

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202293251** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.03.13

(51) Int. Cl. *C07K 14/705* (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.05.07

(54) **ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ БЕЛКИ, ИНГИБИРУЮЩИЕ APRIL И BAFF, 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/US2021/031430

(87) WO 2021/226551 2021.11.11

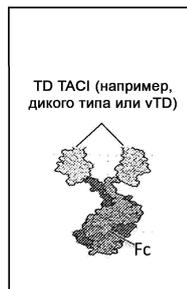
(71) Заявитель:
ЭЛПАЙН ИММЬОН САЙЕНСИЗ,
ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Диллон Стейси, Риксон Марк, Эванс
Лоуренс, Демонте Дэниэл Уильям,
Кейпер Джозеф Л., Пэнг Стэнфорд Л.
(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/APRIL) 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.

Растворимый TACI-Fc



202293251
A1

202293251
A1

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ БЕЛКИ, ИНГИБИРУЮЩИЕ APRIL И BAFF, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке 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, и предварительной заявке 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 предварительной заявке США 63/080,643, 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 761612003840SeqList.TXT, созданного 4 мая 2021, размером 278,600 байт. 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). Иммуномодулирующие белки включают варианты домены трансмембранного активатора и партнера CAML (кальциевого модулятора и лиганда циклофилина) (TACI). Среди предлагаемых иммуномодулирующих белков есть гибридные белки TACI-Fc. Настоящее изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие иммуномодулирующие белки. Иммуномодулирующие белки обеспечивают терапевтическую пользу при различных иммунологических заболеваниях, расстройствах или состояниях. Представлены композиции и способы получения и использования 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 В-клеток. Предложены варианты осуществления, которые удовлетворяют такие потребности.

Изложение сущности изобретения

В настоящей заявке предложен иммуномодулирующий белок, содержащий по меньшей мере один полипептид TACI, который 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 домена 1, богатого цистеином (CRD1), где вариантный полипептид TACI содержит одну или несколько аминокислотных замен в укороченном внеклеточном домене TACI дикого типа.

В настоящей заявке представлен иммуномодулирующий белок, содержащий по меньшей мере один полипептид TACI, который 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:122, где вариантный полипептид TACI содержит одну или несколько аминокислотных замен в укороченном внеклеточном домене TACI дикого типа. В некоторых вариантах осуществления укороченный внеклеточный домен TACI дикого типа имеет 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 59, 50 или 51 аминокислоту по длине. В некоторых вариантах осуществления укороченный внеклеточный домен TACI дикого типа состоит из аминокислотных остатков 68-110, указанных в SEQ ID NO:122. В некоторых вариантах осуществления полипептид TACI состоит из последовательности аминокислот, указанной в SEQ ID NO:13, или является его вариантом, содержащим одну или несколько аминокислотных замен в последовательности, указанной в SEQ ID NO:13.

В настоящей заявке представлен иммуномодулирующий белок, содержащий по меньшей мере один полипептид TACI, который представляет собой укороченный полипептид TACI, состоящий из последовательности аминокислот, указанной в SEQ ID NO:13, или его вариант, содержащий одну или несколько аминокислотных замен в последовательности, указанной в SEQ ID NO:13. В некоторых вариантах осуществления укороченный полипептид TACI или его вариант связывается с APRIL, BAFF или

гетеротримером BAFF/APRIL. В некоторых вариантах осуществления полипептид TACI представляет собой укороченный внеклеточный домен TACI дикого типа, который состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления полипептид TACI представляет собой укороченный внеклеточный домен TACI дикого типа, который состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:13.

Представленный в настоящей заявке иммуномодулирующий белок, содержащий укороченный полипептид TACI, состоящий из последовательности, указанной в SEQ ID NO:13. В некоторых вариантах осуществления полипептид TACI представляет собой вариантный полипептид TACI, который обладает повышенной аффинностью 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 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:122.

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 консервативной аминокислотной замены. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен содержат 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 вариантный полипептид TACI указан в SEQ ID NO:26. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI указан в SEQ ID NO:27.

В некоторых вариантах осуществления полипептид TACI 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, соответствующих нумерации

положений, указанной в SEQ ID NO:122.

В настоящей заявке представлен иммуномодулирующий белок, включающий по меньшей мере один 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, соответствующих нумерации положений, указанной в SEQ ID NO:122.

В настоящей заявке обеспечен иммуномодулирующий белок, который представляет собой вариантный гибридный белок TACI-Fc, содержащий вариантный полипептид TACI, Fc-область и линкер между полипептидом TACI и Fc-областью, причем 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 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:122.

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) последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:122, (ii) последовательность аминокислот, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:122; или (iii) часть из (i) или (ii), содержащую один или оба из домена CRD1 и домена CRD2, которая связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером BAFF/APRIL.

В некоторых вариантах осуществления эталонный полипептид TACI не содержит N-концевого метионина.

В некоторых вариантах осуществления эталонный полипептид TACI содержит домен CRD1 и домен CRD2.

В некоторых вариантах осуществления эталонный полипептид TACI содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления эталонный полипептид TACI состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:1.

В некоторых вариантах осуществления эталонный полипептид TACI состоит по существу из домена CRD2.

В некоторых вариантах осуществления эталонный полипептид TACI содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:13. В некоторых вариантах осуществления

эталонный полипептид TACI состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:13.

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 консервативной аминокислотной замены.

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 аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из Q75E, K77E, F78Y, R84G, R84Q, A101D и Y102D, или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере аминокислотную замену Q75E. 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 F78Y. 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 одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере аминокислотную замену A101D.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают Q75E/R84Q. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают Q75E/K77E. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают Q75E/F78Y. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают Q75E/A101D. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают Q75E/Y102D. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают F77E/F78Y. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают K77E/R84Q. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают K77E/A101D. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают K77E/Y102D. В некоторых вариантах осуществления

одна или несколько аминокислотных замен включают F78Y/R84Q. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают F78Y/A101D. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают F78Y/Y102D. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают R84Q/A101D. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают R84Q/Y102D. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают A101D/Y102D.

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 R84G, A101D, K77E/R84Q, K77E/A101D, K77E/F78Y, K77E/F78Y/Y102D, Q75E/R84Q, K77E/A101D/Y102D, R84Q, K77E, A101D, Q75E, K77E/F78Y./R84Q, F78Y, F78Y/R84Q, F78Y/A101D, F78Y/Y102D или K77E/Y102D.

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 одна или несколько аминокислотных замен представляют собой K77E/A101D/Y102D.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI имеет до 10 аминокислотных модификаций по сравнению с эталонным полипептидом TACI. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI имеет до 5 аминокислотных модификаций по сравнению с эталонным полипептидом TACI.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO:122 или ее фрагментом специфического связывания, содержащим домен CRD1 и/или домен CRD2. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:122 или фрагментом специфического связывания, включающим домен CRD1 и/или домен CRD2. В некоторых вариантах осуществления фрагмент специфического связывания указан в SEQ ID NO:1,

SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:130 или SEQ ID NO:131.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO:13. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:13.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 обладает повышенной аффинностью связывания с одним или обоими из APRIL и BAFF по сравнению с эталонным полипептидом TAC1. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 обладает повышенной аффинностью связывания с APRIL. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 обладает повышенной аффинностью связывания с BAFF. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 обладает повышенной аффинностью связывания с APRIL и BAFF.

В некоторых вариантах осуществления повышенная аффинность связывания к BAFF или APRIL независимо увеличивается более чем примерно в 1,2 раза, примерно в 1,5 раза, примерно в 2 раза, примерно в 3 раза, примерно в 4 раза, примерно в 5 раз, примерно в 6 раз, примерно в 7 раз, примерно в 8 раз, примерно в 9 раз, примерно в 10 раз, примерно в 20 раз, примерно в 30 раз, примерно в 40 раз, примерно в 50 раз или примерно в 60 раз.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 содержит последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO:2-12, 21, 22, 101-120; или вариантный полипептид TAC1 содержит последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO:14-20, 23-35, 92-100 или 177-192.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO:2-12, 21, 22, 101-120; или вариантный полипептид TAC1 состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO:14-20, 23-35, 92-100 или 177-192.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:26. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:27. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:107. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:20.

В некоторых вариантах осуществления линкер включает пептидный линкер, выбранный из GSGGS (SEQ ID NO:76), GGGGS (G4S; SEQ ID NO:77), GSGGGGS (SEQ ID NO:74), GGGGSGGGGS (2xGGGGS; SEQ ID NO:78), GGGGSGGGGSGGGGS (3xGGGGS; SEQ ID NO:79), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (4xGGGGS, SEQ ID NO:84), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (5xGGGGS, SEQ ID NO:91), GGGGSSA (SEQ ID NO:80), или GSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:194), или их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок содержит гетерологичный фрагмент, который связан по меньшей мере с одним полипептидом TAC1. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный фрагмент представляет собой фрагмент, продлевающий период полужизни, домен мультимеризации, нацеливающий фрагмент, который связывается с молекулой на поверхности клетки, или обнаруживаемую метку. В некоторых вариантах осуществления фрагмент, продлевающий период полужизни, включает домен мультимеризации, альбумин, альбуминсвязывающий полипептид, Pro/Ala/Ser (PAS), C-концевой пептид (CTP) бета-субъединицы человеческого хорионического гонадотропина, полиэтиленгликоль (PEG), длинные неструктурированные гидрофильные последовательности аминокислот (XTEN), гидроксипроцеллюлоза (HES), малую молекулу, связывающую альбумин, или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один полипептид TAC1 связан с Fc-областью иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок любого из представленных здесь вариантов осуществления, который является гибридным белком TAC1-Fc, включает по меньшей мере один полипептид TAC1, связанный с Fc-областью иммуноглобулина.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок, представленный в настоящей заявке, не включает полипептид TAC1, связанный с другим нацеливающим фрагментом, который связывается с молекулой на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок, представленный в настоящей заявке, не включает полипептид TAC1, связанный с нацеливающим фрагментом, который является партнером по связыванию рецептора, стимулирующего T-клетки, или лигандом рецептора, стимулирующего T-клетки. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок, представленный в настоящей заявке, не включает полипептид TAC1, связанный с нацеливающим фрагментом, который является партнером по связыванию CD28 или лигандом CD28 (например, CD80 или CD86). В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок, представленный в настоящей заявке, не включает полипептид TAC1, связанный с полипептидом CTLA-4, или внеклеточный домен, или связывающую часть CTLA-4, или их вариант. Например, в

предусмотренных аспектах иммуномодулирующий белок, представленный в настоящей заявке, не включает полипептид ТАСІ, связанный с полипептидом СТLА-4 дикого типа или его внеклеточным доменом или связывающей частью. В предусмотренных аспектах иммуномодулирующий белок, представленный в настоящей заявке, не включает полипептид ТАСІ, связанный с вариантным полипептидом СТLА-4 или его внеклеточным доменом или связывающей частью, таким как вариантный СТLА-4 или его связывающая часть, содержащая одну или несколько аминокислотных модификаций (например, замен) во внеклеточном домене СТLА-4, например, для повышения аффинности связывания с одним или несколькими когнатными партнерами по связыванию.

В некоторых вариантах осуществления Fc иммуноглобулина представляет собой Fc-домен IgG4 или является его вариантом. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен IgG4 имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:139. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен IgG4 является его вариантом, содержащим мутации S228P. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен IgG4 имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:140 или SEQ ID NO:220.

В некоторых вариантах осуществления Fc-гибридный белок ТАСІ-Fc представляет собой димер. В некоторых вариантах осуществления Fc-область иммуноглобулина является гомодимерной Fc-областью.

В некоторых вариантах осуществления 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. В некоторых вариантах осуществления Fc иммуноглобулина указана в SEQ ID NO:71. В некоторых вариантах осуществления Fc иммуноглобулина представляет собой Fc-домен IgG1, и Fc включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:81. В некоторых вариантах осуществления 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. 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-область содержит аминокислотные замены L234A, L235E и G237A по нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления Fc-область указана в SEQ ID NO:73, 75, 83, 136 или 221. В некоторых вариантах осуществления Fc-область иммуноглобулина дополнительно содержит аминокислотные замены A330S и P331S. В некоторых вариантах осуществления

Fc-область иммуноглобулина указана в SEQ ID NO:175 или SEQ ID NO:176.

В некоторых вариантах осуществления Fc представляет собой вариантную Fc, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:73.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок представляет собой гетеродимер, в котором каждый полипептид димера связан с Fc-доменом иммуноглобулина, индивидуально содержащим одну или несколько аминокислотных модификаций в Fc-доме 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-воплатину» и мутации заряда, чтобы уменьшить или предотвратить самоассоциацию из-за отталкивания заряда.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок 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 гибридный белок TACI-Fc содержит структуру: полипептид TACI (TACI)-Линкер-Fc-область. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок TACI-Fc указан в SEQ ID NO:168. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок TACI-Fc указан в SEQ ID NO:170. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок TACI-Fc указан в SEQ ID NO:167. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок TACI-Fc указан в SEQ ID NO:169. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок представляет собой гомодимер, содержащий две идентичные копии гибридного белка TACI-Fc.

В настоящей заявке представлен иммуномодулирующий гибридный белок TACI-Fc, который представляет собой гомодимер, содержащий две идентичные копии гибридного белка TACI-Fc, указанные в SEQ ID NO:167, соединенные ковалентной дисульфидной связью.

В настоящей заявке представлен иммуномодулирующий гибридный белок TACI-Fc, который представляет собой гомодимер, содержащий две идентичные копии

гибридного белка TACI-Fc, указанные в SEQ ID NO:168, соединенные ковалентной дисульфидной связью.

В настоящей заявке представлен иммуномодулирующий гибридный белок TACI-Fc, который представляет собой гомодимер, содержащий две идентичные копии гибридного белка TACI-Fc, указанные в SEQ ID NO:169, соединенные ковалентной дисульфидной связью.

В настоящей заявке представлен иммуномодулирующий гибридный белок TACI-Fc, который представляет собой гомодимер, содержащий две идентичные копии гибридного белка TACI-Fc, указанные в SEQ ID NO:170, соединенные ковалентной дисульфидной связью.

В некоторых вариантах осуществления гибридный белок TACI-Fc содержит структуру: (TACI)-Линкер-Fc-область-Линкер-(TACI). В некоторых вариантах осуществления гибридный белок TACI-Fc указан в SEQ ID NO:201. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок TACI-Fc указан в SEQ ID NO:202. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок представляет собой гомодимер, содержащий две идентичные копии гибридного белка TACI-Fc.

В некоторых вариантах осуществления гибридный белок TACI-Fc содержит структуру: (TACI)-Линкер-(TACI)-Линкер-Fc область. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок TACI-Fc указан в SEQ ID NO:198. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок представляет собой гомодимер, содержащий две идентичные копии гибридного белка TACI-Fc.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок (например, Fc-гибридный белок) блокирует связывание APRIL, BAFF или гетеротримера APRIL/BAFF с BCMA или TACI; и иммуномодулирующий белок снижает уровни циркулирующих APRIL, BAFF или APRIL/BAFF в крови после введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок (например, Fc-гибридный белок) блокирует связывание APRIL, BAFF или гетеротримера APRIL/BAFF с BCMA или TACI. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок (например, Fc-гибридный белок) снижает уровни циркулирующих APRIL, BAFF или APRIL/BAFF в крови после введения субъекту.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок (например, Fc-гибридный белок) уменьшает или ингибирует созревание, дифференцировку и пролиферацию В-клеток. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок уменьшает или ингибирует созревание, дифференцировку или пролиферацию В-клеток.

В некоторых вариантах осуществления Fc-гибридный белок 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 представляет собой любое значение между любыми из вышеуказанных; 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 вышеуказанных.

В настоящей заявке представлена молекула (молекулы) нуклеиновой кислоты, кодирующая иммуномодулирующий белок (например, Fc-гибридный белок) любого из описанных здесь вариантов осуществления. В некоторых вариантах молекула нуклеиновой кислоты представляет собой синтетическую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах молекула нуклеиновой кислоты представляет собой кДНК.

В настоящей заявке представлен вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты любого из описанных здесь вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления вектор является вектором экспрессии. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор экспрессии млекопитающих или вирусный вектор.

В настоящей заявке представлена клетка, содержащая нуклеиновую кислоту любого из описанных здесь вариантов осуществления или вектор любого из описанных здесь вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления клетка является клеткой человека.

В настоящей заявке представлен способ получения иммуномодулирующего белка, включающий введение молекулы нуклеиновой кислоты любого из описанных здесь вариантов осуществления или вектора любого из описанных здесь вариантов осуществления в клетку-хозяина в условиях для экспрессии белка в клетке. В некоторых вариантах осуществления способ включает выделение или очистку иммуномодулирующего белка (например, Fc-гибридного белка) из клетки. В настоящей заявке представлен способ получения Fc-гибридного белка, включающий введение молекулы нуклеиновой кислоты любого из представленных здесь вариантов осуществления или вектора любого из представленных здесь вариантов осуществления в клетку-хозяина в условиях для экспрессии белка в клетке.

В настоящей заявке представлен иммуномодулирующий белок (например, Fc-гибридный белок), полученный способом любого из описанных здесь вариантов осуществления. В настоящей заявке представлен Fc-гибридный белок, полученный

способом любого из описанных здесь вариантов осуществления.

В настоящей заявке представлена фармацевтическая композиция, содержащая иммуномодулирующий белок (например, Fc-гибридный белок) любого из описанных здесь вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция является стерильной.

В настоящей заявке представлено изделие, включающее фармацевтическую композицию любого из описанных здесь вариантов осуществления во флаконе или контейнере. В некоторых вариантах флакон или контейнер является герметичным.

В настоящей заявке представлен набор, содержащий фармацевтическую композицию любого из представленных здесь вариантов осуществления и инструкции по применению. В некоторых вариантах набор включает изделие из любого из описанных здесь вариантов осуществления и инструкции по использованию.

В настоящей заявке представлен способ снижения иммунного ответа у субъекта, включающий введение иммуномодулирующего белка любого из описанных здесь вариантов осуществления субъекту, нуждающемуся в этом.

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

В настоящей заявке представлен способ снижения иммунного ответа у субъекта, включающий введение фармацевтической композиции любого из описанных здесь вариантов осуществления субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления В-клеточный иммунный ответ у субъекта снижается, в результате чего снижается или ингибируется созревание, дифференцировка и/или пролиферация В-клеток. В некоторых вариантах осуществления снижаются циркулирующие уровни APRIL, BAFF или гетеротримера APRIL/BAFF у субъекта.

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

В настоящей заявке представлен способ лечения заболевания, расстройства или

состояния у субъекта, включающий введение иммуномодулирующего белка любого из описанных здесь вариантов осуществления субъекту, нуждающемуся в этом.

В настоящей заявке представлен способ лечения заболевания, расстройства или состояния у субъекта, включающий введение Fc-гибридного белка любого из описанных здесь вариантов осуществления субъекту, нуждающемуся в этом.

В настоящей заявке представлен способ лечения заболевания, расстройства или состояния у субъекта, включающий введение фармацевтической композиции любого из описанных здесь вариантов осуществления субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления заболевание, расстройство или состояние является аутоиммунным заболеванием, воспалительным состоянием, В-клеточным раком, патологией, опосредованной антителами, заболеванием почек, отторжением трансплантата, болезнью «трансплантат против хозяина» или вирусной инфекцией. В некоторых вариантах осуществления 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. В некоторых вариантах осуществления заболевание, расстройство или состояние представляет собой В-клеточный рак, и рак представляет собой миелому.

В настоящей заявке также представлена фармацевтическая композиция для применения при снижении иммунного ответа у субъекта.

В настоящей заявке также предусмотрено использование любого из представленных иммуномодулирующих белков (например, Fc-гибридных белков) или любой из представленных фармацевтических композиций при изготовлении лекарственного средства для снижения иммунного ответа у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтической композиции для применения, или применения, предусмотренного здесь, иммунный ответ представляет собой В-клеточный иммунный ответ, где снижение иммунного ответа уменьшает или ингибирует созревание В-клеток, дифференцировку и/или пролиферацию. В некоторых вариантах осуществления снижение иммунного ответа уменьшает циркулирующие уровни APRIL, BAFF или гетеротримера APRIL/BAFF у субъекта. В некоторых вариантах осуществления снижение иммунного ответа лечит заболевание, расстройство или состояние у субъекта.

В настоящей заявке также представлена фармацевтическая композиция для применения при лечении заболевания, расстройства или состояния у субъекта.

В настоящей заявке также предусмотрено использование любого из представленных иммуномодулирующих белков или фармацевтических композиций при изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания, расстройства или состояния у субъекта.

В некоторых вариантах фармацевтической композиции для применения или предусмотренных здесь применений 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. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние выбрано из группы, состоящей из системной красной волчанки (СКВ); синдрома Шегрена, склеродермии, рассеянного склероза, диабета, полимиозита, первичного билиарного цирроза, IgA-нефропатии, IgA-вакулита, 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, расстройство или состояние представляет собой В-клеточный гемобластоз, и гемобластоз 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 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 TACI TD Fc для

блокады передачи сигналов, опосредованной APRIL (верхняя панель) и BAFF (нижняя панель) человека. Гибриды TACI TD Fc инкубировали с APRIL или BAFF в течение 20 минут (при комнатной температуре при встряхивании) и затем добавляли в лунки, содержащие 150 000 клеток Jurkat/TACI/NFκB-люциферазы, на 5 часов.

На Фигуре 3 показана функция примерных гибридных молекул TACI TD Fc для блокады APRIL (верхняя панель) или BAFF (нижняя панель).

На Фигуре 4 показаны гибридные молекулы TACI TD Fc человека для блокады передачи сигналов, опосредованной мышиним APRIL (левая панель) и BAFF (правая панель).

На Фигуре 5 показаны гибридные молекулы TACI TD Fc человека для блокады передачи сигналов, опосредованной APRIL человека (верхняя панель) и BAFF человека (нижняя панель), по сравнению с TACI 13-118-Fc, TACI 30-110-Fc и белимумабом.

На Фигурах 6A-6I показан анализ параметров, оцененных на NZB/NZW мышинной модели СКВ человека. Показатели протеинурии (Фиг.6A), среднее процентное изменение массы тела (Фиг.6B) и процент выживаемости (Фиг.6C) оценивали, начиная с 20-недельного возраста. Сыворотку анализировали на титры IgG против двухцепочечной ДНК (Фиг.6D) и азот мочевины крови (BUN) (Фиг.6E) (**** против Fc по t-тесту Стьюдента, $p < 0,0001$ для анти-дцДНК IgG; *** против Fc по t-тесту Стьюдента, $p = 0,0008$ для BUN-4). Почки обрабатывали и подвергали гистологическому анализу в повторяющихся периодических срезах, окрашенных Шифф-йодной кислотой (PAS), с индивидуальными компонентами и общими гистологическими показателями, изображенными на Фиг.6F. Замороженные почки также разрезали и окрашивали для иммуногистохимического анализа отложения IgG и C3 компонента мыши в клубочках, как показано на Фиг.6G и Фиг.6H, соответственно. Фиг.6I показывает гистологическую оценку \pm SEM.

На Фигуре 7 показана способность мутаций TACI (K77E/F78Y/Y102D) ингибировать передачу сигналов, опосредованных APRIL (левая панель) и BAFF (правая панель), количественно определяемая по продукции люциферазы в клетках Jurkat/NFκB/TACI.

На Фигурах 8A и 8B показаны схематические изображения примерных гибридных белков TACI-Fc. Фиг.8A показывает примерный гибридный белок TACI-Fc, содержащий два богатых цистеином псевдо-повтора (CRD). Фиг.8B показывает примерный гибридный белок TACI-Fc, содержащий один псевдо-повтор, богатый цистеином (CRD, например, CRD2).

На Фигуре 9 изображены примерные 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 пробел в выравнивании. Примерные, неограничивающие положения для аминокислотной замены, описанные в настоящей заявке, выделены жирным шрифтом. Основываясь на выравнивании двух сходных последовательностей, имеющих общие идентичные остатки, специалист в данной области техники может идентифицировать «соответствующие» положения в последовательности путем сравнения с эталонной последовательностью, используя консервативные и идентичные аминокислотные остатки в качестве ориентиров. Фиг.9 обеспечивает примерное выравнивание эталонной последовательности внеклеточного домена TACI, указанной в SEQ ID NO:122 (содержащей полный внеклеточный домен с CRD1 и CRD2 и иницирующим метиониновым остатком), с последовательностью внеклеточного домена TACI, указанной в SEQ ID NO:13 (содержащей только один CRD, CRD2); выравнивание идентичных остатков демонстрирует, например, что аминокислотный остаток E7 в SEQ ID NO:13 соответствует остатку E74 в SEQ ID NO:122, аминокислотный остаток K10 в SEQ ID NO:13 соответствует остатку K77 в SEQ ID NO:122, аминокислотный остаток Y12 в SEQ ID NO:13 соответствует Y79 в SEQ ID NO:122, аминокислотный остаток L15 в SEQ ID NO:13 соответствует L82 в SEQ ID NO:122, аминокислотный остаток R17 в SEQ ID NO:13 соответствует R84 в SEQ ID NO:122; и аминокислотный остаток D16 в SEQ ID NO:13 соответствует D85 в SEQ ID NO:122. Специалисту в данной области техники известно, как выполнять аналогичные выравнивания между двумя подобными последовательностями белка для идентификации соответствующих остатков, в том числе на основе приведенных в настоящей заявке примеров и описания.

На Фигурах 10A-10D показан анализ параметров, оцененных на мышинной модели иммунизации гемоцианином лимфы улитки (KLH). Уровни ОП IgM KLH в сыворотке крови оценивали как первичный ответ (Фиг.10A) и вторичный ответ (Фиг.10B). Аналогичным образом, уровни ОП анти-KLH IgG1 в сыворотке крови оценивали как первичный ответ (Фиг.10C), так и вторичный ответ (Фиг.10D).

На Фигурах 11A-11B показан анализ собранной селезенки путем оценки с помощью мышинной модели иммунизации гемоцианином лимфы улитки (KLH). Селезенку обрабатывали и анализировали по массе (Фиг.11A), а также по общему количеству клеток (Фиг.11B).

На Фигуре 12 показан анализ селезенки, путем оценки на предмет состава популяций клеточных подтипов на мышинной модели иммунизации гемоцианином лимфы

улитки (KLH), и показаны результаты подсчета количества В-клеток относительно среднего значения по группе.

На Фигуре 13 показан анализ селезенки, при оценке по фенотипическому составу клеточных подтипов на основе мышинной модели иммунизации гемоцианином лимфы улитки (KLH), и показаны результаты определения количества В-клеток зародышевого центра и плазматических клеток (Фиг.13).

На Фигурах 14А-Д показано количество Т-клеток на мышинной модели иммунизации гемоцианином лимфы улитки (KLH). Селезеночные CD3+, CD8+, CD4+ и фолликулярные хелперные Т-клетки изображены на Фиг.14А, Фиг.14В, Фиг.14С и Фиг.14Д, соответственно.

На Фигуре 15 изображены клеточные популяции T_{ст} и T_{ем} на мышинной модели иммунизации гемоцианином лимфы улитки (KLH).

Фигуры 16А-16В и Фигуры 17А-17В изображают общую частоту и степень сиаладенита (Фиг.16А-16В) и инсулита (Фиг.17А-17В) у мышей, склонных к диабету, после лечения тестируемыми молекулами.

Подробное описание изобретения

В настоящей заявке представлены иммуномодулирующие белки, которые взаимодействуют с одним или несколькими лигандами, например, продуцируемыми в виде растворимых факторов, для подавления или уменьшения ответов или активности В-клеток. Среди предлагаемых иммуномодулирующих белков есть белки, которые связываются с лигандами BAFF или APRIL для нейтрализации их активности и блокирования или антагонизма активности рецепторов, стимулирующих В-клетки, таких как TACI или BCMA. Указанные иммуномодулирующие белки могут представлять собой гибридные белки внеклеточного домена TACI или его связывающей части (далее ECD TACI) и домена мультимеризации, такого как Fc иммуноглобулина. Например, в настоящей заявке представлены гибридные белки TACI-Fc. В некоторых вариантах осуществления представленные в настоящей заявке иммуномодулирующие белки могут быть использованы для лечения заболеваний, расстройств или состояний, которые связаны с нарушением регуляции иммунного ответа, таких как связанные с воспалительными или аутоиммунными симптомами, включая воспалительное заболевание или аутоиммунное заболевание.

Иммунная система опирается на иммунные контрольные точки для предотвращения аутоиммунитета (то есть для аутоотолерантности) 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

стройка, 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, 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, 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 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, особенно плазмобластов и плазматических клеток, и играют роль в патогенезе аутоиммунных заболеваний, связанных с В-клетками. Их совместная нейтрализация резко снижает функцию В-клеток, включая выработку антител, в то время как ингибирование либо BAFF, либо APRIL само по себе опосредует относительно умеренные эффекты. Fc-гибриды TACI дикого типа (WT) (например, атацицепт и телитацицепт) нацелены как на

BAFF, так и на APRIL и продемонстрировали многообещающий клинический потенциал, например, при системной красной волчанке (СКВ) и IgA-нефропатии, но еще не продемонстрировали длительной и/или полной ремиссии заболевания. Хотя методы лечения, нацеленные на В-клетки, продемонстрировали многообещающий терапевтический потенциал, они не являются полностью удовлетворительными. Например, растворимый рекомбинантный TACI демонстрирует значительные перспективы в качестве терапевтического средства, но его полезному эффекту, по-видимому, препятствует низкая или умеренная аффинность к APRIL.

Среди представленных вариантов осуществления есть те, которые обеспечивают улучшенную нейтрализующую активность и подавление или уменьшение ответов В-клеток. В некоторых вариантах осуществления улучшенная активность опосредуется повышенным или улучшенным связыванием или взаимодействием представленных иммуномодулирующих белков (например, гибридного белка TACI-Fc) с BAFF и/или APRIL. Представленные иммуномодулирующие белки блокируют или нейтрализуют взаимодействия BAFF или APRIL, таких как гомотримеры BAFF или APRIL, гетеротримеры BAFF/APRIL или 60-меры BAFF, с когнатным рецептором, стимулирующим В-клетки и, таким образом, нейтрализуют активность лигандов BAFF и/или APRIL. В некоторых вариантах осуществления представленные иммуномодулирующие белки снижают один или более из В-клеточных ответов или активности, включая способность В-клеток к продукции иммуноглобулинов. В некоторых вариантах осуществления представленные иммуномодулирующие белки (например, гибридный белок TACI-Fc) при введении субъекту снижают уровень циркулирующих сывороточных иммуноглобулинов. В некоторых вариантах осуществления представленные иммуномодулирующие белки снижают одно или более из созревания, дифференцировки и пролиферации В-клеток. В предусмотренных аспектах такая активность улучшена или превосходит ту, которая достигается с помощью гибридного белка TACI-Fc дикого типа (например, телитацицепта или атацицепта). В некоторых вариантах осуществления представленные иммуномодулирующие белки (гибридный белок TACI-Fc) являются терапевтическими средствами-кандидатами для лечения множества аутоиммунных и воспалительных заболеваний, в частности заболеваний, связанных с В-клетками, таких как СКВ, синдром Шегрена и другие заболевания соединительной ткани.

