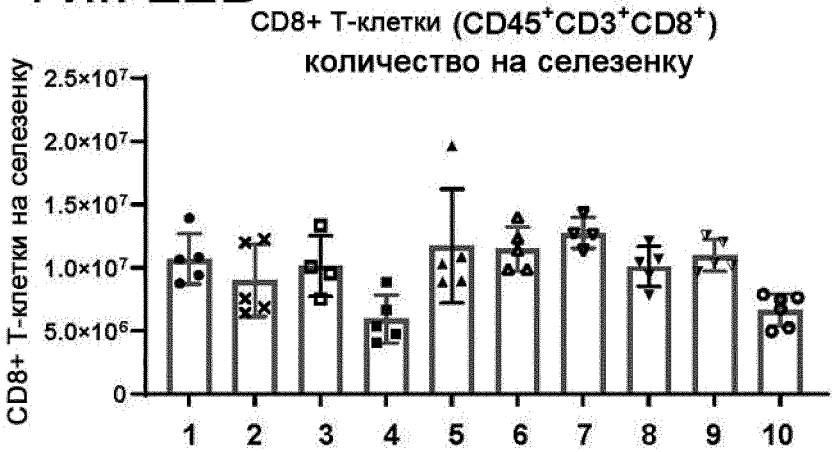


1. Контроль Fc
2. Абатацепт
3. 186 CTLA-4-Fc
4. CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541
5. TACI 30-110 – Fc
6. TACI 13-118 – Fc
7. 406 BCMA-Fc
8. 381 BCMA-Fc
9. 411 BCMA-Fc
10. Интактные