Представленные варианты осуществления относятся к идентификации вариантных полипептидов TACI, сконструированных таким образом, чтобы обеспечить улучшенную аффинность к APRIL и/или BAFF после случайного мутагенеза и направленной эволюции

второго богатого цистеином домена (CRD2) TACI, охватывающего остатки 68-110. Как показано в настоящей заявке, созревание аффинности включало пять селекций, чередующихся между APRIL и BAFF, с одновременным снижением концентрации реагента для отбора для поддержания давления отбора. Результаты продемонстрировали варианты полипептиды TACI, которые проявляют существенно повышенную аффинность к BAFF и APRIL по сравнению с TACI дикого типа. Например, здесь представлены варианты полипептиды TACI, которые содержат одну или несколько аминокислотных замен (замещений или мутаций), которые обеспечивают улучшенную аффинность связывания белка с BAFF и/или APRIL. В частности, среди представленных вариантов осуществления есть те, которые обеспечивают улучшенное комбинированное ингибирование BAFF и APRIL. Таким образом, представленные иммуномодулирующие белки обеспечивают эффективную и длительную супрессию заболевания при лечении аутоиммунных или воспалительных заболеваний, в том числе при тяжелых аутоиммунных заболеваниях, связанных с В-клетками, таких как СКВ.

Например, представленные варианты осуществления основаны на выводах о том, что направленная эволюция посредством аффинной модификации домена TNFR (TD) эктодомена TACI способствовала разработке молекул с улучшенной аффинностью к APRIL и/или BAFF. Таким образом, аффинная модификация приводит к получению вариантного TACI, который содержит вариантный домен TNFR (vTD). Гибридизация таких молекул с Fc иммуноглобулина приводит к образованию иммуномодулирующих белков, которые подавляют активность и ответ В-клеток. Например, переформатированный в растворимый Fc-гибридный белок, вариантный TACI с созревшей аффинностью проявлял ингибирование APRIL и BAFF, как показано здесь в TACI-зависимом репортерном анализе, и с более низкими значениями IC₅₀, чем у аналогов TACI-Fc дикого типа и белимумаба. Кроме того, результаты на оцененных животных моделях демонстрируют быстрое и значительное уменьшение количества ключевых субпопуляций лимфоцитов, включая плазматические клетки, В-клетки зародышевого центра, и фолликулярные Т-хелперные клетки. Кроме того, протестированные варианты молекулы демонстрировали улучшенную активность на мышинных моделях, включая значительное снижение аутоантител и сиаладенита на модели спонтанного SjS, ингибирование отложения IgG в клубочках на модели волчанки, индуцированной у bm12, и сильное подавление аутоиммунных антител к дцДНК, уровней азота мочевины в крови, протеинурии, сиаладенита, поражений почек и отложений иммунных комплексов в почках на модели волчанки NZB/W. Кроме того, по сравнению с TACI-Fc дикого типа, тестируемые гибриды TACI-Fc демонстрировали значительное и стойкое снижение титров

сывороточных антител IgM, IgG и IgA у мышей. Полученные 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. Следовательно, такие биологические препараты могут быть привлекательными кандидатами на разработку для лечения тяжелых аутоиммунных и/или воспалительных заболеваний, включая заболевания, связанные с В-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 предмет обсуждения 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 ссылки на 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 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 различных 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 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 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, содержащим не модифицированный по аффинности, или немодифицированный домен TD.

«Модифицированный по аффинности TACI» (также называемый вариантным TACI) относится к молекуле белка TACI, которая противодействует или блокирует активность рецептора, стимулирующего В-клетки. Например, TACI 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, модулятора кальция и интерактора лиганда циклофилина (TACI). В конкретных вариантах осуществления ВИМ включает внеклеточный домен TACI или часть внеклеточного домена TACI, содержащую домен семейства рецепторов TNF (например, TD, например, CRD), который связывается с когнатными лигандами APRIL и/или BAFF, и гетеротримерами APRIL и BAFF.

Модифицированный по аффинности вариантный внеклеточный домен или его часть из TACI могут включать одну или несколько аминокислотных модификаций (например, аминокислотных замен) в TD, которые повышают аффинность связывания с когнатным лигандом (например, APRIL и/или BAFF и гетеротримерами 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 модулятора кальция и интерактора 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), avidность, 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 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), гидроксипропилкрахмал (ГЭК), XTEN (удлиненные рекомбинантные пептиды; см. WO 2013130683), человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), бычий сывороточный альбумин (БСА), 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 его 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.9 иллюстрирует 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 TD), предназначены для иллюстративных целей и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения представленными 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, 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 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, гибридованные 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, богатые цистеином (CRD). 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 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 внеклеточный домен TACI 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), гидроксипропилкрахмал (ГЭК), XTEN (удлиненные рекомбинантные пептиды; см. WO2013130683), человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), бычий сывороточный альбумин (БСА), липиды (ацилирование) и поли-Про-Ала-Сер (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 внеклеточным доменом TACI 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 мышьяная 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 T-клетка или клетка натурального киллера (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. Parslow (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 переменную 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 переменной области тяжелой цепи и одного домена переменной области легкой цепи, связанных нековалентной ассоциацией. В результате фолдинга этих двух доменов образуются шесть гиперпеременных 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 переменный 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 переменный 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 переменный 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 VH и VL молекулы антитела.

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

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

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 В-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 связывающий 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 может 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 TNFR или к его полноразмерному TD (например, CRD), но который по-прежнему 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. В некоторых вариантах осуществления фрагмент специфического связывания включает домен CRD1 и/или CRD2. В некоторых вариантах осуществления фрагмент специфического связывания включает домен CRD2.

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 TAC1 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 вариантный TD (ν TD) относится к вариантной или модифицированной последовательности TD.

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 бислои, 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 бислои 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 «вариантный» (также «модифицированный» или «мутантный», который может использоваться взаимозаменяемо) применительно к вариантному белку или полипептиду означает белок, такой как белок млекопитающих (например, человеческий или мышинный), 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. Вариантный белок не ограничивается каким-либо конкретным способом получения и включает, например, химический синтез, методы рекомбинантной ДНК или их комбинации. Вариантный белок 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 avidность 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 TAC1 И ВАРИАНТНЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ TAC1

В настоящей заявке представлены иммуномодулирующие белки TAC1, которые содержат часть внеклеточного домена (ECD) рецептора TAC1 или его вариант, которые связываются по меньшей мере с одним когнатным партнером по связыванию TAC1. Также здесь представлены варианты полипептиды TAC1, которые проявляют измененную (например, повышенную) связывающую активность или аффинность к одному или нескольким когнатным партнерам по связыванию TAC1. В некоторых вариантах осуществления когнатный партнер по связыванию TAC1 является одним или несколькими из BAFF или APRIL или является гетеротримером BAFF/APRIL. Предлагаемые иммуномодулирующие белки и полипептиды TAC1 включают их растворимые гибридные белки, в которых часть внеклеточного домена TAC1 или его вариант связаны с другим фрагментом, таким как Fc иммуноглобулина или другой домен мультимеризации или фрагмент, продлевающий период полужизни. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок представляет собой гибридный белок TAC1-Fc. В некоторых вариантах осуществления предусмотрен гибридный белок TAC1-Fc, содержащий (1) полипептид TAC1, состоящий из внеклеточного домена рецептора TAC1 или его части, или вариантный полипептид TAC1, который связывается по меньшей мере с одним когнатным партнером по связыванию TAC1; и (2) домен Fc. Полипептид TAC1 или вариантный полипептид TAC1 может быть связан прямо или опосредованно (например, через пептидный линкер) с Fc-доменом.

TAC1 является членом семейства рецепторов фактора некроза опухоли, характеризующимся наличием внеклеточного домена (ECD), содержащего домены с богатыми цистеином псевдоповторами (CRD). TAC1 является мембраносвязанным рецептором, который имеет внеклеточный домен, содержащий два богатых цистеином псевдоповтора (CRD1 и CRD2), трансмембранный домен и цитоплазматический домен, который взаимодействует с CAML (модулятором кальция и интреактором лиганда циклофилина), интегральным мембранным белком, расположенным во внутриклеточных везикулах, который является коиндуктором активации NF-AT при сверхэкспрессии в клетках Jurkat. TAC1 ассоциирован с В-клетками и субпопуляцией Т-клеток. Рецептор TAC1 связывает два члена семейства лигандов фактора некроза опухоли (TNF). Один лиганд обозначен как BAFF (фактор активации В-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 В-клеток (BCMA) (Gross et al., Nature 404:995 (2000)). Связывание рецептора TACI с его лигандами BAFF или APRIL стимулирует ответы В-клеток, включая Т-клеточно-независимые ответы антител В-клеток, переключение изотипа и гомеостаз В-клеток.

Аминокислотная последовательность полноразмерного TACI указана в SEQ ID NO:88. 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:88. Внеклеточный домен TACI (аминокислотные остатки 1-166 из SEQ ID NO:88; ECD, указанный в SEQ ID NO:122) 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:122. Второй домен, богатый цистеином (CRD2), соответствует аминокислотам 71-104 последовательности, указанной в SEQ ID NO:122. 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:122.

В некоторых вариантах осуществления варианты полипептиды TACI, обеспеченные в настоящей заявке, содержат одну или несколько аминокислотных модификаций, таких как одна или несколько замен (альтернативно, «мутаций» или «замещений»), 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, предлагаемый вариантный полипептид 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 «замещений»), делеций или добавлений, находятся в области CRD1. В

некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных модификаций, таких как одна или несколько замен (альтернативно, «мутаций» или «замещений»), делеций или добавлений, находятся в области CRD2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных модификаций, таких как одна или несколько замен (альтернативно, «мутаций» или «замещений»), делеций или добавлений, находятся в аминокислотах как в CRD1, так и CRD2 областях.

В некоторых вариантах осуществления эталонная (например, немодифицированная) последовательность TAC1 представляет собой последовательность TAC1 дикого типа или ее часть, которая содержит один или оба CRD. В некоторых вариантах осуществления эталонный (например, немодифицированный) TAC1 представляет собой или включает внеклеточный домен (ECD) TAC1 или его часть, содержащую один или оба домена CRD. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен эталонного (например, немодифицированного) полипептида TAC1 содержит CRD1 и CRD2. Однако вариантный полипептид TAC1 необязательно должен содержать как CRD1, так и CRD2. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 содержит или состоит по существу из CRD1 или его фрагмента специфического связывания. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 содержит или состоит по существу из CRD2 или его фрагментов специфического связывания. В некоторых вариантах осуществления вариантный TAC1 является растворимым полипептидом и не имеет трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 дополнительно содержит трансмембранный домен и, в некоторых случаях, также цитоплазматический домен.

В некоторых вариантах осуществления эталонная (например, немодифицированная) последовательность TAC1 представляет собой последовательность TAC1 млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления эталонной (например, немодифицированной) последовательностью TAC1 может быть последовательность TAC1 млекопитающего, которое включает, без ограничения указанными, человека, мышь, яванскую макаку или крысу. В некоторых вариантах осуществления эталонной (например, неизменной) последовательностью TAC1 является человеческая последовательность. Внеклеточный домен эталонной последовательности TAC1 человека указан в SEQ ID NO:122.

В некоторых вариантах осуществления эталонная (например, немодифицированная) последовательность TAC1 содержит (i) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:122, или ее последовательность, в которой отсутствует N-концевой метионин, (ii) аминокислотную 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 SEQ ID NO:122 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:122.

Внеклеточный домен TACI (ECD): SEQ ID NO:122

MSGLGRSRRGGRSRVDQEERFPQGLWTGVAMRSCPEEQYWDPLLGTCSCKTI
CNHQSQRTCAAFCSRSLSCRKEQGKFDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPV
NLPELRRQRSGEVENNSDNSGRYQGLEHRGSEASPALPGLKLSADQVALVYST

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:122. В некоторых вариантах осуществления N-концевая делеция представляет собой делецию N-концевых аминокислотных остатков 1-28, соответствующих остаткам, указанным в SEQ ID NO:122. В некоторых вариантах осуществления N-концевая делеция представляет собой делецию N-концевых аминокислотных остатков 1-29, соответствующих остаткам, указанным в SEQ ID NO:122. В некоторых вариантах осуществления N-концевая делеция представляет собой делецию N-концевых аминокислотных остатков 1-30, соответствующих остаткам, указанным в SEQ ID NO:122. В некоторых вариантах осуществления N-концевая делеция представляет собой делецию N-концевых аминокислотных остатков 1-31, соответствующих остаткам, указанным в SEQ ID NO:122. В некоторых вариантах осуществления N-концевая делеция представляет собой делецию N-концевых аминокислотных остатков 1-32, соответствующих остаткам, указанным в SEQ ID NO:122. В некоторых вариантах осуществления N-концевая делеция представляет собой делецию N-концевых аминокислотных остатков 1-33, соответствующих остаткам, указанным в SEQ ID NO:122.

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 C-концевых аминокислотных

остатков, начиная с остатка 105 и до или включая аминокислотный остаток 166, соответствующий остаткам последовательности ECD, изложенным в SEQ ID NO:122. 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 удалены.

В некоторых вариантах осуществления эталонная (например, немодифицированная) последовательность TAC1 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:122. Например, стволовой сегмент может состоять из следующего со ссылкой на SEQ ID NO:122: 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 от 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 от 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 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 от 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 не имеет 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, неизменная) 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:131.

ECD TACI (CRD1/CRD2): SEQ ID NO:131

SRVDQEER FPQGLWTGVA MRSCPEEQYW DPLLGTCMSCKTICNHQSQR
TCAAFCRSLSCRKEQGKIFYD HLLRDCISCA SICGQHPKQCAYFCENKLRS PVNLPPPEL

В некоторых вариантах осуществления эталонная последовательность TACI представляет собой последовательность ECD TACI, которая содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:130.

ECD TACI (CRD1/CRD2): SEQ ID NO:130

AMRSCPEEQYWDPLLGTCMSCKTICNHQSQR TCAAFCRSLSCRKEQGKIFYDHLL
RDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRS

В некоторых вариантах осуществления эталонная последовательность TACI представляет собой последовательность ECD TACI, которая содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:1 (кодируется последовательностью нуклеотидов, указанной в SEQ ID NO:36).

ECD TACI (CRD1/CRD2): SEQ ID NO:1

VAMRSCPEEQYWDPLLGTCMSCKTICNHQSQR TCAAFCRSLSCRKEQGKIFYDHL
LRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRS

В некоторых вариантах осуществления эталонная последовательность TAC1 представляет собой область внеклеточного домена TAC1, 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 TAC1 для его когнатных лигандов. Например, международная публикация PCT №. WO2002/094852 демонстрирует, что молекула TAC1, 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 TAC1 для его когнатных лигандов, см., например, международную публикацию №. WO2008/154814, где было определено, что остатки 13-118 или 13-108 внеклеточной области TAC1 необходимы для биологической активности при минимизации деградации TAC1 во время экспрессии. Неожиданно здесь обнаружено (например, Пример 3), что внеклеточная область TAC1, 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 TAC1, содержащей как CRD1, так и CRD2.

В настоящей заявке представлен иммуномодулирующий белок (например, гибридный белок TAC1-Fc), содержащий полипептид TAC1, который является частью области внеклеточного домена TAC1 (ECD), которая содержит CRD2, с делецией N-концевой области и CRD1 и делецией одного или нескольких остатков стволовой части внеклеточного домена TAC1, например, относительно последовательности аминокислот, указанной в SEQ ID NO:122. В некоторых вариантах осуществления часть внеклеточного домена TAC1, которая содержит CRD2, включает аминокислотные остатки 71-104, соответствующие остаткам, указанным в SEQ ID NO:122. В представленных вариантах осуществления полипептид TAC1 иммуномодулирующего белка содержит делецию N-концевых аминокислотных остатков 1-66, соответствующих остаткам, указанным в SEQ ID NO:122. В представленных вариантах осуществления полипептид TAC1 иммуномодулирующего белка содержит делецию N-концевых аминокислотных остатков 1-67, соответствующих остаткам, указанным в SEQ ID NO:122. В представленных вариантах осуществления полипептид TAC1 иммуномодулирующего белка содержит делецию N-концевых аминокислотных остатков 1-68, соответствующих остаткам,

указанным в SEQ ID NO:122. В представленных вариантах осуществления полипептид TAC1 иммуномодулирующего белка содержит делецию N-концевых аминокислотных остатков 1-69, соответствующих остаткам, указанным в SEQ ID NO:122. В представленных вариантах полипептид TAC1 иммуномодулирующего белка содержит делецию N-концевых аминокислотных остатков 1-70, соответствующих остаткам, указанным в SEQ ID NO:122. В некоторых вариантах осуществления полипептид TAC1 иммуномодулирующего белка не содержит одного или нескольких смежных C-концевых аминокислотных остатков, начиная с остатка 105 и до или включая аминокислотный остаток 166, соответствующих остаткам последовательности ECD, указанным в SEQ ID NO:122. 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 из последовательности ECD удалены.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок (например, гибридный белок TAC1-Fc), представленный в настоящей заявке, имеет полипептид TAC1 с последовательностью, которая содержит часть ECD, имеющую непрерывную последовательность аминокислот ECD TAC1, которая включает CRD2 (например, остатки 71-104 со ссылкой на SEQ ID NO:122), но с делецией N-концевой области и CRD1 и делецией одного или нескольких остатков стволовой части внеклеточного домена TAC1, например, относительно последовательности аминокислот, указанной в SEQ ID NO:122. Например, часть ECD TAC1 может состоять из следующего со ссылкой на аминокислотные остатки, указанные в SEQ ID NO:122: 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 TAC1 может состоять из следующего со ссылкой на остатки, указанные в SEQ ID NO:122: 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:122: 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:122: 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:122: 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 представленными здесь иммуномодулирующими белками, 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 TAC1.

В частности, среди полипептидов TAC1, представленных в настоящей заявке, есть последовательность ECD TAC1, которая имеет или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:13 (кодируется последовательностью нуклеотидов, указанной в SEQ ID NO:48). В некоторых вариантах осуществления эталонная последовательность TAC1 имеет или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:13, где представленный вариантный полипептид TAC1 модифицирован одной или несколькими аминокислотными модификациями (например, заменой), как описано в настоящей заявке, по сравнению с такой эталонной последовательностью TAC1.

Последовательность ECD TAC1 (CRD2): SEQ ID NO:13

SLSCRKEQGKIFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAFYFCENKLR

Среди представленных полипептидов TAC1 есть вариантные полипептиды TAC1. Также обеспечены иммуномодулирующие белки, такие как гибридные белки TAC1-Fc, которые содержат предложенный вариантный полипептид TAC1. В некоторых из представленных вариантов осуществления вариантная последовательность TAC1 имеет последовательность эталонной (например, немодифицированной) последовательности TAC1, такую как любая описанная выше, но дополнительно содержит еще одну аминокислотную модификацию, такую как одна или несколько аминокислотных замен. В частности, в настоящей заявке предложены вариантные полипептиды TAC1, содержащие 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-доме эталонного (например, немодифицированного или дикого типа) полипептида TAC1, так что вариантный полипептид TAC1 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 TAC1. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 имеет аффинность связывания с APRIL и/или BAFF, которая отличается от аффинности эталонной (например, немодифицированной или дикого типа) контрольной последовательности полипептида TAC1, 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 TAC1 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 вариантный полипептид TACI обладает повышенной аффинностью связывания с BAFF по сравнению с эталонным (немодифицированным или дикого типа) полипептидом TACI. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI обладает повышенной аффинностью связывания с APRIL по сравнению с эталонным (немодифицированным или дикого типа) полипептидом TACI. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI обладает 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 мышинный белок. В некоторых вариантах осуществления когнатными лигандами BAFF и/или APRIL являются человеческие белки. В некоторых вариантах осуществления 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} М, 1×10^{-6} М, 1×10^{-7} М, 1×10^{-8} М, 1×10^{-9} М, 1×10^{-10} М или 1×10^{-11} М, или 1×10^{-12} М. В некоторых вариантах осуществления K_d любого из вышеуказанных вариантов осуществления для BAFF составляет менее или примерно 1×10^{-9} М, 1×10^{-10} М или 1×10^{-11} М, или 1×10^{-12} М. В некоторых вариантах осуществления K_d любого из вышеупомянутых вариантов осуществления для BAFF составляет от 1×10^{-9} М до или примерно 1×10^{-12} М. В некоторых вариантах осуществления K_d любого из вышеупомянутых вариантов осуществления для BAFF составляет точно или примерно 1×10^{-9} М, точно или примерно 2×10^{-9} М, точно или примерно 4×10^{-9} М, точно или примерно 6×10^{-9} М, точно или примерно 8×10^{-9} М, точно или примерно 1×10^{-10} М, точно или примерно 2×10^{-10} М, точно

или примерно 4×10^{-10} М, точно или примерно 6×10^{-10} М, точно или примерно 8×10^{-10} М, точно или примерно 1×10^{-11} М, точно или примерно 2×10^{-11} М, точно или примерно 4×10^{-11} М, точно или примерно 6×10^{-11} М, точно или примерно 8×10^{-11} М, точно или примерно 1×10^{-12} М, или любое значение между любым из вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления обеспечен 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} М, 1×10^{-6} М, 1×10^{-7} М, 1×10^{-8} М, 1×10^{-9} М, 1×10^{-10} М или 1×10^{-11} М, или 1×10^{-12} М. В некоторых вариантах осуществления K_d любого из вышеупомянутых вариантов осуществления для APRIL составляет менее или примерно 1×10^{-9} М, 1×10^{-10} М или 1×10^{-11} М, или 1×10^{-12} М. В некоторых вариантах осуществления K_d любого из вышеуказанных вариантов осуществления для APRIL составляет от 1×10^{-9} М до точно или примерно 1×10^{-12} М. В некоторых вариантах осуществления K_d любого из вышеуказанных вариантов осуществления для APRIL составляет точно или примерно 1×10^{-9} М, точно или примерно 2×10^{-9} М, точно или примерно 4×10^{-9} М, точно или примерно 6×10^{-9} М, точно или примерно 8×10^{-9} М, точно или примерно 1×10^{-10} М, точно или примерно 2×10^{-10} М, точно или примерно 4×10^{-10} М, точно или примерно 6×10^{-10} М, точно или примерно 8×10^{-10} М, точно или примерно 1×10^{-11} М, точно или примерно 2×10^{-11} М, точно или примерно 4×10^{-11} М, точно или примерно 6×10^{-11} М, точно или примерно 8×10^{-11} М, или точно или примерно 1×10^{-12} М, или любое значение между любыми из вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления обеспечен 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, неизменная или дикого типа) последовательность TACI не обязательно должна использоваться в качестве исходной композиции для получения вариантного полипептида TACI, описанного в настоящей заявке. Следовательно, использование термина «модификация», такого как «замена», не подразумевает, что настоящие варианты осуществления ограничены конкретным способом получения вариантных полипептидов TACI или иммуномодулирующих белков, содержащих их. Вариантные полипептиды 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 разрабатывают или создают варианты полипептиды 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 представляет 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) в вариантном полипептиде TACI, обозначается номером аминокислотного положения, соответствующим нумерации положений эталонной последовательности ECD, изложенной в SEQ ID NO:122. 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:1 или 13) с SEQ ID NO:122. Выравнивание, идентифицирующее соответствующие остатки, показано на Фигуре 9. 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 вариантный полипептид TACI 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 вариантный полипептид 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, последовательности эталонного TACI. Модификация, например, замена, может быть в домене CRD1 или домене CRD2. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид 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 эталонного полипептида TACI. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид 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 эталонного полипептида TACI.

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, указанным в SEQ ID NO:122, или его фрагментом специфического связывания, содержащим домен CRD1 и/или CRD2. В некоторых вариантах осуществления фрагмент специфического связывания содержит домен CRD1, например, фрагмент специфического связывания содержит последовательность, указанную в виде аминокислот 34-66 из SEQ ID NO:122. В некоторых случаях домен CRD1 является единственным полным доменом CRD во фрагменте специфического связывания. В некоторых вариантах осуществления фрагмент

специфического связывания представляет собой домен CRD2 или содержит его, например, фрагмент специфического связывания содержит последовательность, указанную в виде аминокислот 71-104 из SEQ ID NO:122. В некоторых случаях домен CRD2 является единственным полным доменом CRD во фрагменте специфического связывания. В некоторых вариантах осуществления фрагмент специфического связывания представляет собой или содержит домен CRD1 и домен CRD2, например, фрагмент специфического связывания содержит аминокислоты 34-104 из SEQ ID NO:122. В некоторых вариантах осуществления фрагмент специфического связывания содержит непрерывную часть стволового домена, например, фрагмент специфического связывания содержит непрерывную часть из аминокислот 105-165 из SEQ ID NO:122. В некоторых вариантах осуществления фрагмент специфического связывания SEQ ID NO:122 меньше, чем полноразмерный ECD, указанный в SEQ ID NO:122. В некоторых вариантах осуществления фрагмент специфического связывания указан в SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления фрагмент специфического связывания указан в SEQ ID NO:13. В некоторых вариантах осуществления фрагмент специфического связывания указан в SEQ ID NO:130. В некоторых вариантах осуществления фрагмент специфического связывания указан в SEQ ID NO:131.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1, 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 эталонным (например, немодифицированным или дикого типа) полипептидом TAC1 или его фрагментом специфического связывания, например, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1, 13 или 122.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1, 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:122.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1, 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:1.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1, 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:13.

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:130.

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:131.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замену, в эталонном полипептиде TACI или его фрагменте специфического связывания в соответствующем положении (положениях) 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:122. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, выбранных 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 указан в SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:122.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены находятся только в домене CRD2. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замен в эталонном полипептиде TACI или его фрагменте специфического связывания в соответствующем положении (положениях) 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 SEQ ID NO:122. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, выбранных 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 TAC1 включает только домен CRD2, но не имеет домена CRD1, например, эталонный полипептид TAC1 указан в SEQ ID NO:13. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 включает часть последовательности ECD полипептида TAC1, 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 вариантный полипептид TAC1 включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении 75 со ссылкой на нумерацию SEQ ID NO:122. 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 TAC1, 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 TAC1. 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 вариантный полипептид TAC1 включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении 77 со ссылкой на нумерацию SEQ ID NO:122. 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 TAC1, 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 вариантный полипептид TAC1 включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении 78 со ссылкой на нумерацию SEQ ID NO:122. 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 TAC1, 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 TAC1. В некоторых вариантах осуществления замещенная аминокислота в положении 78 представляет собой фенилаланин (Phe, 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 вариантный полипептид TAC1, включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении 84 со ссылкой на нумерацию SEQ ID NO:122. 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 TAC1, 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 вариантный полипептид TAC1 включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении 101 со ссылкой на нумерацию SEQ ID NO:122. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена в положении 101 обеспечивает повышенное связывание с BAFF или APRIL по сравнению с эталонным (например, диким типом или немодифицированным) полипептидом TAC1, не содержащим аминокислотную замену. В некоторых вариантах осуществления замещенная аминокислота в положении 101 представляет собой кислую аминокислоту или амид. В некоторых вариантах осуществления замещенная аминокислота в положении 101 представляет собой глутаминовую кислоту (Glu, E). В некоторых вариантах осуществления замещенная аминокислота в положении 101 представляет собой аспарагиновую кислоту (Asp, D). В некоторых вариантах осуществления замещенная аминокислота в положении 101 представляет собой аспарагин (Asn, N). В некоторых вариантах осуществления замещенная аминокислота в положении 101 представляет собой глутамин (Gln, Q).

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении 102 со ссылкой на нумерацию SEQ ID NO:122. 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 TAC1, 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 вариантный полипептид TAC1 включает по меньшей мере одну аминокислотную замену E74V. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 включает по меньшей мере одну аминокислотную замену Q75E. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 включает по меньшей мере одну аминокислотную замену K77E. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 включает по меньшей мере

мере одну аминокислотную замену F78Y. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI включает по меньшей мере одну аминокислотную замену Y79F. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI включает по меньшей мере одну аминокислотную замену L82H. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI включает по меньшей мере одну аминокислотную замену L82P. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI включает по меньшей мере одну аминокислотную замену R84G. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI включает по меньшей мере одну аминокислотную замену R84L. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI включает по меньшей мере одну аминокислотную замену R84Q. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI включает по меньшей мере одну аминокислотную замену D85V. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI включает по меньшей мере одну аминокислотную замену C86Y. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI включает по меньшей мере одну аминокислотную замену A101D. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI включает по меньшей мере одну аминокислотную замену Y102D. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI содержит две или более аминокислотных замен любых двух или более из вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI включает одну или несколько аминокислотных замен, которые являются консервативной аминокислотной заменой любого из вышеперечисленных. В представленных вариантах осуществления вариантный полипептид 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:1. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:13. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:130. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:131.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI включает аминокислотную замену E74V. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI включает аминокислотную замену Q75E. В некоторых вариантах

осуществления вариантный полипептид TACI включает аминокислотную замену K77E. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI включает аминокислотную замену F78Y. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI включает аминокислотную замену Y79F. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI включает аминокислотную замену L82H. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI включает аминокислотную замену L82P. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI включает аминокислотную замену R84G. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI включает аминокислотную замену R84L. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI включает аминокислотную замену R84Q. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI включает аминокислотную замену D85V. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI включает аминокислотную замену C86Y. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI включает аминокислотную замену A102D. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI включает аминокислотную замену Y102D. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI содержит две или более аминокислотных замен любых двух или более из вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI включает одну или несколько аминокислотных замен, которые являются консервативной аминокислотной заменой любой из вышеперечисленных. В представленных вариантах осуществления вариантный полипептид 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:1. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:13. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:130. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:131.

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 вариантный полипептид 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:1. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:13. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:130. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TACI, указанной в SEQ ID NO:131.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI включает одну или несколько аминокислотных замен из Q75E, K77E, F78Y, R84G, R84Q, A101D или Y102D, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI включает любые 1, 2, 3, 4, 5 или 6 из вышеуказанных аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI содержит одну из вышеуказанных аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI содержит две из вышеуказанных

аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI содержит три из вышеуказанных аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI содержит четыре из вышеуказанных аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI содержит пять из вышеуказанных аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI содержит шесть из вышеуказанных аминокислотных замен.

В некоторых из любых вариантов осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают Q75E/R84Q. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают Q75E/K77E. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают Q75E/F78Y. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают Q75E/A101D. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают Q75E/Y102D. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают F77E/F78Y. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают K77E/R84Q. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают K77E/A101D. В некоторых вариантах осуществления еще одна аминокислотная замена включают K77E/Y102D. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают F78Y/R84Q. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают F78Y/A101D. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают F78Y/Y102D. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают R84Q/A101D. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают R84Q/Y102D. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают A101D/Y102D. В представленных вариантах осуществления вариантный полипептид TACI включает аминокислотные замены в любой описанной последовательности эталонного полипептида TACI, например, в последовательности, указанной в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:130 или SEQ ID NO:131.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI включает аминокислотную замену (замены) R84G, A101D, K77E/R84Q, K77E/A101D, K77E/F78Y, K77E/F78Y/Y102D, Q75E/R84Q, K77E/A101D/Y102D, R84Q, K77E, A101D, Q75E, K77E/F78Y/R84Q, F78Y, F78Y/R84Q, F78Y/A101D, F78Y/Y102D или K77E/Y102D. В представленных вариантах осуществления вариантный полипептид TACI включает

указанной в SEQ ID NO:131.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 содержит аминокислотные замены K77E, F78Y и Y102D (K77E/F78Y/Y102D). В представленных вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 включает аминокислотные замены в любой эталонной последовательности полипептида TAC1, как описано. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TAC1, указанной в SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TAC1, указанной в SEQ ID NO:13. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TAC1, указанной в SEQ ID NO:130. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TAC1, указанной в SEQ ID NO:131.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 содержит аминокислотные замены Q75E/R84Q. В представленных вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 включает аминокислотные замены в любой эталонной последовательности полипептида TAC1, как описано. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TAC1, указанной в SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TAC1, указанной в SEQ ID NO:13. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TAC1, указанной в SEQ ID NO:130. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в эталонной последовательности TAC1, указанной в SEQ ID NO:131.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 содержит любую из мутаций, перечисленных в Таблице 1. В Таблице 1 также приведены примерные последовательности со ссылкой на SEQ ID NO эталонного (например, немодифицированного) полипептида TAC1 и примерные вариантные полипептиды TAC1. 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 вариантного полипептида TAC1, например, для обеспечения надлежащего фолдинга домена при экспрессии. Таким образом, понятно, что приведенная в Таблице 1 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, на 1-10, например, на 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 вариантный полипептид TACI содержит любую из мутаций (аминокислотных замен), перечисленных в Таблице 1. В некоторых примерах мутации (аминокислотные замены) производят в эталонном TACI, содержащем последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:122. В некоторых примерах мутации (аминокислотные замены) производят в эталонном TACI, который содержит домены CRD1 и CRD2 TACI, например, как указано в SEQ ID NO:1. 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:13.

Использование термина «модификация», такого как «замена» или «мутация», не подразумевает, что настоящие варианты осуществления ограничены конкретным способом получения иммуномодулирующих белков. Вариантный полипептид TACI 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 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 представляет такую информацию, и его веб-сайт является общедоступным через Интернет, как и база данных UniProtKB.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI включает последовательности внеклеточного домена (ECD), содержащие CRD1 и CRD2, такие как вариантный полипептид TACI, указанный в любой из SEQ ID NO:2-12, 21, 22, 101-120. В

некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид 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:2-12, 21, 22, 101-120, и сохраняет аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены), отсутствующую в эталонном (например, немодифицированном или дикого типа) TACI. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI содержит фрагмент специфического связывания любой из SEQ ID NO:2-12, 21, 22, 101-120, 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 вариантный полипептид TACI состоит по существу или состоит из последовательностей внеклеточного домена вариантного TACI (ECD), изложенных в любой из SEQ ID NO:2-12, 21, 22, 101-120. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид 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:2-12, 21, 22, 101-120, и сохраняет аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены), отсутствующую в эталонном (например, немодифицированном или дикого типа) TACI. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI состоит по существу или состоит из фрагмента специфического связывания любой из SEQ ID NO:2-12, 21, 22, 101-120, 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 вариантный полипептид 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:14-20, 23-25, 92-100, 177-192. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид 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:14-20, 23-25, 92-100, 177-192, и сохраняет аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены), отсутствующую в эталонном (например, немодифицированном или дикого типа) TACI. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI содержит фрагмент специфического связывания любой из SEQ ID NO:14-20, 23-25, 92-100, 177-192, 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 вариантный полипептид TACI состоит по существу или состоит из последовательности, изложенной в любой из SEQ ID NO:14-20, 23-25, 92-100, 177-192. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид 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:14-20, 23-25, 92-100, 177-192, и сохраняет аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены), отсутствующую в эталонном (например, немодифицированном или дикого типа) TACI. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI состоит по существу или состоит из фрагмента специфического связывания любой из SEQ ID NO:14-20, 23-25, 92-100, 177-192, 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 вариантный полипептид TACI содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:20. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TACI состоит по существу из последовательности, указанной в

SEQ ID NO:20. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:20.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:26. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 состоит по существу из последовательности, указанной в SEQ ID NO:26. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:26.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:27. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 состоит по существу из последовательности, указанной в SEQ ID NO:27. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:27.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:107. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 состоит по существу из последовательности, указанной в SEQ ID NO:107. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:107.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 кодируется последовательностью нуклеотидов, указанной в любой из SEQ ID NO:37-47, 56 или 57. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 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:37-47, 56 или 57, и сохраняет аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены), отсутствующую в эталонном (например, немодифицированном или дикого типа) TAC1. Также обеспечена нуклеиновая кислота, кодирующая последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO:37-47, 56 или 57, или 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:37-47, 56 или 57.

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид TAC1 кодируется

последовательностью нуклеотидов, указанной в любой из SEQ ID NO:49-55 или 58-70. 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:49-55 или 58-70, и сохраняет аминокислотную модификацию (модификации), например, замену (замены), отсутствующую в эталонном (например, немодифицированном или дикого типа) TACI. Также обеспечивается нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, указанную в любых из SEQ ID NO:49-55 или 58-70, или 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, такой как по меньшей мере 96% идентичности, 97% идентичности, 98% идентичности или 99% идентичности с любой из SEQ ID NO:49-55 или 58-70.

Таблица 1: Примерный вариантный 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
1 (WT) TACI CRD1/CRD2 13 (WT) TACI CRD2	Дикий тип	1	36	13	48
2 TACI CRD1/CRD2 92 TACI CRD2	L82P	2	37	92	
3 TACI CRD1/CRD2 93 TACI CRD2	D85E, K98T	3	38	93	
4 TACI CRD1/CRD2 94 TACI CRD2	I87L, K98T	4	39	94	
5 TACI CRD1/CRD2	R60G, Q75E, L82P	5	40		
6 TACI CRD1/CRD2	R60G, C86Y	6	41		
7 TACI CRD1/CRD2 95 TACI CRD2	A101D	7	42	95	
8 TACI CRD1/CRD2 96 TACI CRD2	C86Y	8	43	96	
9 TACI CRD1/CRD2	W40R, L82P, F103Y	9	44		
10 TACI CRD1/CRD2	W40R, Q59R, T61P, K98T	10	45		
11 TACI CRD1/CRD2 97 TACI CRD2	L82P, I87L	11	46	97	

Таблица 1: Примерный вариантный 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
12 TACI CRD1/CRD2 98 TACI CRD2	G76S, P97S	12	47	98	
101 TACI CRD1/CRD2 14 TACI CRD2	D85V	101		14	49
102 TACI CRD1/CRD2 15 TACI CRD2	E74V	102		15	50
103 TACI CRD1/CRD2 16 TACI CRD2	R84L	103		16	51
104 TACI CRD1/CRD2 17 TACI CRD2	K77E, R84L, F103Y	104		17	52
105 TACI CRD1/CRD2 18 TACI CRD2	Y79F, Q99E	105		18	53
106 TACI CRD1/CRD2 19 TACI CRD2	Y79F	106		19	54
107 TACI CRD1/CRD2 20 TACI CRD2	R84G	107		20	55
21 TACI CRD1/CRD2 99 TACI CRD2	L83S, F103S	21	56	99	
22 TACI CRD1/CRD2 100 TACI CRD2	L82H	22	57	100	
108 TACI CRD1/CRD2 23 TACI CRD2	A101D	108		23	58
109 TACI CRD1/CRD2 24 TACI CRD2	K77E, R84Q	109		24	59
110 TACI CRD1/CRD2 25 TACI CRD2	K77E, A101D	110		25	60
111 TACI CRD1/CRD2 26 TACI CRD2	K77E, F78Y, Y102D	111		26	61
112 TACI CRD1/CRD2 27 TACI CRD2	Q75E, R84Q	112		27	62
113 TACI CRD1/CRD2 28 TACI CRD2	Q75R, R84G, I92V	113		28	63
114 TACI CRD1/CRD2 29 TACI CRD2	K77E, A101D, Y102D	114		29	64
115 TACI CRD1/CRD2 30 TACI CRD2	R84Q	115		30	65
116 TACI CRD1/CRD2 31 TACI CRD2	R84Q, S88N, A101D	116		31	66
117 TACI CRD1/CRD2 32 TACI CRD2	K77E	117		32	67
118 TACI CRD1/CRD2 33 TACI CRD2	R84Q, F103V	118		33	68
119 TACI CRD1/CRD2 34 TACI CRD2	K77E, Q95R, A101D	119		34	69

Таблица 1: Примерный вариантный TAC1					
Название	Мутация (мутации)	ECD (CRD1/CRD2)		ECD (CRD2)	
		AA SEQ ID NO	NT SEQ ID NO	AA SEQ ID NO	NT SEQ ID NO
120 TAC1 CRD1/CRD2 35 TAC1 CRD2	I87M, A101D	120		35	70
177 TAC1 CRD2	Q75E			177	
178 TAC1 CRD2	Q75E, K77E			178	
179 TAC1 CRD2	Q75E, F78Y			179	
180 TAC1 CRD2	Q75E, A101D			180	
181 TAC1 CRD2	Q75E, Y102D			181	
182 TAC1 CRD2	K77E, F78Y, R84Q			182	
183 TAC1 CRD2	F78Y			183	
184 TAC1 CRD2	F78Y, R84Q			184	
185 TAC1 CRD2	F78Y, A101D			185	
186 TAC1 CRD2	F78Y, Y102D			186	
187 TAC1 CRD2	R84Q, A101D			187	
188 TAC1 CRD2	R84Q, Y102D			188	
189 TAC1 CRD2	A101D, Y102D			189	
190 TAC1 CRD2	Y102D			190	
191 TAC1 CRD2	K77E, F78Y			191	
192 TAC1 CRD2	K77E, Y102D			192	

В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке также представлены гибридные последовательности ECD TAC1, где любая из вышеуказанных последовательностей ECD TAC1 связана или гибридована с доменом мультимеризации, таким как любой описанный в настоящей заявке.

Взаимодействие двух или более полипептидов из иммуномодулирующих белков может быть облегчено их связыванием, либо прямо, либо опосредованно, 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 полипептидов 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. 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, чтобы 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.

Полипептидная последовательность TAC1 (например, последовательность вариантного полипептида TAC1) может быть присоединена 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 полипептидную последовательность TAC1 или ее часть, такую как любой описанный ECD TAC1, включая последовательность вариантного полипептида TAC1, 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 последовательности полипептида TAC1 соединен с N-концом домена мультимеризации. В некоторых случаях конструкция может кодировать химерный белок, где N-конец последовательности полипептида TAC1 присоединен к N- или C-концу домена мультимеризации.

Полипептидный мультимер содержит два химерных белка, созданных путем прямого или опосредованного связывания двух одинаковых или разных последовательностей полипептида TAC1 (например, двух одинаковых или разных последовательностей вариантного полипептида TAC1) прямо или опосредованно с доменом мультимеризации. В некоторых примерах, где домен мультимеризации представляет собой полипептид, гибрид генов, кодирующих последовательность полипептида TAC1 (например, последовательность вариантного полипептида TAC1) 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 полипептидом TAC1 (например, вариантным полипептидом TAC1) 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 А 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 домен мультимеризации представляет собой Fc-область иммуноглобулина.

В некоторых вариантах осуществления домен мультимеризации представляет собой Fc-область иммуноглобулина (например, IgG1), где гибридный белок представляет собой TACI-Fc, содержащий (1) последовательность TACI, содержащую или состоящую из любой из указанных последовательностей ECD TACI; и (2) Fc-область иммуноглобулина. Таким образом, среди представленных вариантов осуществления имеются гибридные белки TACI-Fc, содержащие (1) последовательность TACI, содержащую или состоящую из любой из вышеописанных последовательностей полипептида ECD TACI, таких как вариантный полипептид TACI; и (2) Fc-область иммуноглобулина.

В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке представлена гибридная последовательность TACI-Fc, которая содержит (1) последовательность ECD TACI, включающую последовательность, указанную в SEQ ID NO:13, и (2) Fc-область иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке представлена гибридная последовательность TACI-Fc, которая содержит (1) последовательность ECD TACI, которая состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:13, и (2) Fc-область иммуноглобулина.

В некоторых вариантах осуществления гибридный TACI-Fc представляет собой вариантный гибридный TACI-Fc, содержащий или состоящий из любого из вышеописанных вариантных полипептидов TACI и Fc-области иммуноглобулина.

В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке представлена вариантная гибридная последовательность TACI-Fc, которая включает (1) последовательность ECD TACI, содержащую CRD1 и CRD2, например, последовательность TACI, которая содержит последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO:2-12, 21, 22, 101-120, и (2) Fc-область иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления здесь представлена вариантная гибридная последовательность TACI-Fc, которая включает (1) последовательность ECD TACI, содержащую CRD1 и CRD2, например, последовательность TACI, которая состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO:2-12, 21, 22, 101-120, и (2) Fc-

область иммуноглобулина.

В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке представлена вариантная гибридная последовательность TACI-Fc, которая включает (1) последовательность ECD TACI, содержащую CRD2, но лишенную домена CRD1, например, последовательность TACI, которая содержит последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO:14-20, 23-35, 92-100, 177-192 и (2) Fc-область иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке представлена вариантная гибридная последовательность TACI-Fc, которая включает (1) последовательность ECD TACI, содержащую домен CRD2, но лишенную домена CRD1, например, последовательность TACI, которая состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO:14-20, 23-35, 92-100, 177-192 и (2) Fc-область иммуноглобулина.

В представленных вариантах осуществления TACI-Fc Fc-область иммуноглобулина может представлять собой Fc иммуноглобулина дикого типа, такую как Fc IgG1. В некоторых случаях Fc-область может быть вариантной Fc, не имеющей эффекторной функции (также называемой «безэффекторной Fc»). Примерные Fc-области и их варианты в представленных TACI-Fc гибридных белках описаны ниже.

В некоторых вариантах осуществления Fc является мышьиной или человеческой Fc. В некоторых вариантах осуществления Fc представляет собой области Fc IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 млекопитающих или человека.

В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой или содержит последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO:71, 73, 75, 81, 82, 83, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 173, 174, 175, 176, 193, 218, 219, 220 или 221. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой или получена из IgG1, такого как указано в любой из SEQ ID NO:71, 73, 75, 81, 82, 83, 134, 135, 136, 137, 139, 140, 173, 174, 175, 176, 193, 218, 220 или 221. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой или получена из IgG2, такой как любая, указанная в SEQ ID NO:138 или 219. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой или получена из IgG4, такой как любая, указанная в SEQ ID NO:139, 140 или 220. В некоторых вариантах осуществления Fc-область в Fc-гибридных белках, представленных в настоящей заявке, также может включать Fc-область, которая проявляет по меньшей мере примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с любой из вышеуказанных Fc-областей.

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:71, имеющую аллотип, содержащий остатки Glu (E) и Met (M) в положениях 356 и 358 по нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления Fc содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:71, 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:71. 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:81. 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:81, 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:81.

В некоторых вариантах осуществления Fc область имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:81.

EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:81).

В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO:173. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:174. 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:138, 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:138. В некоторых вариантах осуществления Fc область представляет собой область Fc IgG2, которая имеет последовательность, указанную в SEQ

ID NO:138. В некоторых вариантах осуществления Fc область представляет собой область Fc IgG2, которая имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:219.

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:139, 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:139. 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, Labrijn et al. (2009) *Nat. Biotechnol.*, 27(8): 767-71). В некоторых вариантах осуществления Fc содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:140, 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:140. В некоторых вариантах осуществления Fc область представляет собой область Fc IgG4, указанную в SEQ ID NO:140. В некоторых вариантах осуществления Fc область представляет собой область Fc IgG4, указанную в SEQ ID NO:220.

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 обеспечения инертности Fc к Fc-эффекторной функции. Примеры безэффекторных или инертных мутаций включают мутации, описанные в настоящей заявке.

В некоторых вариантах осуществления Fc область содержит одну или несколько модификаций 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 представленными Fc гибридными белками.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных модификаций могут быть введены в Fc-область, тем самым создавая вариантную Fc-область. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc-область 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 представленные 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 FcγR (следовательно, вероятно, не обладает активностью ADCC), но сохраняет способность связывать FcRn. Первичные клетки, опосредующие ADCC, NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRIII и FCγRIIIb. 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, нерадиоактивный анализ цитотоксичности АСТИ™ для проточной цитометрии (CellTechnology, Inc. Маунтин-Вью, Калифорния; и нерадиоактивный анализ

цитотоксичности CytoTox 96™ (Promega, Мэдисон, Висконсин). Полезные эффекторные клетки для таких анализов включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMС) и клетки натуральные киллеры (NK). Альтернативно или дополнительно, активность ADCC представляющей интерес молекулы может быть оценена *in vivo*, например, на животной модели, такой как описана 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 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 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 вариантную Fc-область, содержащую 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 производят 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 вариантная Fc-область, включающая одну или несколько аминокислотных модификаций (например, аминокислотных замен), 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:71, имеющей аллотип, содержащий остатки Glu (E) и Met (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:71. 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:81. Таким образом, в некоторых случаях вариантная Fc является производной от аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID

NO:81.

В некоторых вариантах осуществления в Fc-области отсутствует С-концевой лизин, соответствующий положению 232 дикого типа или немодифицированной Fc, указанной в SEQ ID NO:71 или 81 (соответствует K447del по нумерации EU).

В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc-область содержит аминокислотную модификацию C5S дикого типа или немодифицированную Fc-область по нумерации SEQ ID NO:71 (соответствует C220S по нумерации EU).

В некоторых вариантах осуществления Fc-область является вариантной Fc, которая содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, которая является N82G по нумерации SEQ ID NO:71 (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:71 (соответствует R292C или V302C по нумерации EU). В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc-область дополнительно содержит модификацию аминокислоты C5S по нумерации SEQ ID NO:71 (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:71), например, Fc область содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:82.

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:175. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:176. 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 модифицирована 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 сниженную эффекторную функцию, приведены в SEQ ID NO:83 и SEQ ID NO:75, которые основаны на аллотипах, указанных в SEQ ID NO:71 или SEQ ID NO:81, 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:73, 75, 83 или 136. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:73. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:75. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:83. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:136.

В некоторых вариантах осуществления область Fc представляет собой вариантную Fc, который имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:73.

EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:73).

В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой Fc IgG1, но не содержит шарнирной последовательности. В некоторых вариантах осуществления Fc-область IgG1 не содержит шарнирной последовательности EPKSC (SEQ ID NO:239). В некоторых вариантах осуществления область Fc IgG1 не содержит шарнирной последовательности EPKSS (SEQ ID NO:238).

В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой вариантную Fc, которая имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:221.

DKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:221)

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:134. В некоторых вариантах осуществления в Fc-области отсутствует С-концевой лизин, соответствующий положению 232 дикого типа или немодифицированной Fc, указанной в SEQ ID NO:71 (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 немодифицированной Fc, указанной в SEQ ID NO:586 (соответствует K447del по нумерации EU). Примерная вариантная Fc-область для использования в иммуномодулирующих белковых конструкциях указана в SEQ ID NO:135.

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 С-концевой лизин, соответствующий положению 232 дикого типа или немодифицированной Fc, указанной в SEQ ID NO:71 (соответствует K447del по нумерации EU). Примерная вариантная Fc-область для использования в иммуномодулирующих белковых конструкциях указана в SEQ ID NO:137.

Примеры таких Fc-областей для включения в иммуномодулирующий полипептид приведены в Таблице 2.

Таблица 2: Примерные Fc области, дикого типа или вариантыные (безэффеторные)		
Fc мутации (нумерация EU)	356E/358M аллотип SEQ ID NO	356D/358L аллотип SEQ ID NO
(дикий тип)	71	81 (с C220S, K447del)
C220S, R292C, N297G, V302C	82	
C220S, R292C, N297G, V302C, K447del	135	
C220S, L234A, L235E, G237A	83	75
C220S, L234A, L235E, G237A, K447del	136	73
L234A, L235E, G237A, K447del, с делецией шарнира		221
C220S, L235P, L234V, L235A, G236del, S267K	134	
C220S/E233P/L234V/L235A/G236del/S267K/K447del	137	
L234A, L235E, G237A, A330S, P331S		176
L234A, L235E, G237A, A330S, P331S, с делецией шарнира		175

В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой вариантную Fc-область, содержащий любую комбинацию Fc-мутаций в Таблице 2. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой вариантную Fc-область, имеющую последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO в Таблице 2.

Например, вариантная Fc-область может представлять собой безэффекторную Fc, которая проявляет пониженную эффекторную активность по сравнению с IgG1 дикого типа, указанную в SEQ ID NO:71 или SEQ ID NO:81. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc содержит последовательность аминокислот, указанную в любой из SEQ ID NO:75, 82, 83, 134, 73, 135, 136, или 137, 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 любой из SEQ ID NO:75, 82, 83, 134, 73, 135, 136 или 137. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:73. В вариантах осуществления при продукции и экспрессии из клеток предлагаемый иммуномодулирующий белок (например, гибрид TACI-Fc) 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, где первый и второй полипептиды являются разными. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-гибридный полипептид содержит Fc-область и одну или несколько последовательностей вариантного полипептида TACI, а второй гибридный полипептид содержит Fc-область и одну или несколько полипептидных последовательностей TACI. В таких вариантах осуществления Fc-область может быть областью, которая способствует 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 Glu (E) и Met (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 СНЗ 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 СНЗ 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 СНЗ 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 образующихся выступы будут выступать в окружающий растворитель, а не будут размещены в компенсационной полости в партнерском домене СНЗ.

В некоторых вариантах осуществления гетеродимерная молекула содержит мутацию T366W в домене СНЗ «цепи выступа» и мутации T366S, L368A, Y407V в домене СНЗ «цепи впадины». В некоторых случаях также может быть использован дополнительный межцепочечный дисульфидный мостик между доменами СНЗ (Merchant, A. M., et al., *Nature Biotech.* 16 (1998) 677-681), например, путем введения мутации Y349C в домен СНЗ цепи «выступов» или «впадин» и мутации E356C или мутации S354C в домен СНЗ другой цепи. В некоторых вариантах гетеродимерная молекула содержит мутации S354C, T366W в одном из двух доменов СНЗ и мутации Y349C, T366S, L368A, Y407V в другом из двух доменов СНЗ. Например, выступ Fc может включать последовательность, указанную в SEQ ID NO:89, содержащую S354C и T366W, и впадину Fc, указанную в SEQ ID NO:90, содержащую мутации Y349C, T366S, L368A и Y407V). В

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

В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc, содержащая модификации выступа (ручки) или полости (впадины) СНЗ, может быть присоединена к мультидоменному иммуномодулирующему полипептиду в любом месте, но обычно через его N- или C-конец, к N- или C-концу одной или нескольких последовательностей полипептида TАСI (например, последовательности вариантного полипептида TАСI), например, с образованием гибридного полипептида. Связь может быть прямой или опосредованной через линкер. Как правило, молекулу «выступ-во-впадину» генерируют путем совместной экспрессии первого иммуномодулирующего полипептида, связанного с вариантной Fc, содержащей модификацию (модификации) впадины СНЗ, со вторым иммуномодулирующим полипептидом, связанным с вариантной Fc, содержащей модификацию (модификации) полости СНЗ.

Примерные последовательности для выступа во впадину полипептидов Fc приведены в SEQ ID NO:128 и 129, соответственно. В некоторых вариантах осуществления выступ во впадину Fc области не имеет C-концевого лизина, соответствующего положению 232 дикого типа или немодифицированной Fc, указанной в SEQ ID NO:71 (соответствует K447del по нумерации EU). Примерные последовательности для полипептидов Fc выступа во впадину приведены в SEQ ID NO:89 и 90, соответственно.

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:146 (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:146.

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:147 (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:147.

В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность TACI (например, вариантная полипептидная последовательность TACI) присоединяется к домену мультимеризации (например, Fc-области) с помощью линкера, такого как пептидный линкер. 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 представляет собой (в однобуквенном аминокислотном коде): GGGGS («4GS»; SEQ ID NO:77) 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:78), (GGGGS)₃ (SEQ ID NO:79), (GGGGS)₄ (SEQ ID NO:84) или (GGGGS)₅ (SEQ ID NO:91). 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:74) или GGGGSSA (SEQ ID NO:80). В некоторых примерах линкер представляет собой 2xGGGGS,

за которыми следуют три аланина (GGGGSGGGGSAAA; SEQ ID NO:133). В некоторых примерах линкер указан в SEQ ID NO:194 или 195.

В некоторых вариантах осуществления полипептид TACI, такой как вариантный полипептид TACI, непосредственно связан с последовательностью Fc. В некоторых вариантах осуществления полипептид TACI, такой как вариантный полипептид TACI, опосредованно связан с последовательностью Fc, например, через линкер. В некоторых вариантах осуществления один или несколько «пептидных линкеров» связывают полипептид TACI (например, вариантный полипептид TACI) 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 аминокислотного остатка по длине. Примерные линкеры включают любой линкер, описанный в настоящей заявке.

В некоторых вариантах осуществления гибридный белок TACI-Fc имеет структуру полипептид TACI (TACI)-Линкер-Fc-область. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок представляет собой гомодимер из двух идентичных копий гибридного белка TACI-Fc. Например, взаимодействия между Fc-областями двух идентичных полипептидных гибридов образуют ковалентные дисульфидные связи, в результате чего образуется димерная молекула, содержащая два полипептида TACI (например, два вариантных полипептида TACI).

В некоторых вариантах осуществления предусмотрен гибридный белок TACI-Fc, содержащий по порядку полипептид TACI, например, любой, как описано выше, линкер и Fc-область. В некоторых вариантах осуществления каждый полипептид TACI гибрида TACI-Fc представляет собой укороченный полипептид TACI дикого типа, такой как любой, как описано в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления полипептид TACI гибрида TACI-Fc указан в SEQ ID NO:13. Линкер может быть любым, как описано. В некоторых вариантах осуществления линкером является GSGGGGS (SEQ ID NO:74). В некоторых вариантах осуществления линкером является GS(G4S)₂ (SEQ ID NO:194). Fc-область может быть любой Fc-областью, как описано. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой Fc IgG1 дикого типа, указанную в SEQ ID NO:81. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой вариантную Fc, указанную в SEQ ID NO:73.

В некоторых вариантах осуществления гибридный белок TACI-Fc имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:171. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок TACI-Fc имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:197. В

некоторых вариантах осуществления гибридный TACI-Fc кодируется последовательностью, изложенной в SEQ ID NO:208.

SLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSGSGGGGSEPKSS
DKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(SEQ ID NO:171)

В некоторых вариантах осуществления гибридный белок TACI-Fc имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:172.

SLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSGSGGGGSEPKSS
DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID
NO:172)

В некоторых вариантах осуществления гибридный белок TACI-Fc имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:196, и кодирован последовательностью, указанной в SEQ ID NO:207.

В некоторых вариантах осуществления полипептид TACI представляет собой вариантный полипептид TACI. В некоторых вариантах осуществления предусмотрен вариантный гибридный белок TACI-Fc, содержащий по порядку вариантный полипептид TACI, например, любой, как описано выше, линкер и Fc-область. В некоторых вариантах осуществления полипептид TACI из гибрида TACI-Fc представляет собой вариантный полипептид TACI, такой как любой из описанных. В некоторых вариантах осуществления вариантный TACI из вариантного гибрида TACI-Fc указан в любой из SEQ ID NO:2-12, 21, 22 или 101-120. В некоторых вариантах осуществления вариантный TACI из вариантного гибрида TACI-Fc указан в любой из SEQ ID NO:14-20, 23-35, 92-100 или 177-192. В некоторых вариантах осуществления линкером является GSGGGGS (SEQ ID NO:74). В некоторых вариантах осуществления линкером является GS(G4S)2 (SEQ ID NO:194). В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой Fc IgG1 дикого типа, указанную в SEQ ID NO:81. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой вариантную Fc, указанную в SEQ ID NO:73.

В некоторых вариантах осуществления гибридный белок TACI-Fc имеет последовательность аминокислот, указанную в любой из SEQ ID NO:167-170, 200 или

222-237.

В некоторых вариантах осуществления гибридный белок TACI-Fc имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:167.

SLSCRKEQGEYYDHLLRDCISCASICGQHPKQCADFCENKLRSGSGGGGSEPKSS
DKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID
NO:167)

В некоторых вариантах осуществления гибрида TACI-Fc кодируется последовательностью, указанной в SEQ ID NO:211.

В некоторых вариантах осуществления гибридный белок TACI-Fc имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:168.

SLSCRKEQGEYYDHLLRDCISCASICGQHPKQCADFCENKLRSGSGGGGSEPKSS
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID
NO:168)

В некоторых вариантах осуществления гибридный белок TACI-Fc имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:169.

SLSCRKEEGKFYDHLLQDCISCASICGQHPKQCAFCENKLRSGSGGGGSEPKSS
DKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID
NO:169)

В некоторых вариантах осуществления гибридный белок TACI-Fc имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:170.

SLSCRKEEGKFYDHLLQDCISCASICGQHPKQCAFCENKLRSGSGGGGSEPKSS
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID
NO:170)

В некоторых вариантах осуществления гибридный белок TACI-Fc содержит множество копий полипептидной последовательности TACI (например, вариантной полипептидной последовательности TACI), такой как 2, 3 или 4 полипептидные последовательности TACI. В некоторых вариантах осуществления гибридные белки TACI-Fc содержат две полипептидные последовательности TACI (например, две вариантные полипептидные последовательности TACI). В некоторых случаях полипептидные последовательности TACI могут быть связаны непосредственно или могут быть связаны опосредованно через линкер, такой как пептидный линкер, включающий любую, как описано. В таком примере одна из полипептидных последовательностей TACI присоединена или сцеплена с Fc-областью, например, либо с N-, либо С-концом Fc-области. В других случаях полипептидные последовательности TACI могут быть отделены друг от друга Fc-областью и каждая присоединена индивидуально к N- или С-концу Fc-области. Связывание с Fc-областью может быть прямым или может быть опосредованным через линкер, такой как пептидный линкер, включающий любую, как описано.

В некоторых вариантах осуществления полипептидные последовательности TACI (например, вариантные полипептидные последовательности TACI) могут быть расположены по порядку в гибридном белке в тандеме (далее называемом «тандемной» конструкцией Fc-гибрида). В некоторых вариантах осуществления гибридный белок TACI-Fc имеет структуру: (TACI)-Линкер-(TACI)-Линкер-Fc-область. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок представляет собой четырехвалентную молекулу, которая является гомодимером двух идентичных копий гибридного белка TACI-Fc. Например, взаимодействия между Fc-областями двух идентичных полипептидных гибридов образуют ковалентные дисульфидные связи, в результате чего образуется димерная молекула, содержащая четыре полипептида TACI (например, четыре вариантных полипептида TACI).