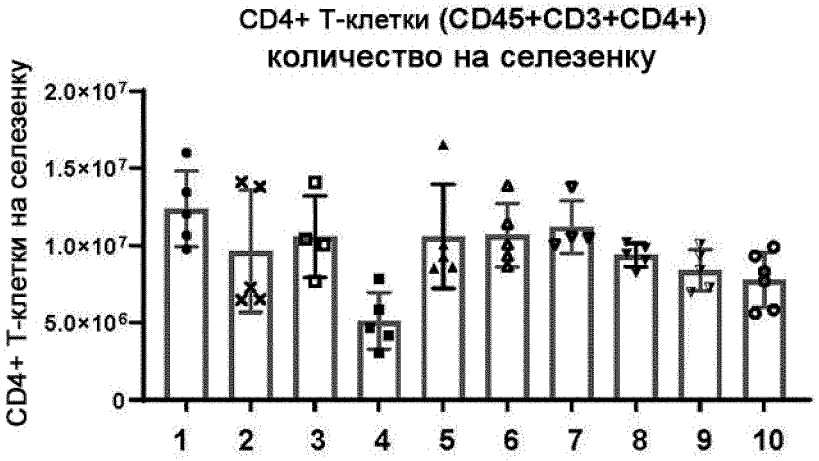
Фиг. 22A



Фиг. 22B



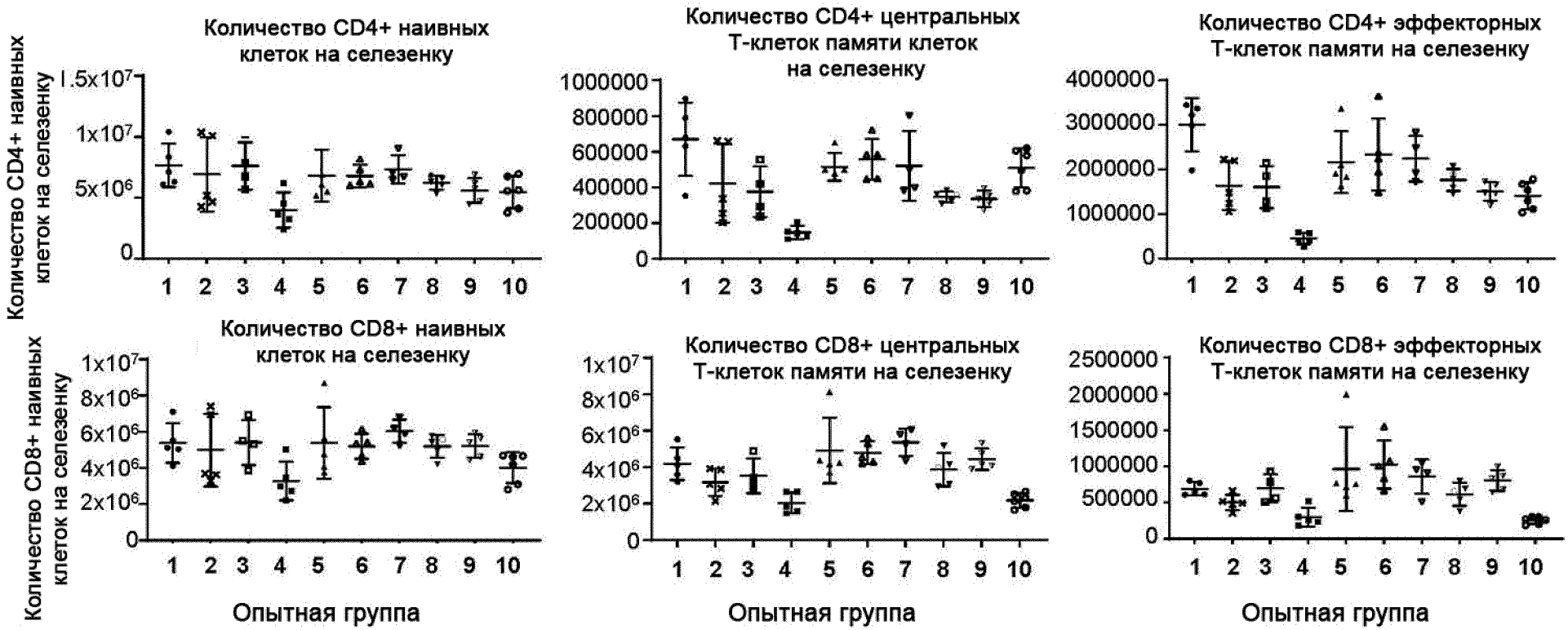
Фиг. 22C



Фиг. 22D

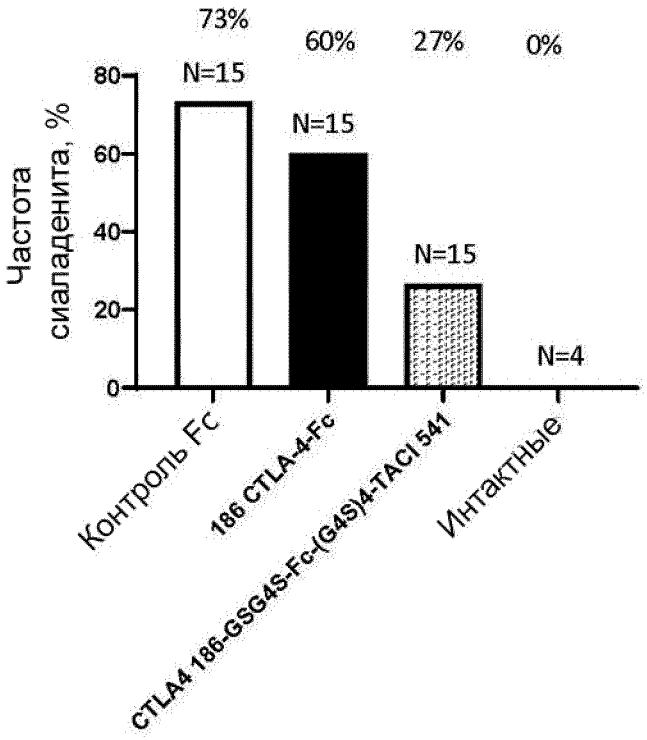
1. Контроль Fc
2. Абатацепт
3. 186 CTLA-4-Fc
4. CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541
5. TACI 30-110 – Fc
6. TACI 13-118 – Fc
7. 406 BCMA -Fc
8. 381 BCMA -Fc
9. 411 BCMA -Fc
10. Интактные