В некоторых вариантах осуществления предусмотрен гибридный белок TACI-Fc, содержащий по порядку полипептид TACI, например, любой, как описано выше; линкер; другой полипептид TACI, например, любой, как описано; и Fc-область. В некоторых вариантах осуществления каждый полипептид TACI из гибрида TACI-Fc представляет собой укороченный полипептид TACI дикого типа, такой как любой, как описано. В некоторых вариантах осуществления каждый полипептид TACI из гибрида TACI-Fc указан в SEQ ID NO:13. В некоторых вариантах осуществления каждый полипептид TACI из гибрида TACI-Fc представляет собой вариантный полипептид TACI, такой как любой, как описано. В некоторых вариантах осуществления каждый полипептид TACI из гибрида

TACI-Fc представляет собой вариантный TACI, указанный в любой из SEQ ID NO:2-12, 21, 22 или 101-120. В некоторых вариантах осуществления каждый полипептид TACI из гибрида TACI-Fc представляет собой вариантный TACI, указанный в любой из SEQ ID NO:14-20, 23-35, 92-100 или 177-192. Линкеры могут быть любыми, как описано. В некоторых вариантах осуществления линкером является GSGGGGS (SEQ ID NO:74). Fc-область может быть любой Fc-областью, как описано. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой Fc IgG1 дикого типа, указанную в SEQ ID NO:81. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой вариантную Fc, указанную в SEQ ID NO:73. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок TACI-Fc имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:198, и кодируется последовательностью, указанной в SEQ ID NO:209.

В некоторых вариантах осуществления полипептидные последовательности TACI (например, вариантные полипептидные последовательности TACI) могут быть разделены в гибридном белке Fc-областью, где Fc-область расположена между двумя полипептидными последовательностями TACI (далее называемая конструкцией Fc-гибрида «гантель»). В некоторых вариантах осуществления гибридный белок TACI-Fc имеет структуру: (TACI)-Линкер-Fc-область-Линкер-(TACI). В некоторых вариантах осуществления линкеры могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок представляет собой четырехвалентную молекулу, которая является гомодимером двух идентичных копий гибридного белка TACI-Fc. Например, взаимодействия между Fc-областями двух идентичных полипептидных гибридов образуют ковалентные дисульфидные связи, в результате чего образуется димерная молекула, содержащая четыре полипептида TACI (например, четыре вариантных полипептида TACI).

В некоторых вариантах осуществления предусмотрен гибридный белок TACI-Fc, содержащий по порядку полипептид TACI, например, любой, как описано выше; линкер; Fc-область; линкер; и другой полипептид TACI, например, любой, как описано. В некоторых вариантах осуществления каждый полипептид TACI из гибрида TACI-Fc представляет собой укороченный полипептид TACI дикого типа, такой как любой, как описано. В некоторых вариантах осуществления каждый полипептид TACI из гибрида TACI-Fc указан в SEQ ID NO:13. В некоторых вариантах осуществления каждый полипептид TACI из гибрида TACI-Fc представляет собой вариантный полипептид TACI, такой как любой, как описано. В некоторых вариантах осуществления каждый полипептид TACI из гибрида TACI-Fc представляет собой вариантный TACI, указанный в любой из SEQ ID NO:2-12, 21, 22 или 101-120. В некоторых вариантах осуществления каждый

полипептид TACI из гибрида TACI-Fc представляет собой вариантный TACI, указанный в любой из SEQ ID NO:14-20, 23-35, 92-100 или 177-192. Линкеры могут быть любыми, как описано, и могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах осуществления первым линкером является GSGGGGS (SEQ ID NO:74), а вторым линкером является (GGGGGS)₄ (SEQ ID NO:84). Fc-область может быть любой Fc-областью, как описано. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой Fc IgG1 дикого типа, указанную в SEQ ID NO:81. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой вариантную Fc, указанную в SEQ ID NO:73. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок TACI-Fc имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:201, и кодируется последовательностью, указанной в SEQ ID NO:212. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок TACI-Fc имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:202, и кодируется последовательностью, указанной в SEQ ID NO:213.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрен гибридный белок TACI-Fc, который представляет собой димер, образованный двумя идентичными полипептидами TACI (например, вариантным полипептидом TACI), как описано, связанным с Fc-доменом. В некоторых вариантах осуществления идентичные виды (также называемые копиями) любого из представленных гибридных полипептидов TACI-Fc, например, гибридный вариантный TACI-Fc, будут димеризованы для создания гомодимера. В некоторых вариантах осуществления димер представляет собой гомодимер, в котором два полипептида TACI-Fc, например, варианты полипептиды TACI-Fc, являются одинаковыми. Для получения гомодимерной Fc молекулы Fc-область является такой, которая способна формировать гомодимер с соответствующей Fc-областью путем совместной экспрессии отдельных Fc-областей в клетке. В некоторых вариантах осуществления димеризация опосредуется ковалентной дисульфидной связью (связями), образующейся между Fc-областями полипептидных гибридов.

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.

Также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие гибридные белки TACI-Fc, например, вариантный гибридный белок TACI-Fc. В некоторых вариантах осуществления для получения гибридного белка Fc молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный белок TACI-Fc, например, вариантный гибридный белок TACI-Fc, вставляют в соответствующий вектор экспрессии. Полученный в результате гибридизации белок TACI-Fc, например, вариантный гибридный белок TACI-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 TACI-Fc. Полученные в результате гибридизации Fc белки могут быть легко очищены с помощью аффинной хроматографии на колонках с белком А 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 дисульфидной связью. 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 эквимольных количествах и окисляют с образованием смеси гомо- и гетеродимеров. Компоненты 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 один или несколько вариантов TACI, с использованием методов «выступ-во-впадину», как описано.

В вариантах осуществления, при продукции и экспрессии из клеток, предлагаемый иммуномодулирующий белок, такой как TACI-Fc (например, вариантный TACI-Fc), представляет собой гомодимер, содержащий две идентичные полипептидные цепи. На Фигурах 8А и 8В изображена структура примерных гибридных белков TACI-Fc, представленных в настоящей заявке.

Здесь представлен гомодимер TACI (26)-Fc₇₃ двух идентичных вариантных гибридных белков TACI-Fc, содержащий вариантный Домен 2, богатый цистеином (CRD2), из TACI, указанный в SEQ ID NO:26, предназначенный для нейтрализации В-клеточно-стимулирующей активности APRIL и BAFF. Гомодимер TACI (26)-Fc₇₃

представляет собой димер, состоящий из 2 идентичных рецепторных Fc- гибридных белковых цепей, каждая из которых имеет Fc-гибрид вариантного домена CRD2 TACI человека, указанный в SEQ ID NO:167, соединенных ковалентными дисульфидными связями.

Здесь представлен гомодимер TACI (26)-Fc₈₁ из двух идентичных вариантов гибридных белков TACI-Fc, содержащий вариантный Домен 2, богатый цистеином (CRD2), из TACI, указанный в SEQ ID NO:26, предназначенный для нейтрализации В-клеточно-стимулирующей активности APRIL и BAFF. Гомодимер TACI (26)-Fc₈₁ представляет собой димер, состоящий из 2 идентичных рецепторных Fc-гибридных белковых цепей, каждая из которых имеет Fc-гибрид вариантного домена CRD2 TACI человека, указанный в SEQ ID NO:168, соединенных ковалентными дисульфидными связями.

Здесь представлен гомодимер TACI (27)-Fc₇₃ из двух идентичных вариантных гибридных белков TACI-Fc, содержащих вариантный домен 2, богатый цистеином, из TACI (CRD2), указанный в SEQ ID NO:27, предназначенный для нейтрализации В-клеточно-стимулирующей активности APRIL и BAFF. Гомодимер TACI (27)-Fc₇₃ представляет собой димер, состоящий из 2 идентичных рецепторных Fc- гибридных белковых цепей, каждая из которых имеет вариантный Fc-гибрид CRD2-домена TACI человека, указанный в SEQ ID NO:169, соединенных ковалентными дисульфидными связями.

Здесь представлен гомодимер TACI (27)-Fc₈₁ двух идентичных вариантных гибридных белков TACI-Fc, содержащий вариантный Домен 2, богатый цистеином, из TACI (CRD2), указанный в SEQ ID NO:27, предназначенный для нейтрализации В-клеточно-стимулирующей активности APRIL и BAFF. Гомодимер TACI (27)-Fc₈₁ представляет собой димер, состоящий из 2 идентичных рецепторных Fc- гибридных белковых цепей, каждая из которых имеет вариантный Fc-гибрид CRD2-домена TACI человека, указанный в SEQ ID NO:170, соединенных ковалентными дисульфидными связями.

В некоторых вариантах осуществления представленные гибридные белки TACI-Fc (например, вариантный TACI-Fc), такие как их гомодимеры, демонстрируют IC₅₀ для нейтрализации BAFF менее 400 пМ. В некоторых вариантах осуществления IC₅₀ для нейтрализации BAFF составляет от 1 пМ до 400 пМ, например, от 10 пМ до 300 пМ, от 10 пМ до 200 пМ, от 10 пМ до 100 пМ, от 10 пМ до 50 пМ, от 10 пМ до 20 пМ, от 20 пМ до 400 пМ, от 20 пМ до 300 пМ, от 20 пМ до 200 пМ, от 20 пМ до 100 пМ, от 20 пМ до 50 пМ, от 50 пМ до 400 пМ, от 50 пМ до 300 пМ, от 50 пМ до 200 пМ, от 50 пМ до 100 пМ,

от 100 пМ до 400 пМ, от 100 пМ до 300 пМ, от 100 пМ до 200 пМ, от 200 пМ до 400 пМ, от 200 пМ до 300 пМ, или от 300 пМ до 400 пМ. В некоторых вариантах осуществления IC_{50} для нейтрализации ВАFF составляет точно или примерно 10 пМ, 15 пМ, 20 пМ, 25 пМ, 30 пМ, 35 пМ, 40 пМ, 45 пМ, 50 пМ, 55 пМ, 60 пМ, 65 пМ, 70 пМ, 75 пМ, 80 пМ, 85 пМ., 90 пМ, 95 пМ или 100 пМ, или любое значение между любым из вышеперечисленных.

В некоторых вариантах осуществления представленные гибридные белки TACI-Fc (например, вариантный TACI-Fc), такие как их гомодимеры, проявляют IC_{50} для нейтрализации APRIL менее 400 пМ. В некоторых вариантах осуществления IC_{50} для нейтрализации APRIL составляет от 0,5 пМ до 100 пМ, например, от 0,5 пМ до 50 пМ, от 0,5 пМ до 25 пМ, от 0,5 пМ до 10 пМ, от 0,5 пМ до 5 пМ, от 0,5 пМ до 1 пМ, от 1 пМ до 100 пМ, от 1 пМ до 50 пМ, от 1 пМ до 25 пМ, от 1 пМ до 10 пМ, от 1 пМ до 5 пМ, от 5 пМ до 100 пМ, от 5 пМ до 50 пМ, от 5 пМ до 25 пМ, от 5 пМ до 10 пМ, от 10 пМ до 100 пМ, от 10 пМ до 50 пМ, от 10 пМ до 25 пМ, или от 25 пМ до 100 пМ, от 25 пМ до 50 пМ, или от 50 пМ до 100 пМ. В некоторых вариантах осуществления IC_{50} для нейтрализации APRIL составляет точно или примерно 0,5 пМ, 0,75 пМ, 1 пМ, 2 пМ, 3 пМ, 4 пМ, 5 пМ, 6 пМ, 7 пМ, 8 пМ, 9 пМ, 10 пМ, 11 пМ, 12 пМ, 13 пМ, 14 пМ, 15 пМ, 20 пМ или 25 пМ или любое значение между любым из вышеперечисленных.

III. 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 гибридные белки TACI, 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 TACI, 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, ЧСА или альбумин), сигнальную последовательность препротейна 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 3.

Таблица 3. Примерные сигнальные пептиды		
SEQ ID NO	Сигнальный пептид	Пептидная последовательность
SEQ ID NO:149	HSA сигнальный пептид	MKWVTFISLLFLFSSAYS
SEQ ID NO:150	Ig каппа легкая цепь	MDMRAPAGIFGFLLVLPGYRS
SEQ ID NO:151	Сигнальная последовательность препротейна азуроцидина человека	MTRLTVLALLAGLLASSRA
SEQ ID NO:152	IgG тяжелой цепи сигнальный пептид	MELGLSWIFLLAILKGVQC
SEQ ID NO:153	IgG тяжелой цепи сигнальный пептид	MELGLRWVFLVAILEGVQC
SEQ ID NO:154	IgG тяжелой цепи сигнальный пептид	MKHLWFFLLLVAAPRWVLS
SEQ ID NO:155	IgG тяжелой цепи сигнальный пептид	MDWTWRILFLVAAATGAHS
SEQ ID NO:156	IgG тяжелой цепи сигнальный пептид	MDWTWRFLFVVAATGVQS
SEQ ID NO:157	IgG тяжелой цепи сигнальный пептид	MEFGLSWFLVAILKGVQC
SEQ ID NO:158	IgG тяжелой цепи сигнальный пептид	MEFGLSWVFLVALFRGVQC
SEQ ID NO:159	IgG тяжелой цепи сигнальный пептид	MDLLHKNMKHLWFFLLLVAAPRWVLS
SEQ ID NO:160	IgG каппа легкой цепи сигнальная последовательность	MDMRVPAQLLGLLLLWLSGARC
SEQ ID NO:161	IgG каппа легкой цепи сигнальная последовательность	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA
SEQ ID NO:162	Люцифераза Gaussia	MGVKVLFALICIAVAEA
SEQ ID NO:163	Альбумин человека	MKWVTFISLLFLFSSAYS
SEQ ID NO:164	Химотрипсиноген человека	MAFLWLLSCWALLGTTFG
SEQ ID NO:165	Интерлейкин-2 человека	MQLLSCIALILALV
SEQ ID NO:166	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 ТАСІ, 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 представляются 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 иммуномодулирующий белок.

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-НЕК; ATCC CRL 1573), клетки почек хомячка (ВНК-21, ВНК-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. Cell. Mol. 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 5,168,062).

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 металлотиионеина I мыши (Hamer et al., *J. Molec. Appl Genet.* 1:273 (1982)), промотор ТК вируса герпеса (McKnight, *Cell* 31:355 (1982)), ранний промотор SV40 (Benoist et al., *Nature* 290:304 (1981)), промотор вируса саркомы Рауса (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 селективируемого маркера описаны, например, в Ausubel (1995) и Murray (ред.), *Gene Transfer and Expression Protocols* (Humana Press 1991).

Например, одним подходящим селективируемым 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 селективируемым маркером является дигидрофолатредуктаза, которая придает устойчивость к метотрексату. Также могут быть использованы другие гены лекарственной устойчивости (например, устойчивости к гигромицину, множественной лекарственной устойчивости, пурамицин-ацетилтрансферазы). Альтернативно, маркеры, которые вводят измененный фенотип, такие как зеленый флуоресцентный белок, или белки клеточной поверхности, такие как CD4, CD8, МНС 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.

IV. 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, рН, 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; адьюванты (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 рН 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, смазочное вещество, 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 (НРМС), шеллак, зеин кукурузного белка или желатин. Примеры фармацевтически приемлемых дезинтегрантов включают поливинилпирролидон, карбоксиметилцеллюлозу или натрия крахмалгликолят. Примеры

фармацевтически приемлемых lubricantов 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, биodeградируемые 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.

Представленная 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).

V. СПОСОБЫ ОЦЕНКИ АКТИВНОСТИ И ИММУНОМОДУЛЯЦИИ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ БЕЛКОВ

В некоторых вариантах осуществления представленные иммуномодулирующие белки, такие как гибридные белки TACI, представленные в настоящей заявке, проявляют иммуномодулирующую активность. Представленные иммуномодулирующие белки, такие как гибридные белки TACI, могут модулировать активность В-клеток, такую как одна или несколько из пролиферации, дифференцировки или выживания В-клеток.

Функция иммуномодулирующих белков может быть исследована с использованием различных подходов для оценки способности белков связываться с когнатными партнерами по связыванию. Например, гибридные белки TACI могут быть оценены на связывание с 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 К_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.

Представленные иммуномодулирующие белки также могут быть оценены любым из множества способов для оценки модуляции активности 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 (МТТ) (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.

Представленные 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 ³H-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 представленных иммуномодулирующих белков на модуляцию этой передачи сигналов.

Имеются хорошо зарекомендовавшие себя модели на животных для тестирования *in vivo* эффективности представленных 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 мышинные 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 представленных иммуномодулирующих белков этим мышам для определения эффективности по улучшению симптомов и изменений в течении заболевания.

Другой мышиную моделью воспаления и волчаночноподобного заболевания является bm12 мышиную модель индуцируемой СКВ (Klarquist and Janssen, 2015. *J. Vis. Exp.* (105), e53319). Суспензии спленоцитов от самок мышей I-A^{bm12}B6(C)-H2-Ab1^{bm12}/KhEgJ («bm12») адоптивно переносят самкам мышей-реципиентов C57BL/6NJ. H2-Ab1^{bm12} отличается от H2-Ab1^b на 3 нуклеотида, что приводит к изменению 3 аминокислот в β-цепи молекулы I-A МНС 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 аутоантигенов, 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 мышинные 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-мышинного (m) антитела 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 представленными 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 мышинные 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; и Glabinski, Meth. Enzym. 288:182-90, 1997). Можно оценить введение представленных 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 представленных 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 представленных 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 мышьяная 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., *Methods 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 представленных 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*.

VI. 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 представленного 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.

Представленные иммуномодулирующие белки, включая гибридные белки TACI, могут быть использованы для лечения аутоиммунных заболеваний, В-клеточного гемобластоза, иммуномодуляции, EBD и любых патологий, опосредованных антителами (например, ИТСП, миастении гравис и т.п.), заболеваний почек, непрямого Т-клеточного иммунного ответа, отторжения трансплантата и болезни «трансплантат против хозяина». Введение иммуномодулирующих белков (например, TACI) позволяет специфически регулировать реакции В-клеток во время иммунного ответа. Кроме того, введение представленных иммуномодулирующих белков может быть использовано для модуляции развития В-клеток, развития других клеток, выработки антител и продукции цитокинов. Введение или использование представленных иммуномодулирующих белков позволяет также модулировать Т- и В-клеточную коммуникацию, например, путем нейтрализации пролиферативных эффектов только BAFF или APRIL.

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, 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 состояние, 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 гемобластозы, например, миелому; рассеянный склероз или неврит зрительного нерва.

В некоторых вариантах осуществления представленные иммуномодулирующие белки могут быть использованы для лечения пре-В- или В-клеточных лейкозов, таких как плазмноклеточный лейкоз, хронический или острый лимфоцитарный лейкоз, миелом, таких как множественная миелома, плазмноклеточная миелома, эндотелиальная миелома и гигантоклеточная миелома, и лимфом, таких как неходжкинская лимфома. В некоторых вариантах осуществления тип миеломы включает множественную миелому, плазмоцитому, множественную одиночную плазмоцитому и/или экстрамедуллярную миелому. В некоторых вариантах осуществления тип миеломы включает миелому легких цепей, несекреторную миелому и/или IgD или IgE миелому.

В некоторых вариантах осуществления представленные 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 артритагенных иммуноглобулинов при ревматоидном артрите. Способы и применение представленных 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 представленные 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, заболеваний, связанных с НТВ, амилоидоза или гемолитико-уремического синдрома. 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 представленных 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, невротии легкой цепи или амилоидоза.

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

В некоторых вариантах осуществления способы и применения представленных 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 представленных 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-ТВМ нефрит; антифосфолипидный синдром;

аутоиммунный аденоидит (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 холодных агглютининов; врожденную блокаду сердца; миокардит Коксаки; CREST синдром; болезнь Крона; герпетический дерматит; дерматомиозит; болезнь Девика (оптический нейромиеелит); дискоидную волчанку; синдром Дресслера; эндометриоз; эозинофильный эзофагит (ЕоЕ); 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 I типа); ювенильный миозит (JM); болезнь Кавасаки; синдром Ламберта-Итона; лейкоцитокластический васкулит; красный плоский лишай; склерозирующий лишай; лигрозный конъюнктивит; IgA-зависимый линейный дерматоз (LAD); волчанку; хроническую болезнь Лайма; болезнь Меньера; микроскопический полиангиит (MPA); смешанное заболевание соединительной ткани (MCTD); язву Мурена; болезнь Муха-Габермана; мультифокальную моторную невропатию (MMN) или MMNCB; рассеянный склероз; миастению гравис; миозит; нарколепсию; неонатальную волчанку; оптический нейромиеелит; 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 Персонеиджа-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; постперикардитомический 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 Голоса-Ханта (THS); поперечный миелит; диабет I типа; язвенный колит (UC); недифференцированное заболевание соединительной ткани (UCTD); увеит; васкулит; витилиго или болезнь Вогта-Коянаги-Гарада.

В некоторых вариантах осуществления представленные иммуномодулирующие белки (например, TACI-Fc) 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 представленные иммуномодулирующие белки (например, TACI-Fc) 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 представленные иммуномодулирующие белки (например, TACI-Fc) 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 представленные иммуномодулирующие белки (например, TACI-Fc) 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 гемобластоз 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 антимераболиты); 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 интегрин, или антагонист интегрин.

VII. 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 представляются наборы, содержащие фармацевтические композиции (или изделия), 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.

VIII. ПРИМЕРНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Среди представленных вариантов осуществления указаны:

1. Иммуномодулирующий белок, включающий по меньшей мере один полипептид TАСI, который представляет собой укороченный внеклеточный домен TАСI или его вариант, где укороченный внеклеточный домен TАСI дикого типа содержит богатый цистеином домен 2 (CRD2), но не содержит всего богатого цистеином домена 1 (CRD1), где вариантный полипептид TАСI содержит одну или несколько аминокислотных замен в укороченном внеклеточном домене TАСI дикого типа.

2. Иммуномодулирующий белок, включающий по меньшей мере один полипептид TАСI, который представляет собой укороченный внеклеточный домен TАСI дикого типа или является его вариантом, где укороченный внеклеточный домен TАСI дикого типа состоит из непрерывной последовательности, содержащейся в аминокислотных остатках 67-118, которая состоит из аминокислотных остатков 71-104, со ссылкой на положения, указанные в SEQ ID NO:122, где вариантный полипептид TАСI содержит одну или несколько аминокислотных замен в укороченном внеклеточном домене TАСI дикого типа.

3. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 1 или 2, в котором укороченный внеклеточный домен TАСI дикого типа составляет 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 59, 50 или 51 аминокислоту по длине.

4. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 1-3, в

котором укороченный внеклеточный домен TAC1 дикого типа состоит из аминокислотных остатков 68-110, указанных в SEQ ID NO:122.

5. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 1-4, в котором полипептид TAC1 состоит из последовательности аминокислот, указанной в SEQ ID NO:13, или является ее вариантом, содержащим одну или несколько аминокислотных замен в последовательности, указанной в SEQ ID NO:13.

6. Иммуномодулирующий белок, содержащий по меньшей мере один полипептид TAC1, который представляет собой укороченный полипептид TAC1, состоящий из последовательности аминокислот, указанной в SEQ ID NO:13, или его вариант, содержащий одну или несколько аминокислотных замен в последовательности, указанной в SEQ ID NO:13.

7. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 1-5, в котором укороченный полипептид TAC1 или его вариант связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером BAFF/APRIL.

8. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 1-7, в котором полипептид TAC1 представляет собой укороченный внеклеточный домен TAC1 дикого типа, который состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:1.

9. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 1-7, в котором полипептид TAC1 представляет собой укороченный внеклеточный домен TAC1 дикого типа, который состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:13.

10. Иммуномодулирующий белок, содержащий укороченный полипептид TAC1, состоящий из последовательности, указанной в SEQ ID NO:13.

11. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 1-7, в котором полипептид TAC1 представляет собой вариантный полипептид TAC1, который обладает повышенной аффинностью связывания с одним или обоими из APRIL и BAFF, по сравнению с укороченным полипептидом TAC1.

12. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 1-7 и 11, в котором вариантный полипептид TAC1 содержит одну или несколько аминокислотных замен в положениях, выбранных из числа 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:122.

13. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 12, 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.

14. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 12 или 13, в котором одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере одну из E74V, K77E, Y79F, L82H, L82P, R84G, R84L, R84Q, D85V или C86Y.

15. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 12-13, 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.

16. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 12-15, в котором одна или несколько аминокислотных замен представляют собой K77E/F78Y/Y102D.

17. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 12-15, в котором одна или несколько аминокислотных замен представляют собой Q75E/R84Q.

18. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 12-16, в котором вариантный полипептид TACI указан в SEQ ID NO:26.

19. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 12-15 и 17, в котором вариантный полипептид TACI указан в SEQ ID NO:27.

20. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 1, в котором полипептид TACI 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, соответствующих нумерации положений, указанной в SEQ ID NO:122.

21. Иммуномодулирующий белок, включающий по меньшей мере один 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:122.

22. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 20 или 21, 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.

23. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 20-22, в

котором эталонный полипептид TACI содержит (i) последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:122, (ii) последовательность аминокислот, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности SEQ ID NO:122; или (iii) часть (i) или (ii), включающую один или оба домена CRD1 и домен CRD2, который связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером BAFF/APRIL.

24. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 20-23, в котором в эталонном полипептиде TACI отсутствует N-концевой метионин.

25. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 20-24, в котором эталонный полипептид TACI содержит домен CRD1 и домен CRD2.

26. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 20-25, в котором эталонный полипептид TACI содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:1.

27. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 20-25, в котором эталонный полипептид TACI состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:1.

28. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 20-24, в котором эталонный полипептид TACI состоит по существу из домена CRD2.

29. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 20-24 и 28, в котором эталонный полипептид TACI содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:13.

30. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 20-24 и 28, в котором эталонный полипептид TACI состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:13.

31. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 20-30, 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.

32. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 20-31, в котором одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере одну из E74V, K77E, Y79F, L82H, L82P, R84G, R84L, R84Q, D85V или C86Y.

33. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 20-32, в котором одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере аминокислотную замену K77E.

34. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 20-32, в

котором одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере аминокислотную замену R84G.

35. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 20-32, в котором одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере аминокислотную замену R84Q.

36. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 20-35, 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.

37. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 20-32, 33 и 36, в котором одна или несколько аминокислотных замен представляют собой K77E/F78Y/Y102D.

38. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 20-32, 35 и 36, в котором одна или несколько аминокислотных замен представляют собой Q75E/R84Q.

39. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 20-38, в котором вариантный полипептид TACI обладает повышенной аффинностью связывания с одним или обоими из APRIL и BAFF по сравнению с эталонным полипептидом TACI.

40. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 11 или 39, в котором вариантный полипептид TACI обладает повышенной аффинностью связывания с APRIL.

41. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 11 или 39, в котором вариантный полипептид TACI обладает повышенной аффинностью связывания с BAFF.

42. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 11 или 39, в котором вариантный полипептид TACI обладает повышенной аффинностью связывания с APRIL и BAFF.

43. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 11 и 39-42, 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.

44. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 1-7 и 11-43, в котором:

- вариантный полипептид TACI содержит последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO:2-12, 21, 22, 101-120; или

- вариантный полипептид TAC1 содержит последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO:14-20, 23-35, 92-100.

45. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 1-7 и 11-43, в котором:

- вариантный полипептид TAC1 состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO:2-12, 21, 22, 101-120; или

- вариантный полипептид TAC1 состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO:14-20, 23-35, 92-100.

46. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 1-7, 11-43 и 45, в котором вариантный полипептид TAC1 состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:26

47. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 1-7, 11-43 и 45, в котором вариантный полипептид TAC1 состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:27.

48. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 1-7, 11-43 и 45, в котором вариантный полипептид TAC1 состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:107.

49. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 1-7, 11-43 и 45, в котором вариантный полипептид TAC1 состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:20.

50. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 1-7 и 11-49, содержащий гетерологичный фрагмент, который связан по меньшей мере с одним полипептидом TAC1.

51. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 50, в котором гетерологичный фрагмент представляет собой фрагмент, продлевающий период полужизни, домен мультимеризации, нацеливающий фрагмент, который связывается с молекулой на поверхности клетки, или обнаруживаемую метку.

52. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 51, в котором фрагмент, продлевающий период полужизни, включает домен мультимеризации, альбумин, альбумин-связывающий полипептид, Pro/Ala/Ser (PAS), С-концевой пептид (СТР) бета-субъединицы человеческого хорионического гонадотропина, полиэтиленгликоль (PEG), длинные неструктурированные гидрофильные последовательности аминокислот (XTEN), гидроксипропилкрахмал (HES), малую молекулу, связывающую альбумин, или их комбинацию.

53. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 1-7 и 11-52,

который представляет собой гибридный белок TACI-Fc, в котором по меньшей мере один полипептид TACI связан с Fc-областью иммуноглобулина.

54. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 3-5, 7-9, 11-20 и 22-53, который представляет собой димер.

55. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 53, в котором Fc-область иммуноглобулина является гомодимерной Fc-областью.

56. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 53, в котором Fc-область иммуноглобулина представляет собой гетеродимерную Fc-область.

57. Иммуномодулирующий белок по вариантам осуществления 3-5, 7-9, 11-20, 22-53 и 54-55, который является гомодимером, причем каждый полипептид димера является одним и тем же.

58. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 53, 54-55 и 57, 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.

59. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 53, 54-55 и 57-58, в котором Fc иммуноглобулина является Fc-доменом IgG1, а Fc содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:81.

60. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 53, 54-55 и 57-58, 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.

61. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 60, 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.

62. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 53, 54-55, 57-58 и 60-61, где Fc представляет собой вариантную Fc, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:73.

63. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 1-62, 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.

64. Иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 1-62, который уменьшает или ингибирует созревание, дифференцировку и/или пролиферацию В-клеток.

65. Молекула (молекулы) нуклеиновой кислоты, кодирующая иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 1-64.

66. Молекула нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 65, представляющая собой синтетическую нуклеиновую кислоту.

67. Молекула нуклеиновой кислоты из варианта осуществления 65 или 66, представляющая собой кДНК.

68. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты любого из вариантов осуществления 65-67.

69. Вектор из варианта осуществления 68, который является вектором экспрессии.

70. Вектор по варианту осуществления 68 или 69, который представляет собой вектор экспрессии млекопитающих или вирусный вектор.

71. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту любого из вариантов осуществления 65-67 или вектор любого из любого из вариантов осуществления 68-70.

72. Клетка из варианта осуществления 71, которая является клеткой млекопитающего.

73. Клетка из варианта осуществления 71 или 72, которая является клеткой человека.

74. Способ получения иммуномодулирующего белка, включающий введение молекулы нуклеиновой кислоты любого из вариантов осуществления 65-67 или вектора любого из вариантов осуществления 68-70 в клетку-хозяина в условиях для экспрессии белка в клетке.

75. Способ по варианту осуществления 74, дополнительно включающий выделение или очистку иммуномодулирующего белка из клетки.

76. Иммуномодулирующий белок, полученный способом по варианту осуществления 74 или 75.

77. Фармацевтическая композиция, содержащая иммуномодулирующий белок любого из вариантов осуществления 1-64 и 76.

78. Вариантный гибридный белок TACI-Fc, содержащий вариантный полипептид TACI, Fc-область и линкер между полипептидом TACI и Fc-областью, причем 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 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:122.