Фиг. 23

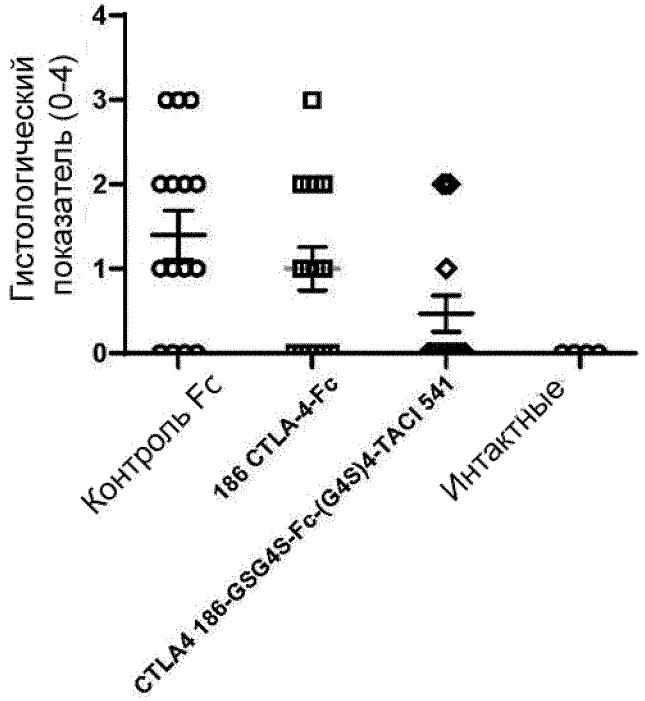


1. Контроль Fc
2. Абатацепт
3. 186 CTLA-4-Fc
4. CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541
5. TACI 30-110 – Fc
6. TACI 13-118 – Fc
7. 406 BCMA -Fc
8. 381 BCMA -Fc
9. 411 BCMA -Fc
10. Интактные