79. Вариантный гибридный белок TACI-Fc по варианту осуществления 78, 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.

80. Вариантный гибридный белок TACI-Fc по варианту осуществления 78 или 79, в котором эталонный полипептид TACI содержит (i) последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:122, (ii) последовательность аминокислот, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:122; или (iii) часть (i) или (ii), включающую один или оба домена CRD1 и CRD2, которые связываются с APRIL, BAFF или гетеротримером BAFF/APRIL.

81. Вариантный гибридный белок TACI-Fc любого из вариантов осуществления 78-80, в котором в эталонном полипептиде TACI отсутствует N-концевой метионин.

82. Вариантный гибридный белок TACI-Fc любого из вариантов осуществления 78-81, в котором эталонный полипептид TACI содержит домен CRD1 и домен CRD2.

83. Вариантный гибридный белок TACI-Fc любого из вариантов осуществления 78-82, в котором эталонный полипептид TACI содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:1.

84. Вариантный гибридный белок TACI-Fc любого из вариантов осуществления 78-82, в котором эталонный полипептид TACI состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:1.

85. Вариантный гибридный белок TACI-Fc любого из вариантов осуществления 78-81, в котором эталонный полипептид TACI состоит по существу из домена CRD2.

86. Вариантный гибридный белок TACI-Fc любого из вариантов осуществления 78-81 и 85, в котором эталонный полипептид TACI содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:13.

87. Вариантный гибридный белок TACI-Fc любого из вариантов осуществления 78-81 и 85, в котором эталонный полипептид TACI состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:13.

88. Вариантный гибридный белок TACI-Fc любого из вариантов осуществления 78-87, 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.

89. Вариантный гибридный белок TACI-Fc любого из вариантов осуществления 78-88, в котором одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере одну из E74V, K77E, Y79F, L82H, L82P, R84G, R84L, R84Q, D85V или C86Y.

90. Вариантный гибридный белок TACI-Fc любого из вариантов осуществления 78-89, в котором одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере аминокислотную замену K77E.

91. Вариантный гибридный белок TACI-Fc любого из вариантов осуществления 78-89, в котором одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере аминокислотную замену R84G.

92. Вариантный гибридный белок TACI-Fc любого из вариантов осуществления 78-92, в котором одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере аминокислотную замену R84Q.

93. Вариантный гибридный белок TACI-Fc любого из вариантов осуществления 78-92, 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.

94. Вариантный гибридный белок TACI-Fc любого из вариантов осуществления 78-90 и 93, в котором одна или несколько аминокислотных замен представляют собой K77E/F78Y/Y102D.

95. Вариантный гибридный белок TACI-Fc любого из вариантов осуществления 78-90, 92 и 93, в котором одна или несколько аминокислотных замен представляют собой Q75E/R84Q.

96. Вариантный гибридный белок TACI-Fc любого из вариантов осуществления 78-95, в котором вариантный полипептид TACI обладает повышенной аффинностью связывания с одним или обоими из APRIL и BAFF по сравнению с эталонным полипептидом TACI.

97. Вариантный гибридный белок TACI-Fc любого из вариантов осуществления 78-96, в котором вариантный полипептид TACI обладает повышенной аффинностью связывания с APRIL.

98. Вариантный гибридный белок TACI-Fc любого из вариантов осуществления 78-96, в котором вариантный полипептид TACI обладает повышенной аффинностью связывания с BAFF.

99. Вариантный гибридный белок TACI-Fc любого из вариантов осуществления 78-96, в котором вариантный полипептид TACI обладает повышенной аффинностью связывания с APRIL и BAFF.

100. Вариантный гибридный белок TACI-Fc любого из вариантов осуществления 96-99, 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.

101. Вариантный гибридный белок TACI-Fc любого из вариантов осуществления 96-100, в котором:

- вариантный полипептид TACI содержит последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO:2-12, 21, 22, 101-120; или

- вариантный полипептид TACI содержит последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO:14-20, 23-35, 92-100.

102. Вариантный гибридный белок TACI-Fc любого из вариантов осуществления 96-100, в котором:

- вариантный полипептид TACI состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO:2-12, 21, 22, 101-120; или

- вариантный полипептид TACI состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO:14-20, 23-35, 92-100.

103. Вариантный гибридный белок TACI-Fc любого из вариантов осуществления 96-100, в котором вариантный полипептид TACI состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:26

104. Вариантный гибридный белок TACI-Fc любого из вариантов осуществления 96-100, в котором вариантный полипептид TACI состоит по существу или состоит из последовательности, изложенной в SEQ ID NO:27.

105. Вариантный гибридный белок TACI-Fc любого из вариантов осуществления 96-100, в котором вариантный полипептид TACI состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:107.

106. Вариантный гибридный белок TACI-Fc любого из вариантов осуществления 96-100, в котором вариантный полипептид TACI состоит по существу или состоит из последовательности, изложенной в SEQ ID NO:20.

107. Fc-гибридный белок любого из вариантов осуществления 78-106, где линкер включает пептидный линкер, а пептидный линкер выбран из GSGGS (SEQ ID NO:76), GGGGS (G4S; SEQ ID NO:77), GSGGGGS (SEQ ID NO:74), GGGGSGGGGS (2xGGGGS; SEQ ID NO:78), GGGGSGGGGSGGGGS (3xGGGGS; SEQ ID NO:79),

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (4xGGGGGS, SEQ ID NO:84), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (5XGGGGGS, SEQ ID NO:91), GGGGSSA (SEQ ID NO:80) или их комбинаций.

108. Fc-гибридный белок любого из вариантов осуществления 78-107, который является димером.

109. Fc-гибридный белок любого из вариантов осуществления 78-108, в котором Fc-область иммуноглобулина является гомодимерной Fc-областью.

110. Fc-гибридный белок любого из вариантов осуществления 78-109, 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.

111. Fc-гибридный белок любого из вариантов осуществления 78-110, в котором Fc иммуноглобулина является Fc-доменом IgG1, а Fc содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:81.

112. Fc-гибридный белок любого из вариантов осуществления 78-106 и 107-111, где гибридный белок TACI-Fc указан в SEQ ID NO:168.

113. Fc-гибридный белок любого из вариантов осуществления 78-106 и 107-111, в котором гибридный белок TACI-Fc указан в SEQ ID NO:170.

114. Fc-гибридный белок любого из вариантов осуществления 78-110, 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.

115. Fc-гибридный белок по варианту осуществления 114, 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.

116. Fc-гибридный белок любого из вариантов осуществления 78-115, в котором Fc иммуноглобулина указана в SEQ ID NO:71.

117. Fc-гибридный белок любого из вариантов осуществления 78-113 и 114-116, где Fc представляет собой вариантную Fc, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:73.

118. Fc-гибридный белок любого из вариантов осуществления 78-106, 107-110, 114, 115 и 117, где гибридный белок TACI-Fc указан в SEQ ID NO:167.

119. Fc-гибридный белок любого из вариантов осуществления 78-106, 107-110, 114, 115 и 117, где гибридный белок TACI-Fc указан в SEQ ID NO:169.

120. Fc-гибридный белок любого из вариантов осуществления 78-119, который является димером.

121. Fc-гибридный белок любого из вариантов осуществления 78-120, который является гомодимером.

122. Fc-гибридный белок любого из вариантов осуществления 78-121, который нейтрализует APRIL и BAFF.

123. Fc-гибридный белок по варианту осуществления 122, 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 представляет собой 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 является любым значением между любым из вышеперечисленных.

124. Fc-гибридный белок любого из вариантов осуществления 78-122, 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.

125. Fc-гибридный белок любого из вариантов осуществления 78-124, в котором иммуномодулирующий белок уменьшает или ингибирует созревание, дифференцировку и/или пролиферацию В-клеток.

126. Молекула (молекулы) нуклеиновой кислоты, кодирующая Fc-гибридный белок любого из вариантов осуществления 78-125.

127. Молекула нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 126, представляющая собой синтетическую нуклеиновую кислоту.

128. Молекула нуклеиновой кислоты из варианта осуществления 126 или 127, представляющая собой кДНК.

129. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты любого из вариантов осуществления 126-128.

130. Вектор из варианта осуществления 129, который является вектором экспрессии.

131. Вектор по варианту осуществления 129 или 130, который представляет собой вектор экспрессии млекопитающих или вирусный вектор.

132. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по любому из вариантов осуществления 126-128 или вектор по любому из вариантов осуществления 129-131.

133. Клетка из варианта осуществления 132, которая является клеткой млекопитающего.

134. Клетка из варианта осуществления 132 или 133, которая является клеткой человека.

135. Способ получения Fc-гибридного белка, включающий введение молекулы нуклеиновой кислоты любого из вариантов осуществления 126-128 или вектора любого из вариантов осуществления 129-131 в клетку-хозяина в условиях для экспрессии белка в клетке.

136. Способ по варианту осуществления 135, дополнительно включающий выделение или очистку Fc-гибридного белка из клетки.

137. Fc-гибридный белок, полученный способом по варианту осуществления 135 или 136.

138. Фармацевтическая композиция, содержащая Fc-гибридный белок любого из вариантов осуществления 78-125 и 137.

139. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 77 или 138, содержащая фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

140. Фармацевтическая композиция любого из вариантов осуществления 77, 138 и 139, которая является стерильной.

141. Изделие, содержащий фармацевтическую композицию любого из вариантов осуществления 77 и 138-140 во флаконе или контейнере.

142. Изделие по варианту осуществления 141, в котором флакон или контейнер является герметичным.

143. Набор, включающий фармацевтическую композицию любого из вариантов осуществления 77 и 138-140, и инструкции по применению.

144. Комплект, включающий изделие по варианту осуществления 141 или 142, и инструкции по использованию.

145. Способ снижения иммунного ответа у субъекта, включающий введение иммуномодулирующего белка по любому из вариантов осуществления 1-64 или 76 субъекту, нуждающемуся в этом.

146. Способ снижения иммунного ответа у субъекта, включающий введение Fc-гибридного белка по любому из вариантов осуществления 78-126 и 137 субъекту, нуждающемуся в этом.

147. Способ снижения иммунного ответа у субъекта, включающий введение фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 77 и 137-140 субъекту, нуждающемуся в этом.

148. Способ по любому из вариантов осуществления 145-147, в котором у субъекта снижается иммунный ответ В-клеток, посредством чего созревание, дифференцировка и/или пролиферация В-клеток снижается или ингибируется.

149. Способ по любому из вариантов осуществления 145-148, в котором у субъекта снижают уровни APRIL, BAFF или гетеротримера APRIL/BAFF в циркуляции.

150. Способ снижения уровней APRIL, BAFF или гетеротримера APRIL/BAFF в циркуляции у субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 77 и 137-140.

151. Способ по варианту осуществления 57 или 147, в котором у субъекта снижается Т-клеточный иммунный ответ, посредством чего снижается или ингибируется костимуляция Т-клеток.

152. Способ по любому из вариантов осуществления 145-151, в котором снижение иммунного ответа лечит заболевание или состояние у субъекта.

153. Способ лечения заболевания или состояния у субъекта, включающий введение иммуномодулирующего белка по любому из вариантов осуществления 1-64 или 76 субъекту, нуждающемуся в этом.

154. Способ лечения заболевания или состояния у субъекта, включающий введение Fc-гибридного белка по любому из вариантов осуществления 78-115 и 121 субъекту, нуждающемуся в этом.

155. Способ лечения заболевания или состояния у субъекта, включающий введение фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 77 и 137-140 субъекту, нуждающемуся в этом.

156. Способ по любому из вариантов осуществления 150-153, в котором заболевание или состояние представляет собой аутоиммунное заболевание, В-клеточный гемобластоз, патологию, опосредованную антителами, заболевание почек, отторжение трансплантата, болезнь «трансплантат против хозяина» или вирусную инфекцию.

157. Способ по варианту осуществления 156, 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.

158. Способ по варианту осуществления 156, в котором заболевание или

состояние представляет собой В-клеточный гемобластоз, а гемобластоз представляет собой миелому.

IX. ПРИМЕРЫ

Следующие примеры включены только в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения объема изобретения.

Пример 1. Идентификация модифицированного по аффинности TAC1.

Этот пример описывает генерацию мутантных ДНК конструкций доменов TNFR TAC1 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) TAC1, содержащие по меньшей мере один TD (vTD TAC1).

A. Генерация мутантных ДНК конструкций доменов TNFR TAC1.

Библиотеки, содержащие случайные замены аминокислот, были сконструированы для идентификации вариантов внеклеточного домена (ECD) TAC1. Конструкции были созданы на основе последовательности TAC1 человека дикого типа, содержащей ECD-часть TAC1, которая включала либо (1) оба богатых цистеином белковых домена (CRD, CRD1/CRD2), как указано в SEQ ID NO:1 (соответствующие остаткам 29-110, как указано в UniProt, номер доступа O14836), либо (2) только один CRD (CRD2), как указано в SEQ ID NO:13 (соответствует остаткам 68-110, как указано в UniProt, номер доступа O14836).

ECD TAC1 (29-110) (SEQ ID NO:1):

VAMRSCPEEQYWDPLLGTCSCKTICNHQSQRTCAAFCSLSRKEQGKIFYDHL
LRDCISCASICGQHPKQCAAYFCENKLRS

ECD TAC1 (68-110) (SEQ ID NO:13):

SLSRKEQGKIFYDHLRDCISCASICGQHPKQCAAYFCENKLRS

ДНК, кодирующую домен ECD TAC1 дикого типа, клонировали между сайтами BamHI и KpnI модифицированного вектора экспрессии дрожжей PBYDS03 (Life Technologies, США), который поместил N-конец ECD TAC1 на поверхность дрожжей, закрепляя домен Sag1 (С-концевой домен α -агглютинина дрожжей) с N-концом метки гибридизации HA в рамке к последовательности ECD TAC1, и С-конец метки гибридизации с-Мус к последовательности ECD TAC1. Экспрессия в этом векторе контролируется с помощью индуцируемого промотора GAL1. После проверки правильной последовательности ДНК конструкцию ДНК ECD TAC1 дикого типа использовали в качестве матрицы подверженной ошибкам ПЦР для введения случайных мутаций в последовательности ECD TAC1 с частотой 2-5 мутаций на копию гена. Набор Genemorph II (Agilent, США) использовали в сочетании с титрованием количествами MnCl₂ 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 линейаризованного 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 Venatuil, L. et al., *Protein Eng Des Sel.* 2010 Apr; 23(4): 155-159. Вкратце, культуру BJ5464 в стационарной фазе в течение ночи пассировали до ОП₆₀₀ 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 ОП₆₀₀ 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 М сорбита, 1 мм CaCl₂). Собранные клетки кондиционировали путем повторного суспендирования в 20 мл 0,1 М 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 линейаризованного 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 ВТХ ЕСМ399 при 2500V. Сразу после электропорации клетки добавляли к 8 мл смеси 1:1 1 М 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 $0,5 \times 10^7$ 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 $0,5 \times 10^7$ 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 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 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 TAC1 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 TAC1 со 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 TAC1 от дрожжевого дисплея (при условии 100 000 копий белка на клетку), чтобы избежать артефактов истощения лигандов, которые могут уменьшить дискриминацию библиотеки. Связывание BAFF-9xHis и APRIL-FLAG с вариантами ECD TAC1 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.

В. Переформатирование результатов селекции в виде Fc-гибридов

Вставки варианта ECD TAC1 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. Для получения рекомбинантных иммуномодулирующих белков в виде Fc-гибридных белков, содержащих ECD TAC1 по меньшей мере с одним доменом с модифицированной аффинностью (например, вариантного TAC1 ECD-Fc), кодирующая ДНК была создана для кодирования белка следующим образом: вариантный домен TAC1, за которым следует линкер из 7 аминокислот (GSGGGGS; SEQ ID NO:74), 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 каких-либо легких цепей 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 EU для иммуноглобулиновых белков (соответствует положению 5 (C5S) со ссылкой на Fc дикого типа или немодифицированную Fc, указанную в SEQ ID NO:71). 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 в Fc дикого типа или немодифицированной Fc, указанной в SEQ ID NO:71). Безэффорная (инертная) Fc IgG1 в гибридных конструкциях указана в SEQ ID NO:73.

Выходные пулы клеток из выбранных FACS сортов ECD TAC1 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 TAC1 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).

Рекомбинантные варианты 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 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 1. Выбранные vTD были протестированы на связывание и функциональную активность, как описано в Примере 2.

Пример 2. Оценка активности Fc-гибридных белков.

Этот пример описывает характеристику активности молекул, содержащих домен TACI, таких как растворимые молекулы дикого типа (WT) или варианты vTD TACI, отформатированные как Fc-гибриды, с использованием биоанализа *in vitro* на основе клеточной линии.

Были приобретены клетки Jurkat с репортером ядерного фактора каппа-би активированных В-клеток (NF-κB) на основе люциферазы (BPS Bioscience). Клетки Jurkat/NK-κB трансдуцировали лентивирусом для получения стабильной экспрессии мышинового 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 мышинового 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-κB/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 TACI, 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 TACI, 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 $1,5 \times 10^5$ клеток Jurkat/NF- κ B/TACI/лунку в среде объемом 50 мкл (RPMI1640 + 5% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС)). Содержимое лунок перемешивали, и планшеты инкубировали в течение 5 часов при 37°C в увлажненной 5% CO₂ инкубационной камере. Планшеты извлекали из инкубатора, и в каждую лунку добавляли по 100 мкл клеточного лизата и раствора субстрата 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 TACI по сравнению с контрольными белками представляет собой блокаду и ингибирование лигандной сигнализации через трансдуцированный рецептор TACI в клетках Jurkat/NF- κ B/TACI.

Как показано на Фиг.2, примерные vTD TACI-Fc ингибируют передачу сигналов лигандами на уровнях, равных или превышающих уровни для Fc-гибридных белков, содержащих домены WT TACI.

Пример 3. Оценка биологической активности TACI блокады TACI-опосредованной стимуляции TACI-содержащими молекулами.

Биоанализ на основе клеточной линии, описанный в Примере 2, использовали для оценки функциональной характеристики TACI-содержащих WT или vTD белков для блокады APRIL- или BAFF-опосредованной лигандной сигнализации через рецептор TACI в клетках Jurkat/NF- κ B/TACI. APRIL- или BAFF-опосредованную лигандную передачу сигналов количественно оценивали путем мониторинга продукции люциферазы в клетках. Оценивали связывание гибрида TACI-Fc, содержащего vTD, указанный в SEQ ID NO:26 (26 TACI CRD2-Fc). Для сравнения также оценивали TACI-Fc дикого типа, содержащий только домен CRD2 TACI (13 TACI CRD2-Fc).

Как показано на Фиг.3, примерный vTD TACI демонстрирует повышенное ингибирование как APRIL, так и BAFF человека. Как показано на Фиг.4, примерные молекулы TACI vTD-Fc ингибируют передачу сигналов мышинных лигандов APRIL и BAFF. В совокупности результаты показывают способность молекул vTD TACI блокировать APRIL и BAFF TACI-опосредованную лигандную передачу сигналов.

В другом подобном исследовании примерные созданные молекулы, как описано в Примере 1, оценивали на предмет их способности блокировать APRIL- или BAFF-опосредованную лигандную передачу сигналов в клетках Jurkat/NF- κ B/TACI. Для

сравнения были получены контрольные молекулы, содержащие ECD TAC1 дикого типа, гибридные с последовательностью Fc, указанной в SEQ ID NO:73. В одном контроле гибридный белок содержал TAC1 дикого типа (TAC1 30-110, SEQ ID NO:130; соответствующий части ECD TAC1 в атацепте, SEQ ID NO:132). В другом контроле гибридный белок содержал TAC1 дикого типа (TAC1 13-118, SEQ ID NO:131), соответствующий части ECD TAC1 в телитацепте. Активность сравнивали с контрольными молекулами. Активность также сравнивали с анти-BAFF моноклональным антителом белимуабом.

Примерные молекулы TAC1, либо дикого типа, либо варианты vTD TAC1, титровали (от 100 000 пМ до 32 пМ), добавляли к 2 нМ рекомбинантного человеческого APRIL или BAFF, и исследовали, как описано выше, в анализе Jurkat/NF-кВ. Как показано на Фиг.5, примерные молекулы, содержащие vTD TAC1, демонстрировали усиленную блокаду APRIL и BAFF, большую, чем у TAC1 30-100-Fc, TAC1 13-118-Fc и белимуаба. WT TAC1-Fc, содержащий только домен CRD2 TAC1 (13 TAC1 CRD2-Fc), также демонстрировал усиленную блокаду APRIL, большую, чем TAC1 30-100-Fc и TAC1 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 TAC1, также содержащими части домена CRD1, присутствующие в атацепте и телитацепте. В Таблице E1 приведены значения полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC50) для ингибирования APRIL- и BAFF-опосредованной передачи сигналов TAC1 для примерных молекул, описанных на Фиг.5. Также в скобках показано относительное блокирование по сравнению с атацептом (Δ атацепт) для каждой тестируемой молекулы.

Таблица E1. Биоактивность vTD TAC1 по сравнению с атацептом				
Описание	SEQ ID NO	IC50 (нМ) APRIL	IC50 (нМ) APRIL (Δ TAC1 30-110-Fc)	IC50 (нМ) BAFF (Δ TAC1 30-110-Fc)
26 TAC1 CRD2-Fc	26	179	179 (0,05)	1216 (0,21)
27 TAC1 CRD2-Fc	27	262	262 (0,07)	1387 (0,24)
29 TAC1 CRD2-Fc	29	339	339 (0,09)	1336 (0,23)
13 TAC1 CRD2-Fc	13	369	369 (0,10)	1328 (0,23)
TAC1 13-118-Fc		9103	9103 (2,37)	7699 (1,33)
Белимуаб		214911	214911 (55,84)	2496 (0,43)
TAC1 30-110-Fc		3849	3849 (1,00)	5771 (1,00)

Пример 4. Оценка активности TAC1 vTD-Fc на мышинной модели волчанки in vivo

В этом примере описывается оценка воздействия образцовых молекул TAC1 vTD-

Fc на иммунные ответы на модели спонтанной волчанки *in vivo* у мышей (NZB/NZW)F1. У мышей (NZBxNZW)F1 спонтанно развивается аутоиммунное заболевание, очень похожее на СКВ человека, и они считаются одной из лучших мышинных моделей этого заболевания. У мышей (NZB/NZW)F1 отмечены высокие концентрации антител к дцДНК в циркуляции, 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 TAC1 vTD-Fc (26 TAC1 CRD2-Fc) (17 мг/кг). Лечение начинали с распределения 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 экспериментальной группе представлены на Фиг.6А, а среднее процентное изменение массы тела (потеря массы тела, связанная с прогрессированием заболевания) в каждой группе представлено на Фиг.6В. Процент выживаемости мышей в каждой опытной группе показан на Фиг.6С. Титры IgG антител к двухцепочечной (дц) ДНК в сыворотке крови были измерены компанией Hooke Laboratories, Inc. (Лоуренс, Массачусетс) с использованием собственного набора, и результаты представлены на Фиг.6D. 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.6Е. Статистический анализ проводили с использованием t-критерия Стьюдента; **** обозначает $p < 0,0001$, а *** обозначает $p = 0,0008$.

Почки отбирали у каждой мыши после эвтаназии и проводили гистологический анализ в повторяющихся срезах с окрашиванием 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. Гломерулярные поражения (мезангиальное расширение,

эндокапиллярная пролиферация, гломерулярные 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 общих гломерулярных поражений, общих тубулярных и интерстициальных поражений, и общего поражения почек показаны на Фиг.6F; по сравнению с мышами, получавшими Fc-контроль, существенное улучшение гистопатологии почек наблюдалось у животных, получавших TAC1 vTD-Fc ($p < 0,0001$ по сравнению с Fc группой).

Для Фиг.6G-6H 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 (ОСТ) перед разделением и иммуногистохимическим (ИНС) окрашиванием мышинового IgG и мышинового компонента C3 для оценки гломерулярных отложений IgG и C3, соответственно. Срезы почек пропитывали ацетоном и окрашивали FITC-конъюгированным крысиным моноклональным антителом к мышинному C3 компоненту комплемента (Cedarlane), разведенным 1:25 в разбавителе первичных антител (Leica Biosystems), или AF594-конъюгированным козым антителом к мышинному IgG (Thermo Fisher Scientific), разведенным 1:200 в разбавителе первичных антител. Гломерулярные отложения IgG и C3 были проанализированы патологоанатомом 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 мышами, получавшими Fc-контроль, у животных, получавших 26 TAC1 CRD2-Fc, наблюдалось значительное снижение гломерулярных отложений IgG и C3 ($p < 0,0001$ по сравнению с группой Fc-контроля для IgG, и $p = 0,0005$ для C3); данные были проанализированы на предмет статистически значимых различий с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты демонстрируют, что TAC1 vTD-Fc были способны значительно подавлять протеинурию, сохранять массу тела, повышать общую выживаемость, уменьшать уровень аутоантител к дцДНК и BUN, уменьшать отложения IgG и C3 в почках, и предотвращать или облегчать заболевание почек на модели СКВ у мышей

(NZB/NZW)F1. Примерные молекулы также были способны эффективно восстанавливать субпопуляции В- и Т-клеток, включая плазматические клетки, фолликулярные Т-хелперные клетки, клетки зародышевого центра и Т-клетки памяти в селезенке и лимфатических узлах этих мышей (данные не показаны).

Пример 5: Оценка активности TAC1 13-118-Fc с добавлением идентифицированных мутаций

Влияние мутаций TAC1, идентифицированных в Примере 1 (см. Таблицу 1), оценивали для определения их способности модулировать активность Fc-гибридных белков, содержащих более длинную последовательность ECD TAC1 (включающую как домен CRD1, так и домен CRD2). В этом примере примерные мутации K77E, F78Y и Y102D были введены в эталонный ECD TAC1 13-118, который был гибридизован с примерной последовательностью Fc, указанной в SEQ ID NO:73. Активность сравнивали с гибридным белком TAC1 vTD-Fc, содержащим только домен CRD2 с теми же мутациями (указанный в SEQ ID NO:26), или с WT TAC1 (30-110, SEQ ID NO:130; соответствующим части ECD TAC1 в атацепте, SEQ ID NO:132), каждый также был гибридизован с последовательностью Fc, указанной в SEQ ID NO:73. Биоанализ на основе клеточной линии, описанный в Примере 2, использовали для оценки блокады APRIL- или BAFF-опосредованной лигандной передачи сигналов через рецептор TAC1 в клетках Jurkat/NF-κB/TAC1. APRIL- или BAFF-опосредованную лигандную передачу сигналов через рецептор TAC1 количественно оценивали путем мониторинга продукции люциферазы в клетках.

Как показано на Фиг.7, введение мутаций K77E, F78Y и Y102D в TAC1 13-118 ECD для генерации варианта (K77E/F78Y/T102D) TAC1 13-118 улучшило блокаду APRIL и BAFF (соответственно) относительно соответствующего WT TAC1 13-118ECD (ромбы) или альтернативного контроля ECD WT TAC1 30-110 (треугольники острием вверх). Однако, даже с включением мутаций в TAC1 13-118 ECD, более короткий вариантный TAC1 с теми же мутациями, но содержащий только домен CRD2 TAC1 (vTD, указанный в SEQ ID NO:26), продемонстрировал наибольшую блокаду APRIL и BAFF в этом анализе (треугольники острием вниз). Эти результаты подтверждают, что минимальный CRD2-содержащий домен обеспечивает улучшенную активность для блокирования APRIL- и BAFF-опосредованной передачи сигналов TAC1, однако мутации K77E/F78Y/Y102D также дополнительно усиливают блокаду APRIL и BAFF вариантными ECD TAC1, включающими мутации.

В Таблице E2 приведены значения полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC50) для ингибирования APRIL- и BAFF-опосредованной передачи

сигналов TACI для примерных молекул, описанных на Фиг.7. Также показано сравнение с контролями дикого типа TACI-Fc (Δ атаццепт) для каждой молекулы.

Описание	SEQ ID NO	IC50 (нМ) APRIL	IC50 (нМ) APRIL (Δ TACI 30-110)	IC50 (нМ) BAFF	IC50 (нМ) BAFF (Δ TACI 30-110)
26 TACI-Fc	26	214	214 (0,05)	1268	1268 (0,28)
TACI 13-118	131	7811	7811 (1,81)	8452	8452 (1,88)
TACI 13-118, с K77E/F78Y/Y102D		848	848 (0,20)	2048	2048 (0,46)
TACI 30-110		4317	4317 (1,00)	4490	4490 (1,00)

Пример 6. Сравнительная оценка TACI vTD-Fc на модели иммунизации KLH in vivo

В этом примере описывается оценка воздействия примерных протестированных однодоменных Fc-гибридных белков (описанных в Примере 1) 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 T-клеточно-зависимый антиген KLH после одной или двух инъекций KLH. Две инъекции KLH, разделенные интервалом по меньшей мере 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 TACI, таких как растворимые молекулы дикого типа (WT) или варианты vTD TACI, форматированные как Fc-гибриды, в ответ на две инъекции KLH без адьюванта (на 0-й и 12-й день исследования). Эти испытуемые препараты сравнивали с введением молярно подобранных уровней белка Fc-контроля изотипа. Активность тестируемых препаратов, наблюдаемая на мышинной модели KLH, часто позволяет предсказать их иммуномодулирующие эффекты у людей.

Чтобы начать исследование KLH, 10-недельных самок мышей C57/BL6J (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) в 0 и 12 дни; исходный коммерческий раствор KLH разбавляли до соответствующей концентрации физиологическим раствором с фосфатным буфером Дульбекко (DPBS) перед инъекцией. Мышам вводили тестируемые препараты, как описано в Таблице E3, путем инъекции IP (вводили в 4 и 11 дни). Шесть мышей

оставляли без лечения/без 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 вторичной 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.

Номер группы	Номер мыши	Испытуемый препарат (препараты)	Уровень дозы (мг/дозу)	(мг/кг)	Календарь применения (D = День испытания)	Способ введения
1	5	Fc контроль	0,225	11,3	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
7	5	26 TACI CRD2-Fc	0,271	13,6	D4 и D11	IP
8	5	27 TACI CRD2-Fc	0,271	13,6	D4 и D11	IP
9	5	29 TACI CRD2-Fc	0,272	13,6	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, извлекали их селезенку, взвешивали и помещали в DPBS на льду. Цельную кровь центрифугировали, а сыворотку отделяли и хранили при -80°C до анализа на уровни анти-KLH антител методом иммуноферментного анализа (ELISA). Селезенку измельчали 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 оценкой жизнеспособности с использованием двойной флуоресценции, с помощью окрашивания 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 планшетов (Corning, кат.№ 3797; один планшет для панели, специфичной для В-клеток, и один планшет для панели, специфичной для Т-клеток), центрифугировали при $1500 \times g$ 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 минут в темноте при комнатной температуре. После двух промываний буфером для проточной цитометрии (175 мкл каждое) осадок клеток 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 В- или Т-клеточных панелей добавляли 50 мкл коктейля из следующих антител для проточной цитометрии (разведенных в буфере для проточной цитометрии). Для панели В-клеток для коктейля были объединены следующие антитела: антитело против мышинового CD19 BV395 (клон 1D3, Becton-Dickinson; 1:100 конечная концентрация), антитело против мышинового CD138 BV421 (клон 281-2, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело против мышинового CD3ε BV510 (клон 17A2, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело против мышинового IgD BV605 (клон 11-26с.2а, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело против мышинового B220 BV785 (клон RA3-6B2, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело против мышинового CD95 FITC (клон SA367H8, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело против мышинового CD23 PerCP Cy5.5 (клон B3B4, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело против мышинового GL7 PE (клон GL7, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело против мышинового Gr1 PE Cy7 (клон RB6-8C5, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело против мышинового CD21 APC (клон 7E9, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), и антитело против мышинового IgM APC Cy7 (клон RMM-1, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация). Для панели Т-клеток для коктейля были объединены следующие антитела: антитело против мышинового PD-1 BV421 (клон 29F.1A12, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело против мышинового CD11b BV510 (клон M1/70, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело против мышинового CD3ε BV605 (клон 145-2C11, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело против мышинового CD8 BV785 (клон 53-6.7, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело против мышинового CD44 FITC (клон IM7, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело против мышинового CD4 PerCP Cy5.5 (клон GK1.5, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело против мышинового CD62L PE (клон MEL-14, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело против мышинового CXCR5 PE Dazzle (клон L138D7, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), антитело против мышинового CD25 PE Cy7 (клон PC61.5, BioLegend Inc.; 1:100, конечная концентрация), и антитело против мышинового 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 В-клеток (B220+ клеток), В-клетки маргинальной зоны (MZ) (B220+, CD19+, CD23-, CD21^{high}, IgM^{high} клетки), В-клетки зародышевого центра (GC) (B220+, CD19+, GL7+, CD95+ клетки), Т-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) 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 ответы, опосредованные KLH-антителами, по сравнению с Fc-контролем изотипа (SEQ ID NO:73), 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. Образцы мышинной сыворотки при многочисленных разведениях инкубировали в планшетах, покрытых KLH, с последующим промыванием и определением с использованием 1:2000 козьего антитела к IgG1 мыши, конъюгированного с HRP, или 1:5000 козьего антитела к IgM мыши, конъюгированного с HRP. Проявление окраски было достигнуто 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.10А (первичный ответ), Фиг.10В (вторичный ответ), а статистический анализ с помощью однофакторного ANOVA и некорректированного теста множественного сравнения Фишера с наименьшей значимой разностью представлен в Таблице E4 и Таблице E5, соответственно. Уровни ОП анти-KLH IgG1 представлены на Фиг.10С

(первичный ответ), Фиг.10D (вторичный ответ), а статистический анализ с помощью однофакторного ANOVA и некорректированного теста множественного сравнения Фишера с наименьшей значимой разностью представлен в Таблице Е6 и Таблице Е7. Результаты демонстрируют, что каждый из тестируемых препаратов позволил значительно снизить уровни анти-KLH IgM в сыворотке во время первичного иммунного ответа по сравнению с лечением Fc-контролем, при этом 29 TACI-CRD2-Fc (SEQ ID NO:29) продемонстрировал наибольшее снижение среди всех тестируемых препаратов, а лечение TACI 30-110-Fc и TACI 13-118-Fc дало самый слабый эффект (Фиг.10А). 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, вызывали значительное снижение уровней IgM против KLH, причем все тестируемые препараты, за исключением TACI 30-110-Fc, TACI 13-118-Fc, обеспечивали снижение (Фиг.10В). Каждый из тестируемых препаратов также позволял значительно снизить уровни анти-KLH IgG1 во время первичного иммунного ответа по сравнению с Fc-контролем, причем все тестируемые препараты, за исключением TACI 30-110-Fc, TACI 13-118-Fc, снова продемонстрировали наибольшее снижение (Фиг.10С). Что касается вторичного ответа на KLH, то все тестируемые препараты, за исключением TACI 30-110-Fc, TACI 13-118-Fc, значительно снижали уровни анти-KLH IgG1 (Фиг.10D). Эти результаты указывают, что большинство молекул, содержащих vTD TACI, были эффективны для снижения Т-клеточно-зависимого иммунного ответа антител к KLH, при этом 26 TACI CRD2-Fc, 27 TACI CRD2-Fc и 29 TACI CRD2-Fc проявляли наиболее значительные эффекты на этой мышинной модели иммунизации.

Таблица Е4. Статистический анализ уровней ОП анти-KLH IgM (первичный ответ; Фиг.10А)		
Сравнение	р-значение	Достоверно?
Fc Контроль против TACI 30-110 – Fc	<0,0001	Да
Fc Контроль против TACI 13-118 – Fc	<0,0001	Да
Fc Контроль против 26 TACI CRD2-Fc	<0,0001	Да
Fc Контроль против 27 TACI CRD2-Fc	<0,0001	Да
Fc Контроль против 29 TACI CRD2-Fc	<0,0001	Да
Fc Контроль против интактных	<0,0001	Да

Таблица Е5. Статистический анализ уровней ОП анти-KLH IgM (вторичный ответ; Фиг.10В)		
Сравнение	р-значение	Достоверно?
Fc Контроль против TACI 30-110 – Fc	0,0283	Да
Fc Контроль против TACI 13-118 – Fc	0,4653	Нет
Fc Контроль против 26 TACI CRD2-Fc	<0,0001	Да

Таблица Е5. Статистический анализ уровней ОП анти-KLN IgM (вторичный ответ; Фиг.10B)		
Сравнение	р-значение	Достоверно?
Fc Контроль против 27 TACI CRD2-Fc	<0,0001	Да
Fc Контроль против 29 TACI CRD2-Fc	<0,0001	Да
Fc Контроль против интактных	<0,0001	Да

Таблица Е6. Статистический анализ уровней ОП анти-KLN IgG1 (первичный ответ; Фиг.10C)		
Сравнение	р-значение	Достоверно?
Fc Контроль против TACI 30-110 – Fc	0,0218	Да
Fc Контроль против TACI 13-118 – Fc	0,0093	Да
Fc Контроль против 26 TACI CRD2-Fc	0,0012	Да
Fc Контроль против 27 TACI CRD2-Fc	0,0002	Да
Fc Контроль против 29 TACI CRD2-Fc	<0,0001	Да
Fc Контроль против интактных	<0,0001	Да

Таблица Е7. Статистический анализ уровней ОП анти-KLN IgG1 (вторичный ответ; Фиг.10D)		
Сравнение	р-значение	Достоверно?
Fc Контроль против TACI 30-110 – Fc	0,5367	Нет
Fc Контроль против TACI 13-118 – Fc	0,1477	Нет
Fc Контроль против 26 TACI CRD2-Fc	<0,0001	Да
Fc Контроль против 27 TACI CRD2-Fc	<0,0001	Да
Fc Контроль против 29 TACI CRD2-Fc	<0,0001	Да
Fc Контроль против интактных	<0,0001	Да

Как показано на Фиг.11А и 11В, 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 мышами, получавшими Fc-контроль (Таблица Е8). У мышей, получавших каждый из испытуемых препаратов, также было значительно меньше клеток селезенки, чем в группе Fc-контроля. Уменьшение селезенки указывает на уменьшение количества лимфоцитов, которые могут оказывать иммуномодулирующее воздействие на патогенез аутоиммунных и воспалительных заболеваний, связанных с повышенными иммунными реакциями, особенно теми, которые вызваны В- и/или Т-клетками. Статистические анализы массы селезенки и общего количества клеток приведены в Таблице Е8 и Таблице Е9, соответственно.

Таблица Е8. Статистические сравнения всех экспериментальных групп по массе селезенки (Фиг.11А):

Экспериментальная группа	Fc контроль	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	541 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110 – Fc	ns					
TACI 13-118 – Fc	ns	ns				
26 TACI CRD2-Fc	0,0062	0,0172	0,0319			
27 TACI CRD2-Fc	0,0097	0,0261	0,0469	ns		
29 TACI CRD2-Fc	0,0181	0,0435	ns	ns	ns	
Интактные	0,041	ns	ns	ns	ns	ns

Таблица Е9. Статистические сравнения всех экспериментальных групп по количеству клеток селезенки (Фиг.11В)

Экспериментальная группа	Fc контроль	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	26 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110 – Fc	0,0022					
TACI 13-118 – Fc	0,0079	ns				
26 TACI CRD2-Fc	<0,0001	0,0099	0,0029			
27 TACI CRD2-Fc	<0,0001	0,004	0,0011	ns		
29 TACI CRD2-Fc	<0,0001	ns	0,0227	ns	ns	
Интактные	<0,0001	ns	0,0241	ns	ns	ns

Особое значение для патогенеза аутоиммунных и воспалительных заболеваний имеют типы клеток, которые способствуют выживанию и дифференцировке В-клеток, выработке антител и эффекторной памяти Т-клеток. Эти типы клеток включают, без ограничения указанными: общие В-клетки, В-клетки маргинальной зоны (MZ), В-клетки зародышевого центра (GC), Т-фолликулярные хелперные клетки (Tfh) и CD4⁺ и CD8⁺ Т-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 любым из тестируемых препаратов TACI vTD-Fc существенно уменьшало количество множественных субпопуляций В-клеток селезенки по сравнению с

остальными группами лечения, включая воздействие на переходные-2 (B220+ CD19+ CD23+ CD21^{high} IgM^{high}), фолликулярные клетки (B220+ CD19+ CD23+ CD21+ IgM+), клетки маргинальной зоны (B220+ CD19+ CD23^{neg} CD21^{high} IgM^{high}), клетки зародышевого центра (B220+ CD19+ GL7+ CD95+) и плазматические клетки (B220+ CD19+ CD138^{high}) (Фиг.12 и Фиг.13). Эти молекулы vTD TACI были столь же эффективны или лучше, чем две молекулы WT TACI -Fc (TACI 13-188-Fc и TACI 30-110-Fc) в их способности снижать процент (не показано) или количество этих популяций, которые важны для выживания и дифференцировки В-клеток и выработки антител. Статистические анализы данных проточной цитометрии спленоцитов от 20-го дня показаны в Таблицах E10-E28.

Популяции селезеночных CD3+, CD4+ или CD8+ Т-клеток в значительной степени не подвергались воздействию 6 испытуемых препаратов, содержащих vTD TACI. по сравнению с группой Fc-контроля (Фиг.14A-C), а Т-клетки памяти T_{cm} и T_{em} по сравнению с Fc контрольной группой не подвергались влиянию (Фиг.15). По сравнению с Fc контролем, 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.14D).

Таблица E10. Статистический анализ субпопуляций В-клеток селезенки – количество клеток по сравнению с группой Fc-контроля (Фиг.12)						
Сравнение	T1 В клетки	T2 В клетки	Фолликулярные В-клетки	В-клетки маргинальной зоны	В-клетки зародышевого центра	Плазматические клетки
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 26 TACI CRD2-Fc	0,9402	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Fc Контроль против 27 TACI CRD2-Fc	0,4679	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Fc Контроль против 29 TACI CRD2-Fc	0,9061	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Fc Контроль против интактных	0,2333	0,0241		<0,0001	<0,0001	<0,0001

Таблица E11. Статистический анализ субпопуляций Т-клеток селезенки - количество клеток по сравнению с группой Fc-контроля (Фиг.14А-14D)				
Сравнение	CD3+ Т клетки	CD8+ Т клетки	CD4+ Т клетки	CD4+ Tfh клетки
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 26 TACI CRD2-Fc	0,1513	0,6863	0,0261	<0,0001
Fc Контроль против 27 TACI CRD2-Fc	0,1209	0,8049	0,0095	<0,0001
Fc Контроль против 29 TACI CRD2-Fc	0,4042	0,7596	0,0728	<0,0001
Fc Контроль против интактных	0,0038	0,0086	0,0029	<0,0001

Таблица E12. Статистический анализ субпопуляций Т-клеток селезенки – количество клеток по сравнению с группой Fc-контроля (Фиг.15)						
Сравнение	Наивные CD4+ Т-клетки	CD4+ Тем клетки	CD4+ Тем клетки	Наивные CD8+ Т-клетки	CD8+ Тем клетки	CD8+ Тем клетки
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 26 TACI CRD2-Fc	0,1548	0,0003	<0,0001	0,5016	0,7516	0,7624
Fc Контроль против 27 TACI CRD2-Fc	0,0824	<0,0001	<0,0001	0,5055	0,8187	0,2444
Fc Контроль против 29 TACI CRD2-Fc	0,2292	0,0015	0,0004	0,5929	0,3311	0,1632
Fc Контроль против интактных	0,0433	0,0516	<0,0001	0,0782	0,0016	0,0166

Таблица E13. Статистическое сравнение всех экспериментальных групп по количеству T1 В-клеток						
Опытная группа	Fc Контроль	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	26 TACI CRD2- Fc	27 TACI CRD2- Fc	29 TACI CRD2- Fc
TACI 30-110 – Fc	ns					
TACI 13-118 – Fc	ns	ns				
26 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns			
27 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns	ns		
29 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns	ns	ns	
Интактные	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Таблица Е17. Статистическое сравнение всех экспериментальных групп по количеству В-клеток зародышевого центра						
Опытная группа	Fc Контроль	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	26 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110 – Fc	0,0182					
TACI 13-118 – Fc	0,0139	ns				
26 TACI CRD2-Fc	<0,0001	0,0036	0,0049			
27 TACI CRD2-Fc	<0,0001	0,0008	0,0011	ns		
29 TACI CRD2-Fc	<0,0001	0,0403	ns	ns	ns	
Интактные	<0,0001	<0,0001	<0,0001	ns	ns	0,0601

Таблица Е18. Статистическое сравнение всех экспериментальных групп по количеству плазматических клеток						
Опытная группа	Fc Контроль	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	26 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110 – Fc	<0,0001					
TACI 13-118 – Fc	0,0016	ns				
26 TACI CRD2-Fc	<0,0001	0,0007	<0,0001			
27 TACI CRD2-Fc	<0,0001	0,0024	0,0001	ns		
29 TACI CRD2-Fc	<0,0001	0,0028	0,0002	ns	ns	
Интактные	<0,0001	ns	0,0211	0,0236	ns	ns

Таблица Е19. Статистическое сравнение всех экспериментальных групп по количеству CD3+ Т-клеток						
Опытная группа	Fc Контроль	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	26 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110 – Fc	ns					
TACI 13-118 – Fc	ns	ns				
26 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns			
27 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns	ns		
29 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns	ns	ns	
Интактные	0,0038	0,0089	0,0104	ns	ns	ns

Таблица Е20. Статистическое сравнение всех экспериментальных групп по количеству CD4+ Т-клеток						
Опытная группа	Fc Контроль	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	26 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110 – Fc	ns					
TACI 13-118 – Fc	ns	ns				
26 TACI CRD2-Fc	0,0261	ns	ns			
27 TACI CRD2-Fc	0,0095	ns	ns	ns		
29 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns	ns	ns	
Интактные	0,0029	0,062	ns	ns	ns	ns

Таблица E21. Статистическое сравнение всех экспериментальных групп по количеству CD8+ Т-клеток						
Опытная группа	Fc Контроль	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	26 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110 – Fc	ns					
TACI 13-118 – Fc	ns	ns				
26 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns			
27 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns	ns		
29 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns	ns	ns	
Интактные	0,023	0,0051	0,0072	ns	0,0387	0,0167

Таблица E22. Статистическое сравнение всех экспериментальных групп по количеству фолликулярных Т-хелперных клеток						
Опытная группа	Fc Контроль	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	26 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110 – Fc	<0,0001					
TACI 13-118 – Fc	0,0001	ns				
26 TACI CRD2-Fc	<0,0001	ns	0,0078			
27 TACI CRD2-Fc	<0,0001	ns	0,0058	ns		
29 TACI CRD2-Fc	<0,0001	ns	0,0293	ns	ns	
Интактные	<0,0001	ns	ns	0,0472	0,036	ns

Таблица E23. Статистическое сравнение всех экспериментальных групп по количеству наивных CD4+ Т-клеток						
Опытная группа	Fc Контроль	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	26 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110 – Fc	ns					
TACI 13-118 – Fc	ns	ns				
26 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns			
27 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns	ns		
29 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns	ns	ns	
Интактные	0,0433	ns	ns	ns	ns	ns

Таблица E24. Статистическое сравнение всех экспериментальных групп по количеству CD4+ Tsm клеток						
Опытная группа	Fc Контроль	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	26 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110 – Fc	ns					
TACI 13-118 – Fc	ns	ns				
26 TACI CRD2-Fc	0,0003	0,0488	0,0148			
27 TACI CRD2-Fc	<0,0001	0,0206	0,0056	ns		
29 TACI CRD2-Fc	0,0015	ns	0,0415	ns	ns	
Интактные	ns	ns	ns	0,0453	0,0183	ns

Таблица E25. Статистическое сравнение всех экспериментальных групп по количеству CD4+ Тем клеток						
Опытная группа	Fc Контроль	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	26 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110 – Fc	0,0088					
TACI 13-118 – Fc	0,0355	ns				
26 TACI CRD2-Fc	<0,0001	0,0188	0,0043			
27 TACI CRD2-Fc	<0,0001	0,0094	0,002	ns		
29 TACI CRD2-Fc	0,0004	ns	ns	ns	ns	
Интактные	<0,0001	0,0128	0,0026	ns	ns	ns

Таблица E26. Статистическое сравнение всех экспериментальных групп по количеству наивных CD8+ Т-клеток						
Опытная группа	Fc Контроль	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	26 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110 – Fc	ns					
TACI 13-118 – Fc	ns	ns				
26 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns			
27 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns	ns		
29 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns	ns	ns	
Интактные	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Таблица E27. Статистическое сравнение всех экспериментальных групп по количеству CD8+ Тсм клеток						
Опытная группа	Fc Контроль	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	26 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110 – Fc	ns					
TACI 13-118 – Fc	ns	ns				
26 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns			
27 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns	ns		
29 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns	ns	ns	
Интактные	0,0016	<0,0001	<0,0001	0,0041	0,0032	0,0001

Таблица E28. Статистическое сравнение всех экспериментальных групп по количеству CD8+ Тем клеток						
Опытная	Fc Контроль	TACI 30-110 – Fc	TACI 13-118 – Fc	26 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110 – Fc	ns					
TACI 13-118 – Fc	ns	ns				
26 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns			
27 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns	ns		
29 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns	ns	ns	
Интактные	0,0166	0,0002	<0,0001	0,0073	0,0005	0,0004

В совокупности эти результаты указывают на то, что vTD TACI-содержащие однодоменные Fc-гибридные молекулы, которые ингибируют активность В- и/или Т-

клеток, могут снижать иммунные ответы и изменения субпопуляций клеток, опосредованные Т-клеточно-зависимым антигеном KLH *in vivo* (т.е. уровни анти-KLH в сыворотке и изменения субпопуляций иммунных клеток). Эти результаты согласуются с оценкой молекул, ингибирующих В-клетки, с одним доменом TACI, в качестве клинической терапии при лечении аутоиммунных и воспалительных заболеваний, в которых гиперактивные лимфоциты играют определенную роль.

Пример 7. Оценка биологической активности блокады TACI-опосредованной стимуляции молекулами, содержащими TACI.

Были созданы дополнительные vTD TACI, содержащие одну или несколько мутаций, присутствующих в образцовых vTD TACI, указанных в SEQ ID NO:26 (K77E, F78Y, Y102D), SEQ ID NO:27 (Q75E, R84Q) или SEQ ID NO:29 (K77E, A101D, Y102D). Были получены одиночные, двойные и тройные мутации, содержащие комбинации мутаций из Q75E, K77E, F78Y, R84Q, A101D и Y102D. Полученные vTD TACI были дополнительно отформатированы в виде гибридного белка TACI vTD-Fc с Fc-доменом. Примерные полученные Fc-гибридные белки были созданы по существу так, как описано в Примере 1. Вкратце, для получения рекомбинантных иммуномодулирующих белков в качестве Fc-гибридных белков была создана кодирующая ДНК для кодирования белка следующим образом: вариантный домен TACI, за которым следует линкер из 7 аминокислот (GSGGGGS; SEQ ID NO:74), за которым следует безэфекторная Fc-последовательность IgG1 человека, содержащая мутации L234A, L235E и G237A, по системе нумерации EU для иммуноглобулиновых белков (SEQ ID NO:73). Для сравнения также были протестированы следующие молекулы: (1) WT TACI (68-110)-Fc (TACI 68-110, SEQ ID NO:13, TACI-Fc SEQ ID NO:171); и (2) TACI-Fc с примерными мутациями K77E, F78Y и Y102D, введенными в эталонный TACI ECD 13-118, который был гибридизован с примерной последовательностью Fc, указанной в SEQ ID NO:73; см. Пример 5. Дополнительные контроли включали: (3) WT TACI (13-118)-Fc (TACI 13-118, SEQ ID NO:131; соответствует части ECD TACI в телитацицепте); (4) WT TACI (30-110)-Fc (TACI 30-110, SEQ ID NO:130; соответствует части ECD TACI в атацицепте, SEQ ID NO:132); (5) BAFF-R ECD и (6) белимуаб.

Полученные молекулы оценивали на блокаду APRIL- или BAFF-опосредованной лигандной сигнализации через рецептор TACI в клетках Jurkat/NF-κB/TACI, по существу, как описано в Примере 2. Примерные молекулы TACI vTD-Fc титровали от 100 000 пМ до 6 пМ и смешивали с 30 нМ человеческого APRIL или 10 нМ человеческого BAFF за 30 минут до добавления клеток Jurkat/NF-κB/TACI. APRIL- или BAFF-опосредованную лигандную сигнализацию количественно оценивали путем мониторинга продукции

люциферазы в клетках.

Результаты суммированы как полумаксимальная ингибирующая концентрация (IC₅₀) примерных протестированных молекул в Таблице E29. Процентное изменение IC₅₀ по сравнению с WT TACI (68-110)-Fc (TACI 68-110, SEQ ID NO:13, TACI-Fc, SEQ ID NO 171) указано в скобках (Δ WT). Подобно результатам, описанным выше, минимальный CRD2 дикого типа WT TACI (68-110)-Fc демонстрировал превосходную блокаду APRIL и BAFF по сравнению с другими тестируемыми контрольными молекулами, включая молекулы с последовательностями, подобными телитацицепту и атацицепту. Как указано, определенные мутации и комбинации мутаций были связаны с дальнейшим существенным увеличением способности блокировать APRIL- или BAFF-опосредованную лигандную передачу сигналов. В совокупности результаты показывают способность молекул ν TD TACI блокировать APRIL и BAFF TACI-опосредованную лигандную передачу сигналов.

Таблица E29. Примерные TACI νTD-Fc			
SEQ ID NO	Мутации	APRIL IC₅₀ (нМ) (ΔWT)	BAFF IC₅₀ (нМ) (ΔWT)
26	K77E, F78Y, Y102D	9209 (0,75)	1552 (0,84)
27	Q75E, R84Q	11832 (0,96)	1461 (0,79)
29	K77E, A101D, Y102D	2914 (0,24)	1184 (0,64)
177	Q75E	1938 (0,16)	1457 (0,79)
32	K77E	159 (0,01)	1537 (0,83)
183	F78Y	176 (0,01)	1638 (0,88)
30	R84Q	566 (0,05)	5493 (2,96)
23	A101D	8382 (0,68)	1827 (0,99)
190	Y102D	11601 (0,94)	1863 (1,00)
178	Q75E, K77E	10709 (0,87)	1888 (1,02)
179	Q75E, F78Y	13431 (1,09)	1793 (0,97)
180	Q75E, A101D	19999 (1,62)	2357 (1,27)
181	Q75E, Y102D	11096 (0,90)	2147 (1,16)
191	K77E, F78Y	10110 (0,82)	1966 (1,06)
24	K77E, R84Q	4256 (0,35)	2258 (1,22)
25	K77E, A101D	2039 (0,17)	1957 (1,06)
192	K77E, Y102D	891 (0,07)	2178 (1,17)
184	F78Y, R84Q	2623 (0,21)	2260 (1,22)
185	F78Y, A101D	2015 (0,16)	1853 (1,00)
186	F78Y, Y102D	8492 (0,69)	1964 (1,06)
187	R84Q, A101D	11200 (0,91)	2346 (1,27)
188	R84Q, Y102D	12300 (1,00)	1864 (1,01)
189	A101D, Y102D	33570 (2,72)	1953 (1,05)
182	K77E, F78Y, R84Q	10058 (0,82)	2206 (1,19)

13	WT TACI (68-110) (SEQ ID NO:171)	12321 (1,00)	1854 (1,00)
1	WT TACI(13-118) Fc1,3	-	7905 (4,26)
Атацицепт	-	-	7735 (4,17)
Телитацицепт	-	-	9172 (4,95)
Телитацицепт	-	-	7297 (3,94)
Телитацицепт+	K77E, F78Y, Y102D	13168 (1,07)	1988 (1,07)
BAFF-R	-	-	53226 (28,7)
Белимумаб	-	-	2195 (1,18)

Пример 8. Оценка на модели синдрома Шегрена у мышей с диабетом без ожирения.

Этот пример описывает оценку примерных однодоменных 26-TACI-vTD Fc гибридных белков (TACI vTD SEQ ID NO:26; Fc-гибрид, SEQ ID NO:167) на 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 E30 ниже.

Таблица E30. Экспериментальные группы и режимы введения					
Группа	N	Введение анти-mPD-L1 (IP)	Испытуемый препарат (ТА)	Уровень дозы ТА (IP)	Лечение mAb и дни введения ТА
1	15	0,1 мг	Fc контроль	0,28 мг	0; 2; 4; 6 и 0; 2; 4
3	15	0,1 мг	26-TACI-CRD2 Fc	0,34 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 E31) и для инсулита в соответствии с Gutierrez et al 2014 (Таблица 7 в нем; воспроизведена в Таблице E32).

Таблица E31. 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 E32. Гистологическая система баллов для оценки инсулита	
Показатель	Критерии
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 были определены с использованием t-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.

Лечение образцовым Fc-гибридным белком 26-TACI-CRD2 снижало частоту сиаладенита (Фиг.16A) и приводило к значительно более низкому гистологическому показателю ($p < 0,01$), чем средние показатели для Fc-контроля (Фиг.16B). 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 в этой модели синдрома Шегрена.

Общая частота возникновения инсулита у этих мышей, склонных к диабету, и степень развития инсулита после лечения тестируемыми молекулами показаны на Фиг.17A и Фиг.17B. 26-TACI-CRD2 Fc-гибридные белки значительно снижали степень инсулита, что было оценено с помощью гистологического анализа (Фиг.17B).

В совокупности эти результаты указывают, что лечение протестированной образцовой молекулой TACI-Fc уменьшило частоту и тяжесть сиаладенита в этой мышинной модели синдрома Шегрена. Эти результаты указывают на потенциал молекул TACI в терапевтическом применении для лечения синдрома Шегрена, а также на многодоменные собранные молекулы TACI-CTLA-4 в качестве терапевтических средств для воздействия на развитие диабета 1 типа у людей.

Пример 9. Оценка примерных мономерных и тетрамерных конструкций.

Были получены дополнительные гибридные белки TACI-Fc, содержащие один (мономерный) или четыре (тетрамерный гантельный и тетрамерный тандемный) домена vTD TACI с использованием WT TACI различной длины: 68-110 (указан в SEQ ID NO:13), 29-110 (указан в SEQ ID NO:1) или 13-118 (указан в SEQ ID NO:131), и vTD TACI (указан в SEQ ID NO:26 (K77E, F78Y, Y102D)). Мономерные и тетрамерные WT TACI и vTD TACI были отформатированы в виде TACI WT и TACI vTD-Fc гибридных белков с Fc-доменом. Примерные созданные Fc-гибридные белки были получены по существу так, как описано в Примере 1, и описаны в Таблицах E33A-E33C.

Вкратце, для получения рекомбинантных мономерных иммуномодулирующих белков в виде одноцепочечных Fc-гибридных белков, кодирующую ДНК генерировали для кодирования белка следующим образом: WT TACI или вариантный домен TACI, за которым следует линкер из 12 аминокислот (GSGGGGGGGGGGGS; SEQ ID NO:194), за которым следует одноцепочечная Fc (scFc), указанная в SEQ ID NO:218 (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:73), за которым следует линкер (GGGGS)₁₃ (SEQ ID NO:195), за которым следует вторая безэффекторная Fc-последовательность IgG1 человека, содержащая мутации L234A, L235E и G237A, в соответствии с системой нумерации EU для иммуноглобулиновых белков). Длинный линкер, например, указанный в SEQ ID NO:195, соединяет C-конец первого блока Fc с N-концом второго блока Fc, образующего scFc. Полученные молекулы описаны в Таблице E33A.

Таблица E33A. Примерные мономерные иммуномодулирующие белки					
AA SEQ ID NO	NT SEQ ID NO	Описание	TACI SEQ ID NO	Линкер, SEQ ID NO	FC SEQ ID NO
196	207	TACI WT 13 GS(G4S) ₂ (194) sc Fc 218	13	194	218
199	210	TACI 26 GS(G4S) ₂ (194) scFc 218	26	194	218
203	214	TACI WT 1 GS(G4S) ₂ (194) scFc 218	1	194	218
205	216	TACI WT 131 GS(G4S) ₂ (194) scFc 218	131	194	218

Для получения рекомбинантных тетрамерных иммуномодулирующих белков в качестве Fc-гибридных белков были созданы белки в различных форматах следующим образом.

В одном формате была получена кодирующая ДНК для кодирования трех различных версий белка следующим образом: WT TACI (SEQ ID NO:198): домен WT TACI SEQ ID NO:13, за которым следует линкер (G4S)₄ SEQ ID NO:84; за которым следует WT TACI домен SEQ ID NO:13; за ним следует линкер GSGGGGS SEQ ID NO:74; за ним следует безэфекторная Fc-последовательность IgG1 человека, содержащая мутации L234A, L235E и G237A, в соответствии с системой нумерации EU для иммуноглобулиновых белков (SEQ ID NO:73).

В одном формате была создана кодирующая ДНК для кодирования трех различных версий белка следующим образом: WT TACI (SEQ ID NO:202): домен WT TACI SEQ ID NO:13, за которым следует линкер GSGGGGS SEQ ID NO:74; за которым следует безэфекторная Fc-последовательность IgG1 человека, содержащая мутации L234A, L235E и G237A, по системе нумерации EU для иммуноглобулиновых белков (SEQ ID NO:73), за которыми следует линкер (G4S)₄ SEQ ID NO:84, за которым следует домен WT TACI SEQ ID NO:13.

В одном формате была создана кодирующая ДНК для кодирования трех различных версий белка следующим образом: vTD TACI «гантель» (SEQ ID NO:201): vTD TACI, указанный в SEQ ID NO:26, за которым следует линкер GSGGGGS SEQ ID NO:74; за которым следует безэфекторная Fc-последовательность IgG1 человека, содержащая мутации L234A, L235E и G237A, по системе нумерации EU для иммуноглобулиновых белков (SEQ ID NO:73), за которой следует линкер (G4S)₄ SEQ ID NO:84, за которым следует vTD TACI, указанный в SEQ ID NO:26.