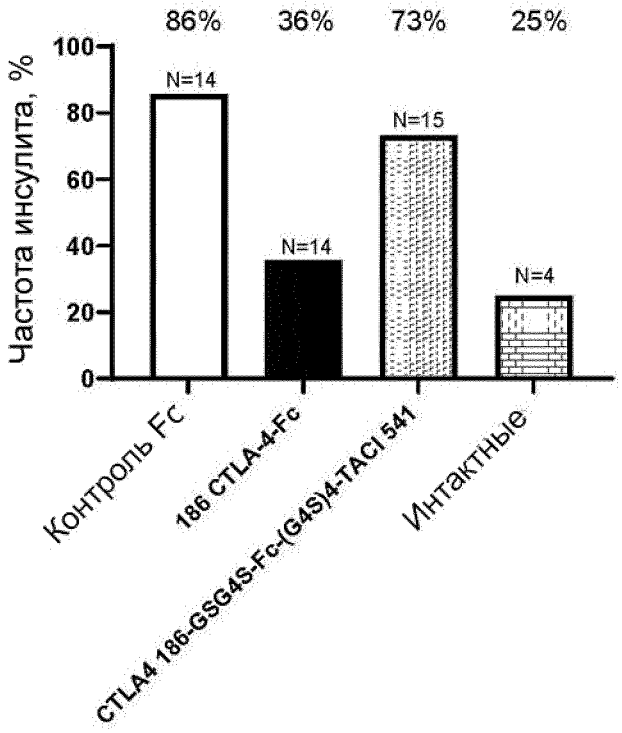
Фиг. 24A



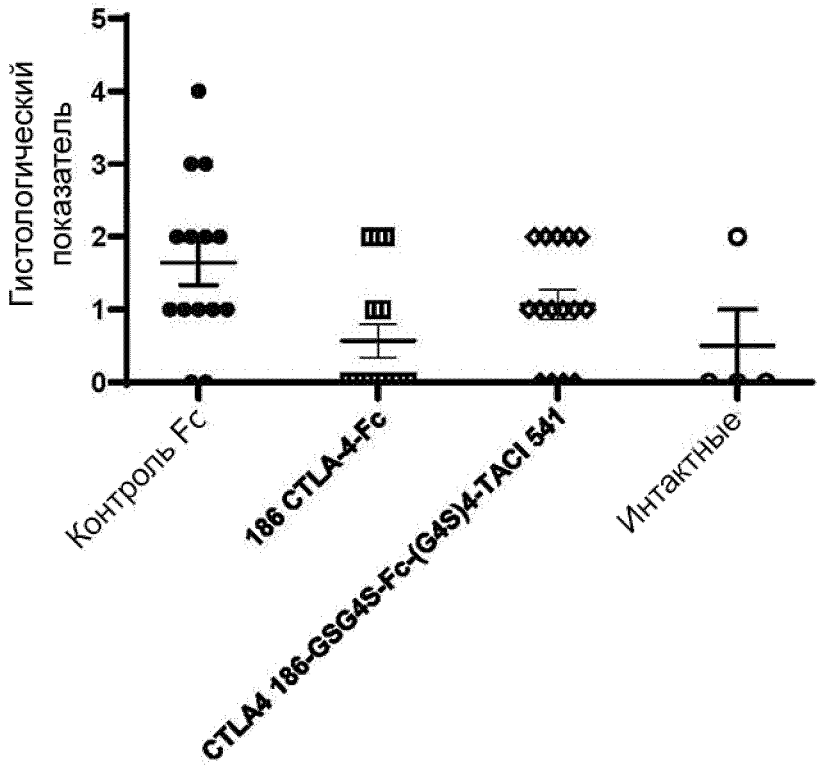
Фиг. 24B



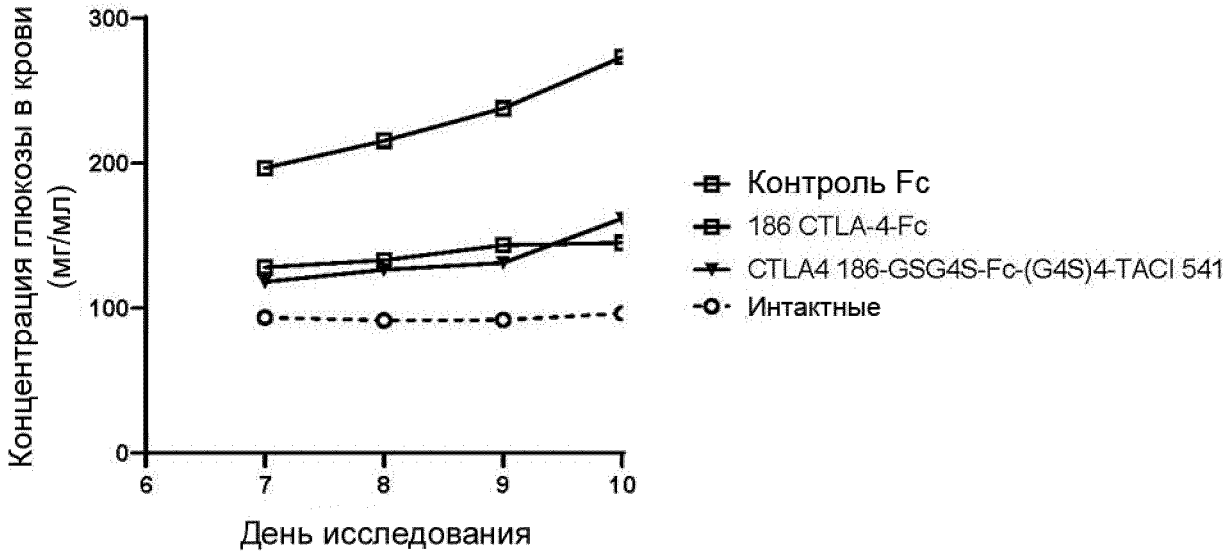
Фиг. 25A



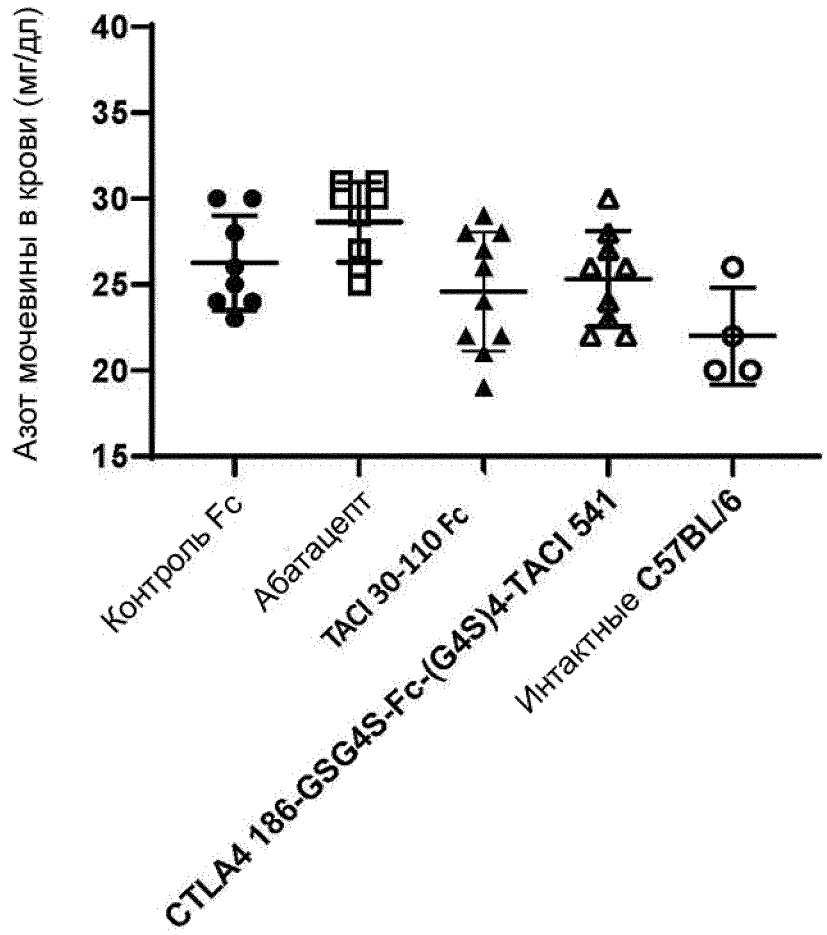
Фиг. 25B



Фиг. 26


Концентрация глюкозы в крови (мг/мл)
300
200
100
0
6
7
8
9
10
День исследования
Контроль Fc
186 CTLA-4-Fc
CTLA4 186-GSG4S-Fc-(G4S)4-TACI 541
Интактные

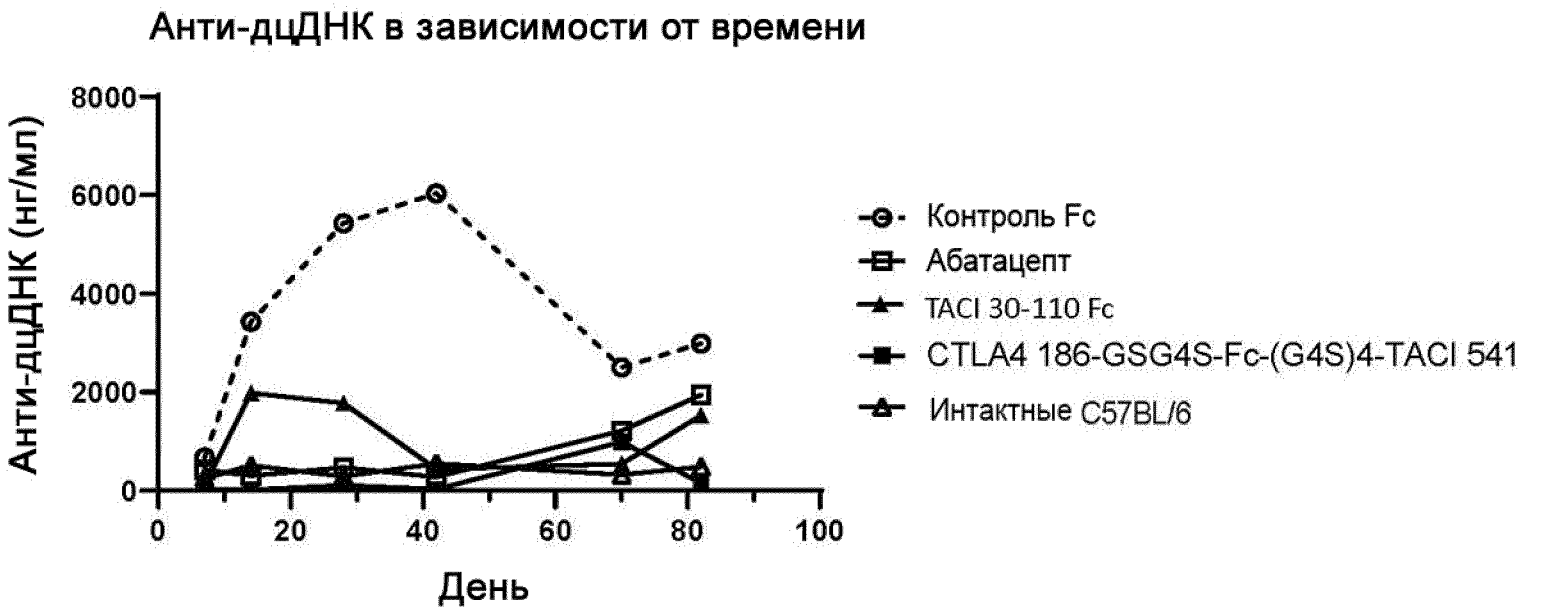
Фиг. 27


Азот мочевины в крови (мг/дл)
40
35
30
25
20
15
Контроль Fc
Абатацепт
TACI 30-110 Fc
CTLA4 186-GSG4S-Fc-(G4S)4-TACI 541
Интактные C57BL/6

Фиг. 28A

Фиг. 28B

Фиг. 28C


Анти-дцДНК в зависимости от времени
Анти-дцДНК (нг/мл)
8000
6000
4000
2000
0
0
20
40
60
80
100
День
Контроль Fc
Абатацепт
TACI 30-110 Fc
CTLA4 186-GSG4S-Fc-(G4S)4-TACI 541
Интактные C57BL/6

Фиг. 29