Таблица Е33В. Примерные тетрамерные иммуномодулирующие белки							
AA SEQ ID NO	NT SEQ ID NO	Описание	1 ^{-й} TACI	Линкер	2 ^{-й} TACI	Линкер	Fc
198	209	TACI WT 13 (G4S) ₄ (84) (TACI WT 13 GSG4S (74) Fc 73	13	84	13	74	73

Таблица Е33С. Примерные тетрамерные иммуномодулирующие белки							
AA SEQ ID NO	NT SEQ ID NO	Описание	1 ^{-й} TACI	Линкер	Fc	Линкер	2 ^{-й} TACI
202	213	TACI WT 13 GSG4S (74) Fc 73(G4S) ₄ (84) (TACI WT 13	13	74	73	84	13
201	212	TACI 26 GSG4S (74) Fc 73 (G4S) ₄ (84) TACI 26	26	74	73	84	26

А. Биологическая активность примерных мультидоменных молекул

В одном эксперименте примерные молекулы, приведенные в Таблицах Е33А-С, оценивали с использованием репортерных клеток Jurkat/NF-κB/TACI для блокады APRIL- или BAFF-опосредованной передачи сигналов, по существу, как описано в Примере 1. Активность оценивали по ингибированию растворимого BAFF (3-мера) или по ингибированию олигомера из двадцати 3-меров BAFF (60-мерного BAFF). В Таблице Е34 приведены значения полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC₅₀) для ингибирования APRIL- и BAFF-опосредованной передачи сигналов TACI. В некоторых случаях тестируемые белки не сравнивали с их родительским контролем по массе, и указывали как (-) в таблице ниже. Результаты в Таблице Е34 демонстрируют, что все созданные форматы блокируют связывание BAFF и APRIL.

Таблица Е34. Оценка примерных мономерных и тетрамерных иммуномодулирующих белков				
SEQ ID NO	Описание	APRIL IC₅₀ (нМ)	BAFF IC₅₀ (нМ)	BAFF 60-мер IC₅₀ (нМ)
196	TACI WT 13 GS(G4S)2 (194) sc Fc 218	-	5695	24081
198	TACI WT 13 (G4S)4 (84) (TACI WT 13 GSG4S (74) Fc 73	34554	3287	4333
202	TACI WT 13 GSG4S (74) Fc 73(G4S)4 (84) (TACI WT 13	11910	1039	2581
199	TACI 26 GS(G4S)2 (194) scFc 218	-	8237	106021
201	TACI 26 GSG4S (74) Fc 73 (G4S)4 (84) TACI 26	3762	779	778
203	TACI WT 1 GS(G4S)2 (194) scFc 218	-	4422	15801
205	TACI WT 131 GS(G4S)2 (194) scFc 218	-	4577	14268

Настоящее изобретение не предназначено для ограничения объема конкретными раскрытыми вариантами осуществления, которые представлены, 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 по меньшей мере один вариантный полипептид TACI, который содержит одну или несколько аминокислотных замен во внеклеточном домене (ECD) эталонного полипептида TACI 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:122.

2. Иммуномодулирующий белок, включающий вариантный гибридный белок TACI-Fc, содержащий вариантный полипептид TACI, Fc-область и линкер между полипептидом TACI и Fc-областью, где вариантный полипептид TACI содержит одну или несколько аминокислотных замен во внеклеточном домене (ECD) эталонного полипептида TACI 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:122.

3. Иммуномодулирующий белок по п.1 или п.2, 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.

4. Иммуномодулирующий белок по любому из п.1-3, в котором эталонный полипептид TACI содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:122, или ее часть, содержащую один или оба из домена CRD1 и домена CRD2, которые связываются с APRIL, BAFF или гетеротримером BAFF/APRIL.

5. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-4, в котором в эталонном полипептиде TACI отсутствует N-концевой метионин.

6. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-5, в котором эталонный полипептид TACI содержит домен CRD1 и домен CRD2.

7. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-6, в котором эталонный полипептид TACI содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:1.

8. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-6, в котором эталонный полипептид TACI состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:1.

9. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-5, 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), причем вариантный полипептид TACI содержит одну или несколько аминокислотных замен в укороченном внеклеточном домене TACI дикого типа.

10. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-5 и 9, в котором эталонный полипептид TАСI представляет собой укороченный внеклеточный домен TАСI 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:122, где вариантный полипептид TАСI содержит одну или несколько аминокислотных замен в укороченном внеклеточном домене TАСI дикого типа.

11. Иммуномодулирующий белок по п.9 или п.10, в котором эталонный полипептид TАСI представляет собой укороченный внеклеточный домен TАСI дикого типа, который имеет 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 или 51 аминокислоту по длине.

12. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-5 и 9-11, в котором эталонный полипептид TАСI состоит по существу из домена CRD2.

13. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-5 и 9-12, в котором эталонный полипептид TАСI представляет собой укороченный внеклеточный домен TАСI дикого типа, который состоит из аминокислотных остатков 68-110, указанных в SEQ ID NO:122.

14. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-5 и 9-13, в котором эталонный полипептид TАСI содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:13.

15. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-5 и 9-13, в котором эталонный полипептид TАСI состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:13.

16. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-15, 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.

17. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-16, в котором одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере одну из E74V, K77E, Y79F, L82H, L82P, R84G, R84L, R84Q, D85V или C86Y.

18. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-16, в котором одна или несколько аминокислотных замен включают аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из Q75E, K77E, F78Y, R84G, R84Q, A101D и Y102D, или любую их комбинацию.

19. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-16 и 18, в котором одна или несколько аминокислотных замен содержат по меньшей мере аминокислотную замену Q75E.

20. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-19, в котором одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере аминокислотную замену K77E.

21. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-16 и 18-20, в котором одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере аминокислотную замену F78Y.

22. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-17 и 19-21, в котором одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере аминокислотную замену R84G.

23. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-21, в котором одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере аминокислотную замену R84Q.

24. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-16 и 18-23, в котором одна или несколько аминокислотных замен включают по меньшей мере аминокислотную замену A101D.

25. Иммуномодулирующий белок по любому из п.1-23, в котором одна или несколько аминокислотных замен включают Q75E/R84Q, Q75E/K77E, Q75E/F78Y, Q75E/A101D, Q75E/Y102D, F77E/F78Y, K77E/R84Q, K77E/A101D, K77E/Y102D, F78Y/R84Q, F78Y/A101D, F78Y/Y102D, R84Q/A101D, R84Q/Y102D или A101D/Y102D.

26. Иммуномодулирующий белок по любому из п.1-25, 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.

27. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-25, в котором одна или несколько аминокислотных замен представляют собой R84G, A101D, K77E/R84Q, K77E/A101D, K77E/F78Y, K77E/F78Y/Y102D, Q75E/R84Q, K77E/A101D/Y102D, R84Q, K77E, A101D, Q75E, K77E/F78Y/R84Q, F78Y, F78Y/R84Q, F78Y/A101D, F78Y/Y102D или K77E/Y102D.

28. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-18, 20, 21 и 25-27, в котором одна или несколько аминокислотных замен представляют собой K77E/F78Y/Y102D.

29. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-19, 23 и 25-27, в котором одна или несколько аминокислотных замен представляют собой Q75E/R84Q.

30. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-18, 20 и 24-27, в котором одна

или несколько аминокислотных замен представляют собой K77E/A101D/Y102D.

31. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-30, в котором вариантный полипептид TACI обладает повышенной аффинностью связывания с одним или обоими из APRIL и BAFF по сравнению с эталонным полипептидом TACI.

32. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-31, в котором вариантный полипептид TACI обладает повышенной аффинностью связывания с APRIL.

33. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-32, в котором вариантный полипептид TACI обладает повышенной аффинностью связывания с BAFF.

34. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-33, в котором вариантный полипептид TACI обладает повышенной аффинностью связывания с APRIL и BAFF.

35. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.30-34, 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.

36. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.30-35, в котором вариантный полипептид TACI имеет до 10 аминокислотных модификаций по сравнению с эталонным полипептидом TACI.

37. Иммуномодулирующий белок по п.30-35, в котором вариантный полипептид TACI имеет до 5 аминокислотных модификаций по сравнению с эталонным полипептидом TACI.

38. Иммуномодулирующий белок по любому из п.1-37, в котором вариантный полипептид TACI имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO:122 или его фрагментом специфического связывания, включающим домен CRD1 и/или домен CRD2.

39. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-37, в котором вариантный полипептид TACI имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:122 или ее фрагментом специфического связывания, включающим домен CRD1 и/или домен CRD2.

40. Иммуномодулирующий белок по п.38 или п.39, в котором фрагмент специфического связывания указан в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:130 или SEQ ID NO:131.

41. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-40, в котором вариантный полипептид TACI имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO:13.

42. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-40, в котором вариантный

полипептид TAC1 имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:13.

43. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-42, в котором:

- вариантный полипептид TAC1 содержит последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO:2-12, 21, 22 и 101-120; или

- вариантный полипептид TAC1 содержит последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO:14-20, 23-35, 92-100 и 177-192.

44. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-43, в котором:

- вариантный полипептид TAC1 состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO:2-12, 21, 22 и 101-120; или

- вариантный полипептид TAC1 состоит по существу или состоит из последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO:14-20, 23-35, 92-100 и 177-192.

45. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-44, в котором вариантный полипептид TAC1 указан в SEQ ID NO:26.

46. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-44, в котором вариантный полипептид TAC1 указан в SEQ ID NO:27.

47. Иммуномодулирующий белок, содержащий по меньшей мере один полипептид TAC1, который представляет собой укороченный внеклеточный домен TAC1 дикого типа, который содержит богатый цистеином домен 2 (CRD2), но полностью лишен богатого цистеином домена 1 (CRD1).

48. Иммуномодулирующий белок, содержащий по меньшей мере один полипептид TAC1, который представляет собой укороченный внеклеточный домен TAC1 дикого типа, который состоит из непрерывной последовательности, содержащейся в аминокислотных остатках 67-118, которая состоит из аминокислотных остатков 71-104, со ссылкой на положения, указанные в SEQ ID NO:122.

49. Иммуномодулирующий белок, включающий гибридный белок TAC1-Fc, содержащий укороченный внеклеточный домен TAC1 дикого типа, Fc-область и линкер между полипептидом TAC1 и Fc-областью, причем укороченный внеклеточный домен TAC1 дикого типа содержит богатый цистеином домен 2 (CRD2), но не содержит всего богатого цистеином домена 1 (CRD1).

50. Иммуномодулирующий белок, включающий гибридный белок TAC1-Fc, содержащий укороченный внеклеточный домен TAC1 дикого типа, Fc-область и линкер между полипептидом TAC1 и Fc-областью, причем укороченный внеклеточный домен TAC1 дикого типа состоит из непрерывной последовательности, содержащейся в аминокислотных остатках 67-118, которая состоит из аминокислотных остатков 71-104, со

ссылкой на положения, указанные в SEQ ID NO:122.

51. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.47-50, в котором укороченный внеклеточный домен TAC1 дикого типа имеет 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 или 51 аминокислоту по длине.

52. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.47-51, в котором укороченный внеклеточный домен TAC1 дикого типа состоит из аминокислотных остатков 68-110, указанных в SEQ ID NO:122.

53. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.47-51, в котором укороченный внеклеточный домен TAC1 дикого типа состоит из последовательности аминокислот, указанной в SEQ ID NO:13.

54. Иммуномодулирующий белок, содержащий по меньшей мере один полипептид TAC1, который представляет собой укороченный полипептид TAC1, состоящий из последовательности аминокислот, указанной в SEQ ID NO:13.

55. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.47-54, в котором укороченный полипептид TAC1 связывается с APRIL, BAFF или гетеротримером BAFF/APRIL.

56. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1, 3-48 и 51-55, содержащий гетерологичный фрагмент, который связан по меньшей мере с одним полипептидом TAC1, при необходимости через линкер.

57. Иммуномодулирующий белок по п.56, в котором гетерологичный фрагмент представляет собой фрагмент, продлевающий период полужизни, домен мультимеризации, нацеливающий фрагмент, который связывается с молекулой на поверхности клетки, или обнаруживаемую метку.

58. Иммуномодулирующий белок по п.57, в котором фрагмент, продлевающий период полужизни, включает домен мультимеризации, альбумин, альбуминсвязывающий полипептид, Pro/Ala/Ser (PAS), С-концевой пептид (СТР) бета-субъединицы человеческого хорионического гонадотропина, полиэтиленгликоль (PEG), длинные неструктурированные гидрофильные последовательности аминокислот (XTEN), гидроксипропанкрахмал (HES), малую молекулу, связывающую альбумин, или их комбинацию.

59. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1, 3-48 и 51-58, представляющий собой гибридный белок TAC1-Fc, в котором по меньшей мере один полипептид TAC1 связан с Fc-областью иммуноглобулина, при необходимости через линкер.

60. Иммуномодулирующий белок любому из пп.2, 49, 50, 56-59, где линкер включает пептидный линкер, который выбран из GSGGS (SEQ ID NO:76), GGGGS (G4S);

SEQ ID NO:77), GSGGGGS (SEQ ID NO:74), GGGGSGGGGS (2xGGGGS; SEQ ID NO:78), GGGGSGGGGSGGGGS (3xGGGGS; SEQ ID NO:79), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (4xGGGGS, SEQ ID NO:84), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (5xGGGGS, SEQ ID NO:91), GGGGSSA (SEQ ID NO:80), или GSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:194), или их комбинаций.

61. Иммуномодулирующий белок по любому из п.п.2, 49, 50, 59 и 60, 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.

62. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.2, 49, 50 и 59-61, в котором Fc иммуноглобулина является Fc-доменом IgG1, а Fc содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:81.

63. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.2, 49, 50 и 59-61, 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.

64. Иммуномодулирующий белок по п.63, в котором Fc-область иммуноглобулина содержит аминокислотные замены L234A, L235E и G237A по нумерации EU, при необходимости, где Fc-область указана в любой из SEQ ID NO:73, 75, 83, 136 или 221.

65. Иммуномодулирующий белок по п.63 или п.64, в котором Fc-область иммуноглобулина дополнительно содержит аминокислотные замены A330S и P331S, при необходимости, где Fc-область указана в SEQ ID NO:175 или SEQ ID NO:176.

66. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.2, 49, 50 и 59-65, в котором гибридный белок TACI-Fc содержит структуру: полипептид TACI (TACI)-Линкер-Fc-область.

67. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.2, 49, 50, 59-62 и 66, в котором гибридный белок TACI-Fc указан в SEQ ID NO:168.

68. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.2, 49, 50, 59-62 и 66, в котором гибридный белок TACI-Fc указан в SEQ ID NO:170.

69. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.2, 49, 50, 59-61 и 63-66, в котором Fc представляет собой вариантную Fc, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:73.

70. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.2, 49, 50, 59-61, 63-66 и 69, в котором гибридный белок TACI-Fc указан в SEQ ID NO:167.

71. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.2, 49, 50, 59-61, 63-66 и 69, в котором гибридный белок TACI-Fc указан в SEQ ID NO:169.

72. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.2, 49, 50 и 59-71, который представляет собой гомодимер, содержащий две идентичные копии гибридного белка TACI-Fc.

73. Иммуномодулирующий белок, который является гомодимером, содержащим две идентичные копии гибридного белка TACI-Fc, указанного в SEQ ID NO:167, связанные ковалентной дисульфидной связью.

74. Иммуномодулирующий белок, представляющий собой гомодимер, содержащий две идентичные копии гибридного белка TACI-Fc, указанного в SEQ ID NO:168, соединенные ковалентной дисульфидной связью.

75. Иммуномодулирующий белок, представляющий собой гомодимер, содержащий две идентичные копии гибридного белка TACI-Fc, указанного в SEQ ID NO:169, соединенные ковалентной дисульфидной связью.

76. Иммуномодулирующий белок, который является гомодимером, содержащим две идентичные копии гибридного белка TACI-Fc, указанного в SEQ ID NO:170, связанные ковалентной дисульфидной связью.

77. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.2, 49, 50 и 59-65, в котором гибридный белок TACI-Fc содержит структуру: (TACI)-Линкер-Fc-область-Линкер-(TACI).

78. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.2, 49, 50, 59-65 и 77, в котором гибридный белок TACI-Fc указан в SEQ ID NO:201.

79. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.2, 49, 50, 59-65 и 77, в котором гибридный белок TACI-Fc указан в SEQ ID NO:202.

80. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.2, 49, 50 и 59-65, в котором гибридный белок TACI-Fc содержит структуру: (TACI)-Линкер-(TACI)-Линкер-Fc область.

81. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.2, 49, 50, 59-65 и 80, в котором гибридный белок TACI-Fc указан в SEQ ID NO:198.

82. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.2, 49, 50, 59-65 и 77-81, который представляет собой гомодимер, содержащий две идентичные копии гибридного белка TACI-Fc.

83. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.2, 49, 50 и 59-82, в котором Fc-гибридный белок нейтрализует APRIL и BAFF.

84. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.2, 49, 50 и 59-83, 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.

85. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-84, 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.

86. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-85, который уменьшает или ингибирует созревание, дифференцировку и/или пролиферацию В-клеток.

87. Молекула (молекулы) нуклеиновой кислоты, кодирующая иммуномодулирующий белок по любому из пп.1-86.

88. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.87.

89. Вектор по п.88, который является вектором экспрессии.

90. Вектор по п.88 или п.89, который представляет собой вектор экспрессии млекопитающих или вирусный вектор.

91. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по п.87 или вектор по любому из пп.88-90.

92. Клетка по п.91, которая является клеткой млекопитающего.

93. Клетка по п.91 или п.92, представляющая собой человеческую клетку.

94. Способ получения иммуномодулирующего белка, включающий введение молекулы нуклеиновой кислоты по п.87 или вектора по любому из п.88-90 в клетку-хозяина в условиях для экспрессии белка в клетке.

95. Способ по п.94, дополнительно включающий выделение или очистку иммуномодулирующего белка из клетки.

96. Иммуномодулирующий белок, полученный способом по п.94 или п.95.

97. Фармацевтическая композиция, содержащая иммуномодулирующий белок по любому из пунктов 1-86 или 96.

98. Фармацевтическая композиция по п.97, содержащая фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

99. Изделие, включающее фармацевтическую композицию по п.97 или п.98 во флаконе или контейнере.

100. Набор, содержащий фармацевтическую композицию по п.97 или п.98 или изделие по п.99, и инструкции по применению.

101. Способ снижения иммунного ответа у субъекта, включающий введение иммуномодулирующего белка по любому из пп.1-86 или фармацевтической композиции по п.97 или п.98 субъекту, нуждающемуся в этом.

102. Способ по п.101, в котором у субъекта снижается иммунный ответ В-клеток, в результате чего снижается или ингибируется созревание, дифференцировка и/или пролиферация В-клеток.

103. Способ по п.101 или п.102, в котором у субъекта снижают уровни APRIL, BAFF или гетеротримера APRIL/BAFF в циркуляции.

104. Способ по любому из пп.101-103, в котором снижение иммунного ответа лечит заболевание, расстройство или состояние у субъекта.

105. Способ снижения циркулирующих уровней APRIL, BAFF или гетеротримера APRIL/BAFF у субъекта, включающий введение субъекту иммуномодулирующего белка по любому из пп.1-86 или фармацевтической композиции по п.97 или п.98.

106. Способ лечения заболевания, расстройства или состояния у субъекта, включающий введение иммуномодулирующего белка по любому из пп.1-86 или фармацевтической композиции по п.97 или п.98 субъекту, нуждающемуся в этом.

107. Способ по п.104 или п.106, 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.

108. Способ по п.106 или п.107, в котором заболевание, расстройство или состояние выбирают 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.

109. Способ по п.106 или п.107, в котором заболевание, расстройство или состояние представляет собой В-клеточный рак, а рак представляет собой миелому.

110. Фармацевтическая композиция по п.97 или п.98 для применения в снижении иммунного ответа у субъекта.

111. Применение иммуномодулирующего белка по любому из пп.1-86 или

фармацевтической композиции по п.97 или п.98 в производстве лекарственного средства для снижения иммунного ответа у субъекта.

112. Фармацевтическая композиция для применения по п.110 или применение по п.111, где иммунный ответ представляет собой В-клеточный иммунный ответ, где снижение иммунного ответа уменьшает или ингибирует созревание, дифференцировку и/или пролиферацию В-клеток.

113. Фармацевтическая композиция для применения или применение по любому из п.110-112, где снижение иммунного ответа снижает циркулирующие уровни APRIL, BAFF или гетеротримера APRIL/BAFF у субъекта.

114. Фармацевтическая композиция для применения или применение по любому из п.110-113, где снижение иммунного ответа лечит заболевание, расстройство или состояние у субъекта.

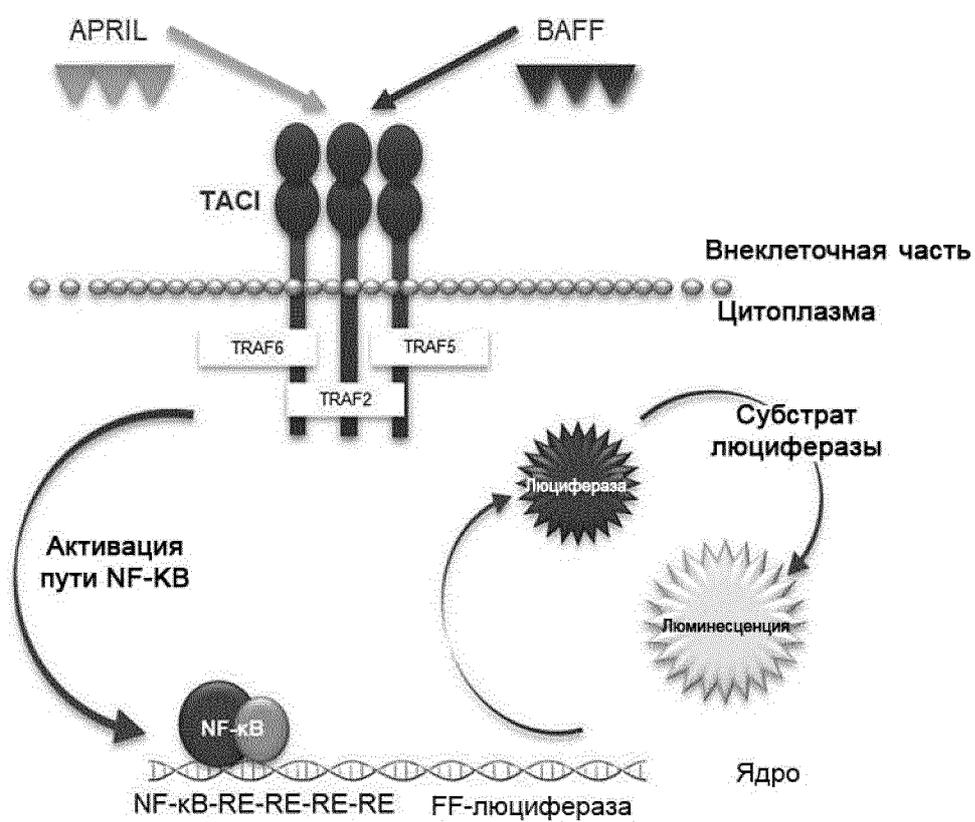
115. Фармацевтическая композиция по п.97 или п.98 для применения при лечении заболевания, расстройства или состояния у субъекта.

116. Применение иммуномодулирующего белка по любому из пп.1-86 или фармацевтической композиции по п.97 или п.98 в производстве лекарственного средства для лечения заболевания, расстройства или состояния у субъекта.

117. Фармацевтическая композиция для применения по п.115 или применение по п.116, где заболевание, расстройство или состояние является аутоиммунным заболеванием, воспалительным состоянием, В-клеточным раком, патологией, опосредованной антителами, заболеванием почек, отторжением трансплантата, болезнью «трансплантат против хозяина» или вирусной инфекцией.

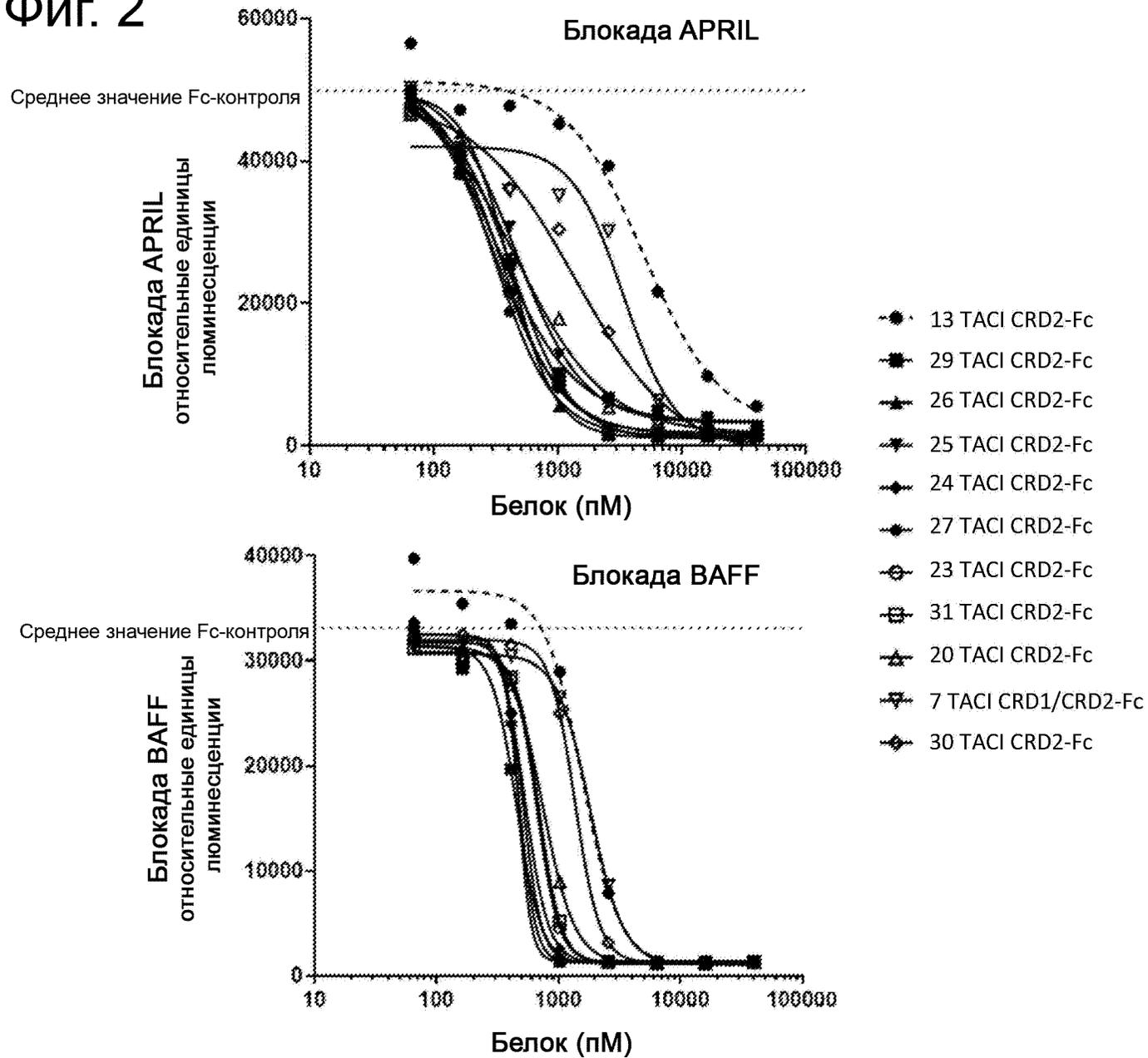
118. Фармацевтическая композиция для применения или применение по любому из пп.115-117, где заболевание, расстройство или состояние выбрано из группы, состоящей из системной красной волчанки (СКВ); синдрома Шегрена, склеродермии, рассеянного склероза, диабета, полимиозита, первичного билиарного цирроза, IgA-нефропатии, IgA-васкулита, неврита зрительного нерва, амилоидоза, синдрома антифосфолипидных антител (APS), аутоиммунного полигландулярного синдрома II типа (APS II), аутоиммунного заболевания щитовидной железы (АИТД), болезни Грейвса, аутоиммунного адреналита и вульгарной пузырчатки.

119. Фармацевтическая композиция для применения или применение по любому из пп.115-117, где заболевание, расстройство или состояние представляет собой В-клеточный рак, а рак представляет собой миелому.

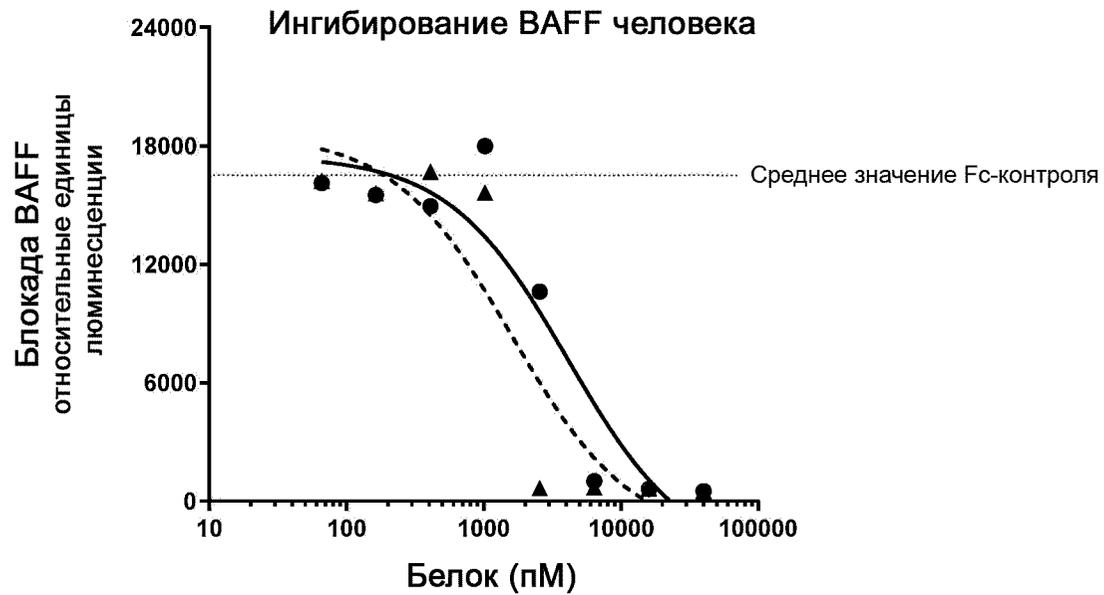
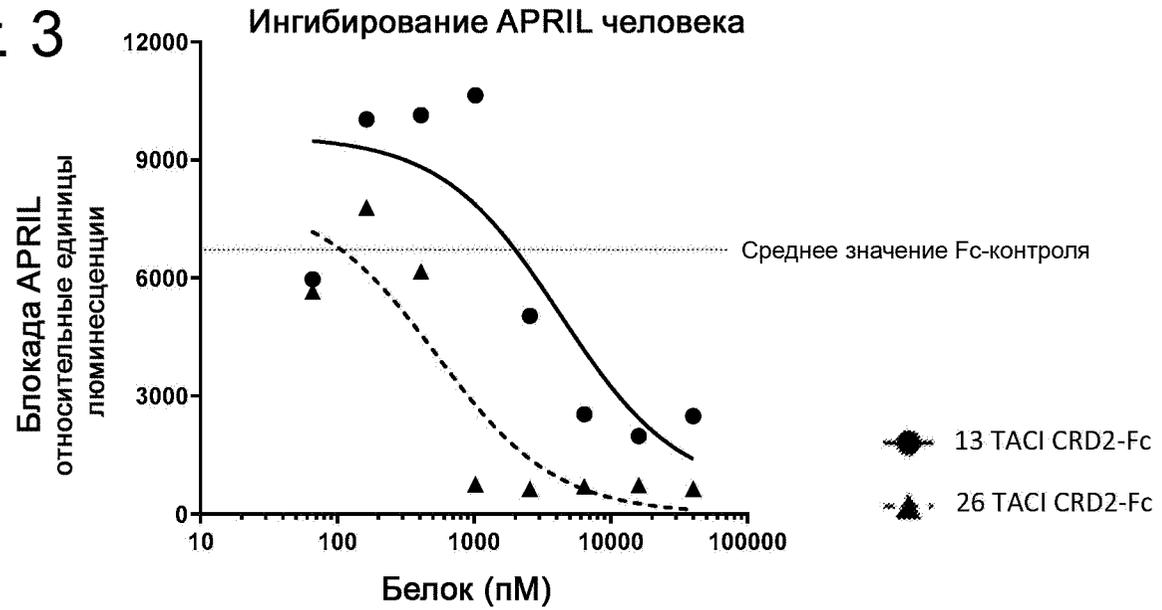


Фиг. 1

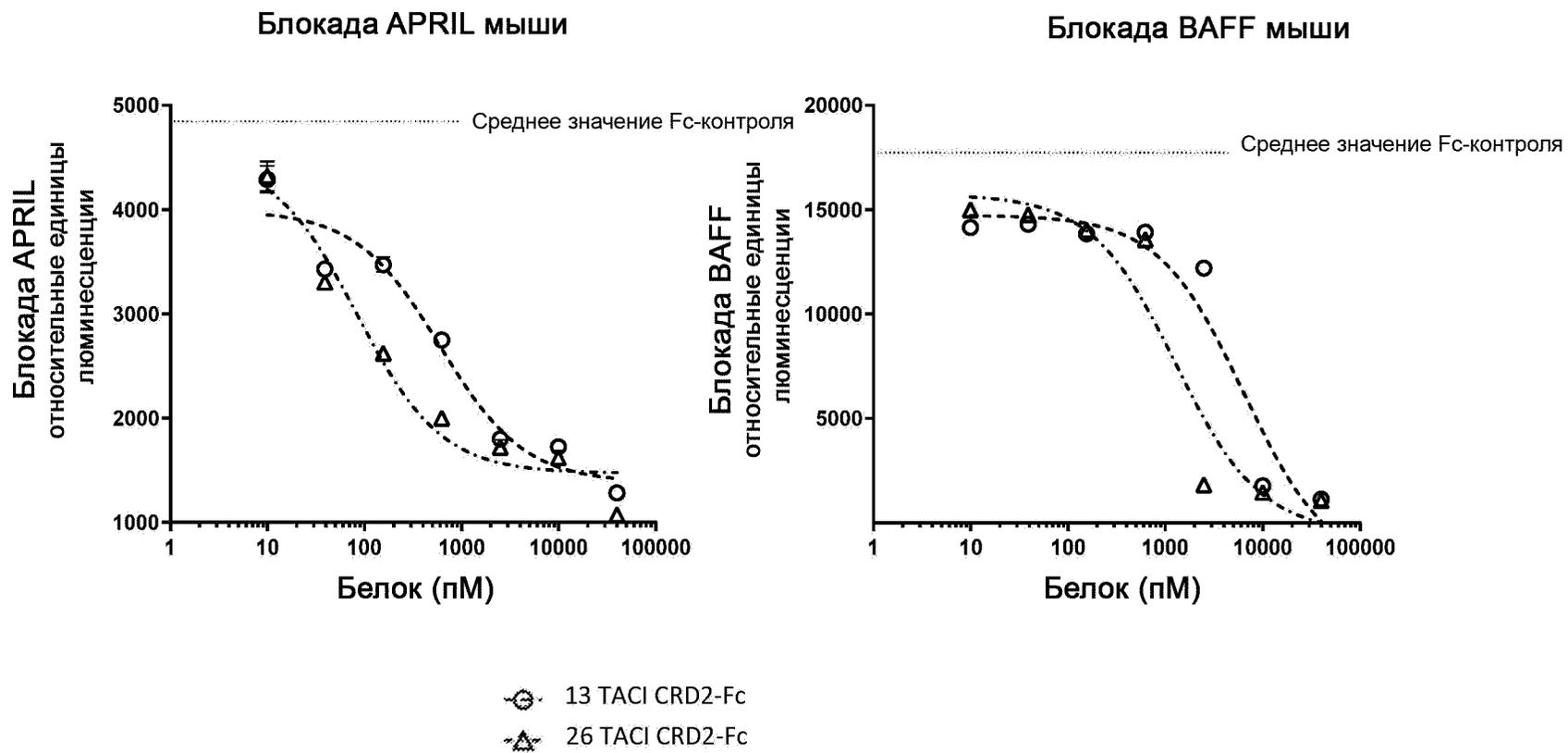
ФИГ. 2



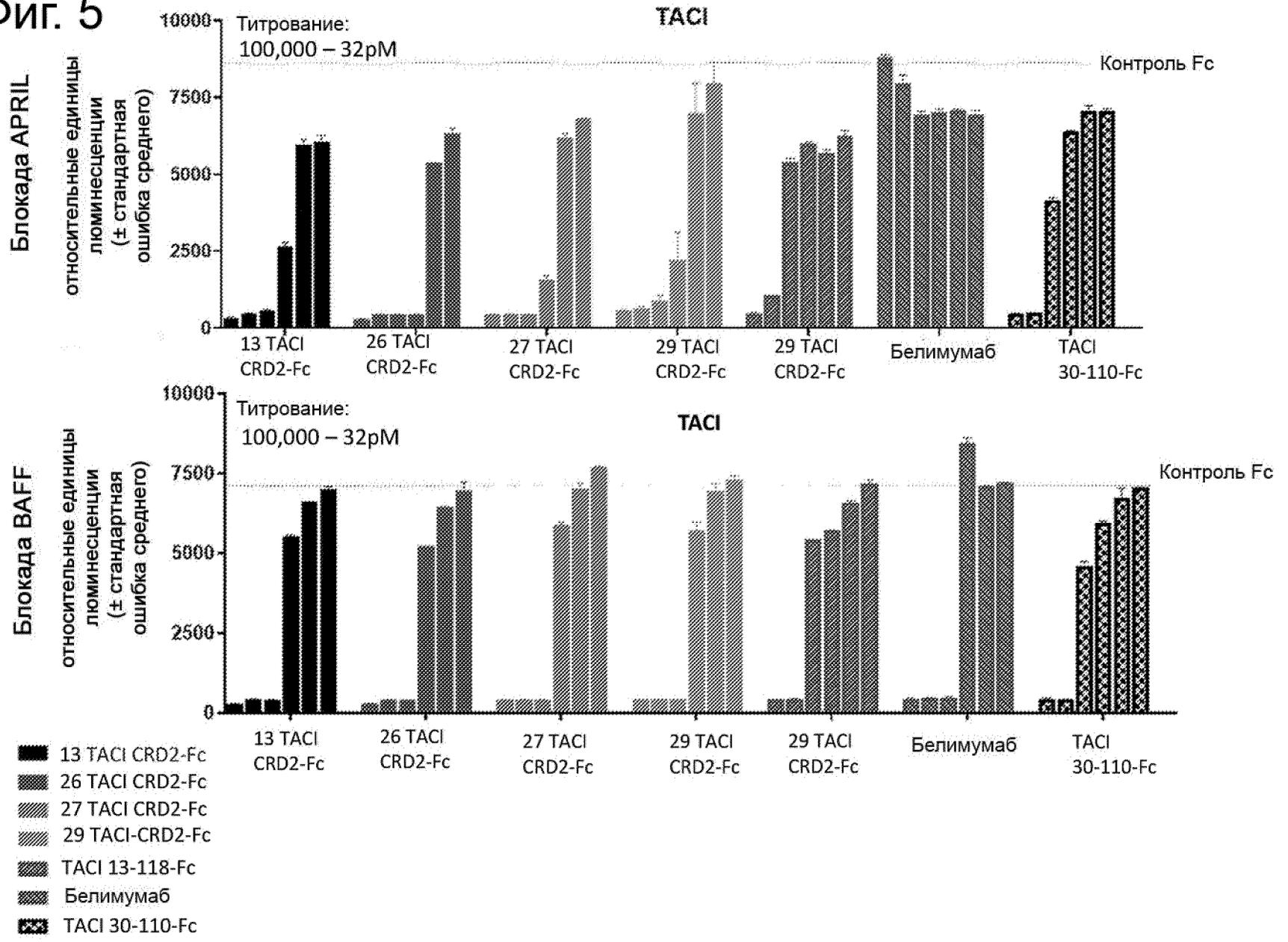
ФИГ. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



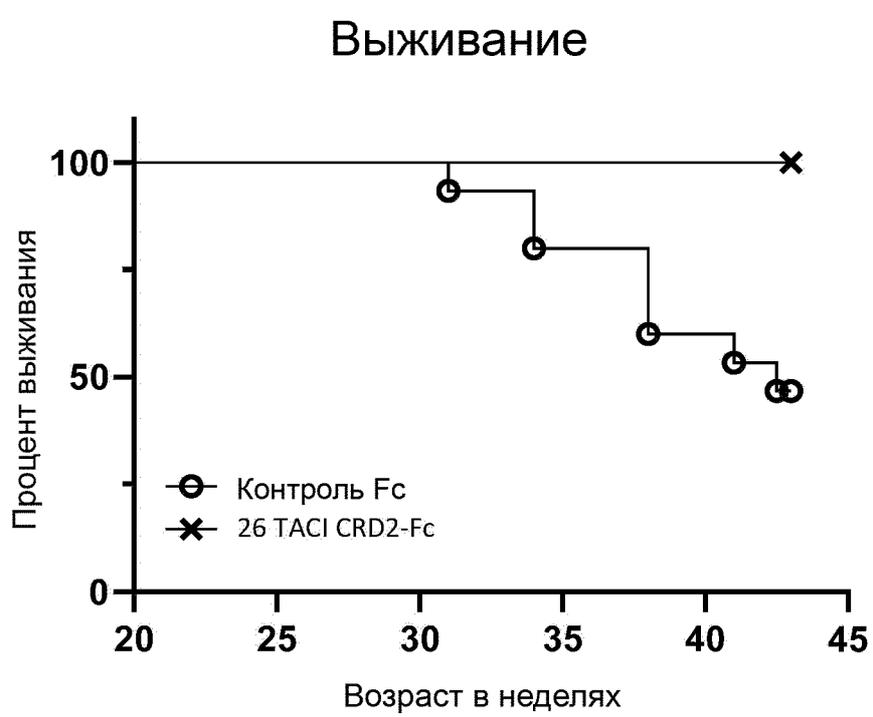
Фиг. 6А



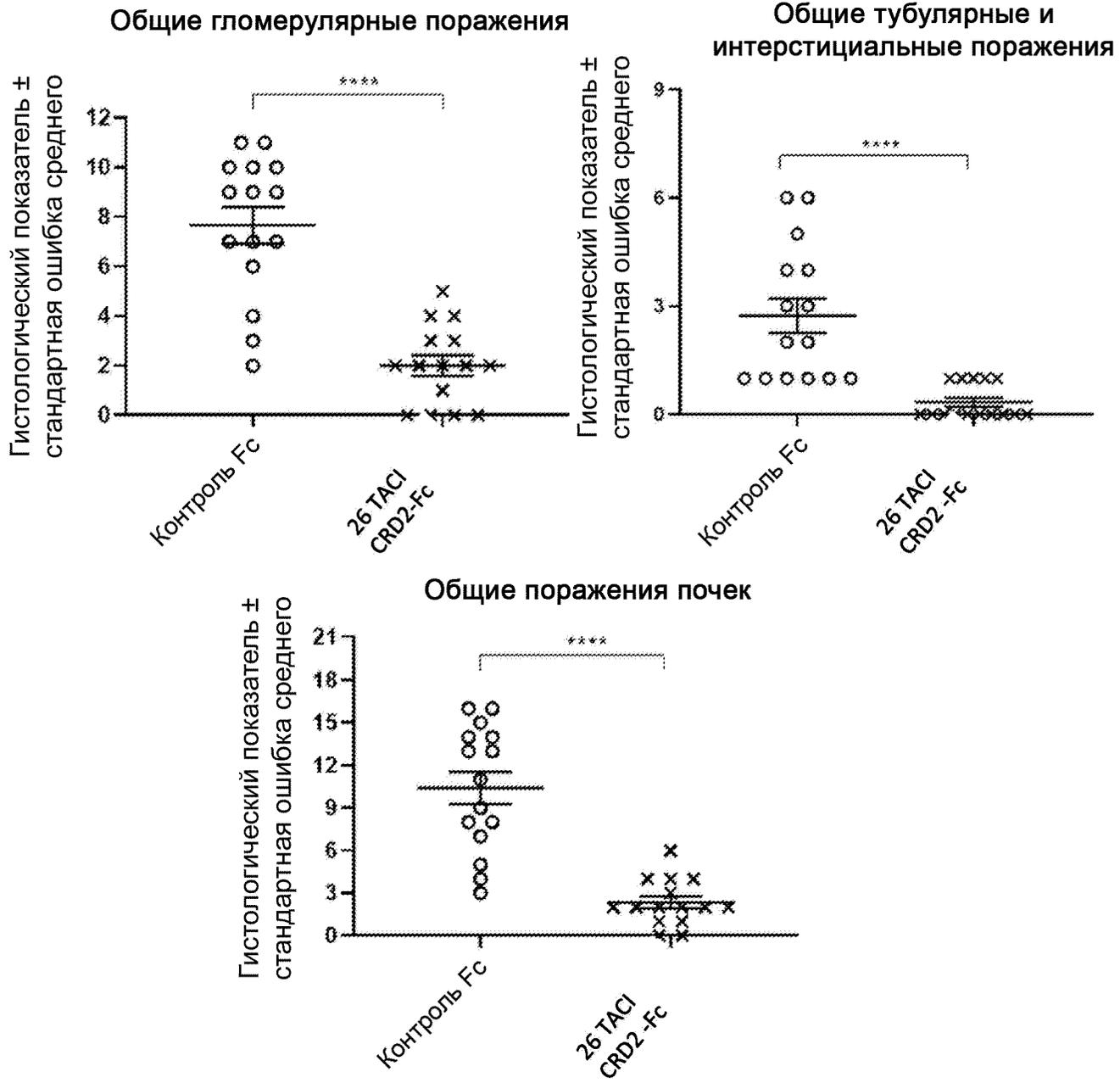
Фиг. 6В



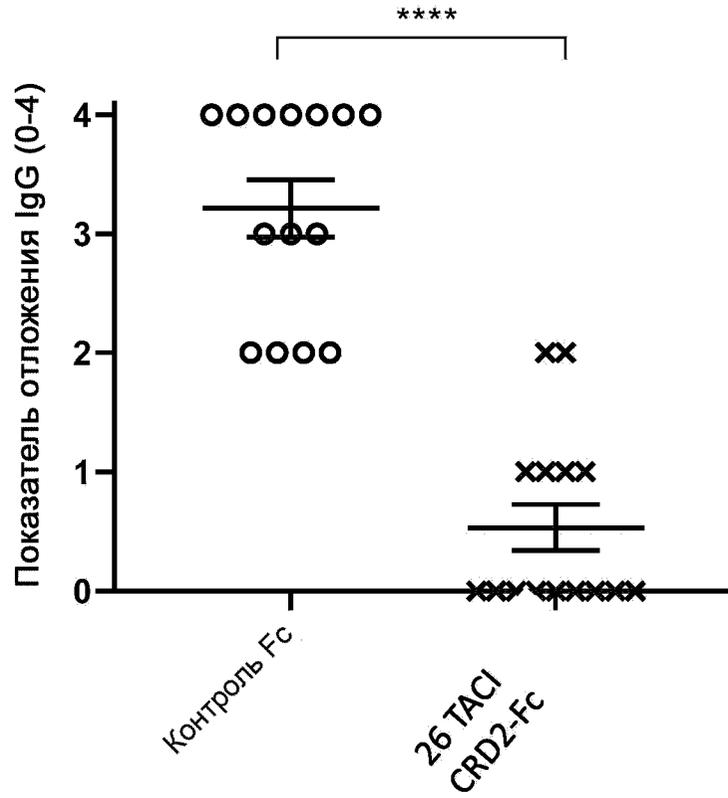
Фиг. 6С



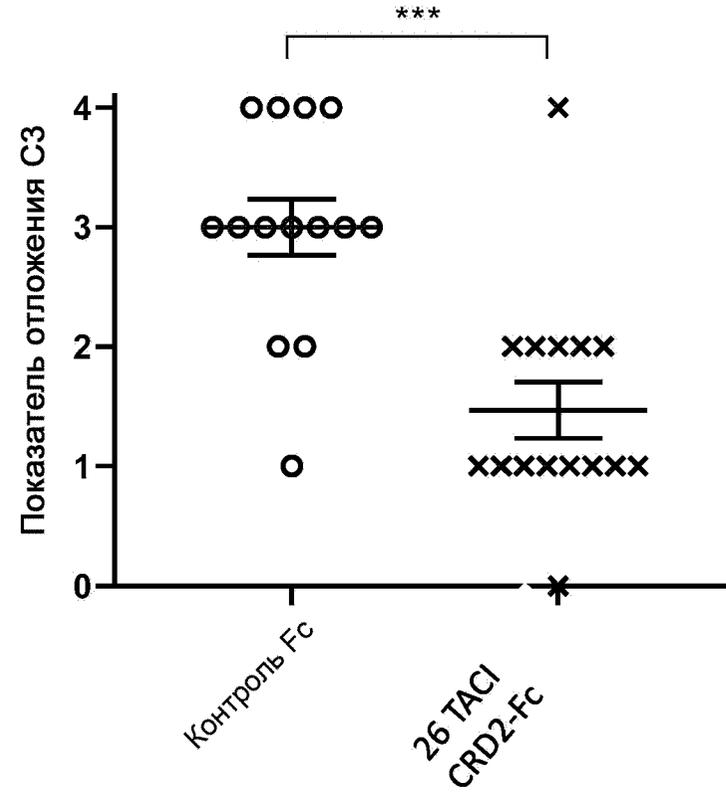
Фиг. 6F



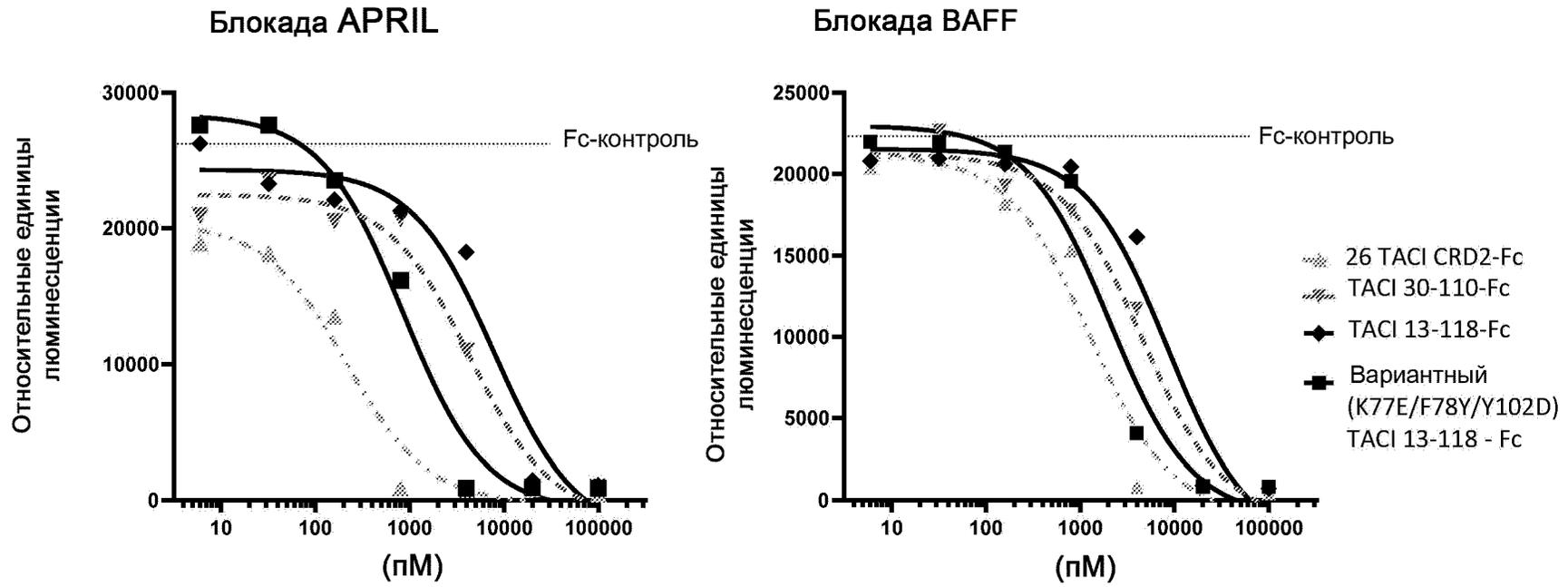
Фиг. 6G



Фиг. 6H

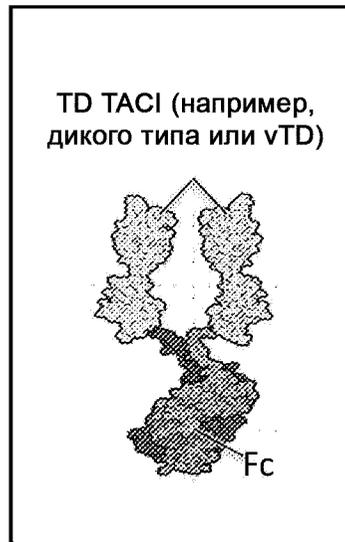


Фиг. 7



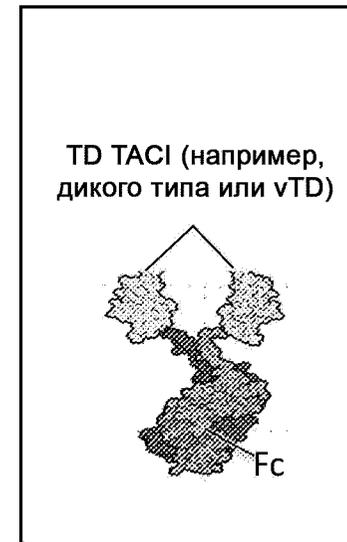
Фиг. 8А

Растворимый TACI-Fc



Фиг. 8В

Растворимый TACI-Fc

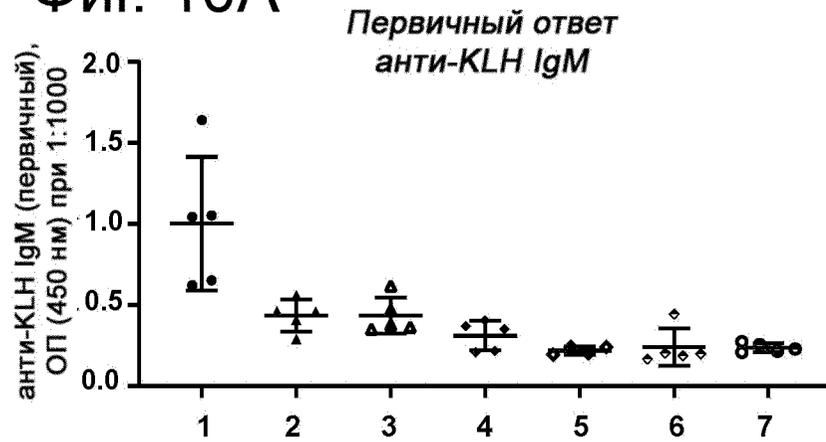


Фиг. 9

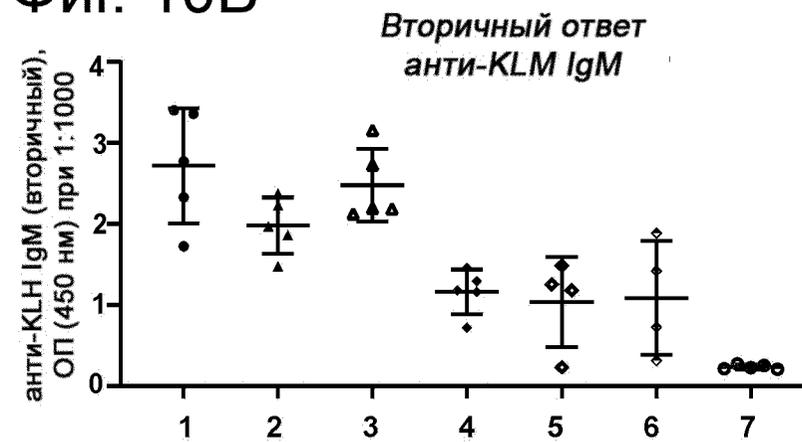
TACI 122	MSGLGRSRRGGRSRVDQEERFPQGLWTGVAMRSCPEEQYWDPLLGTCMSCKTICNHQSQR	60
TACI 13	-----	0
TACI 122	TCAAFCRSLSCRKEQGKFDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPVNLPELRR	120
TACI 13	-----SLSCRKEQGKFDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLR-----	43

TACI 122	QRSGEVENNSDNSGRYQGLEHRGSEASPALPGLKLSADQVALVYST	166
TACI 13	-----	43

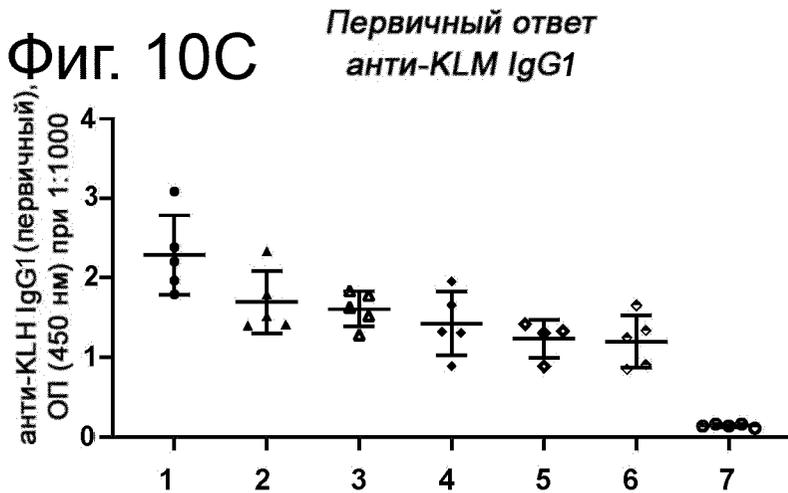
Фиг. 10А



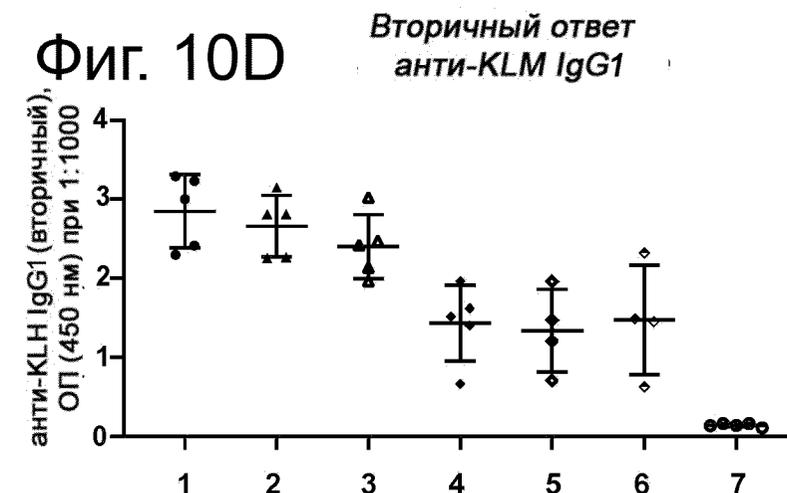
Фиг. 10В



Фиг. 10С

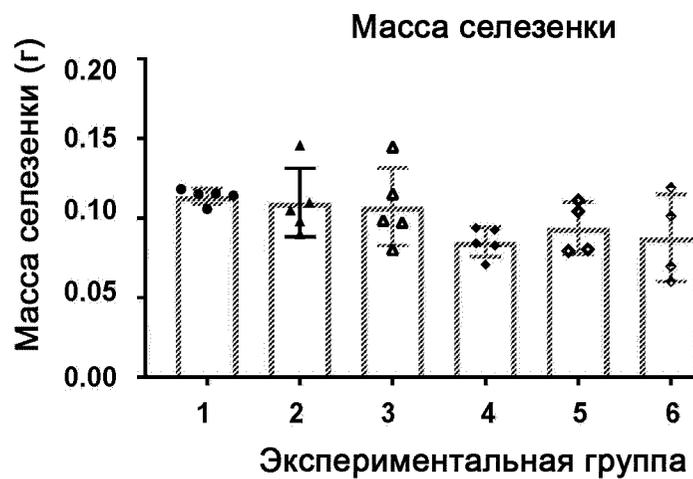


Фиг. 10D

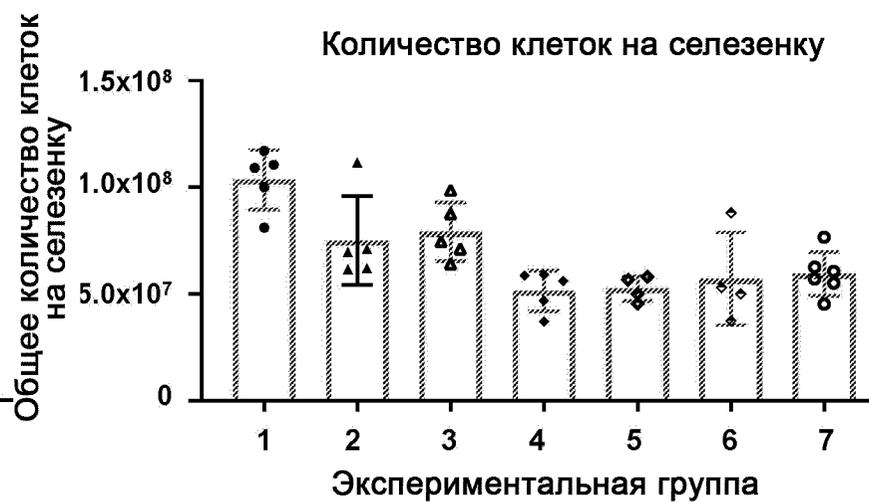


1. Fc-контроль
2. TACI 30-110 – Fc
3. TACI 13-118 – Fc
4. 26 TACI CRD2-Fc
5. 27 TACI CRD2-Fc
6. 29 TACI CRD2-Fc
7. Интактные

Фиг. 11А

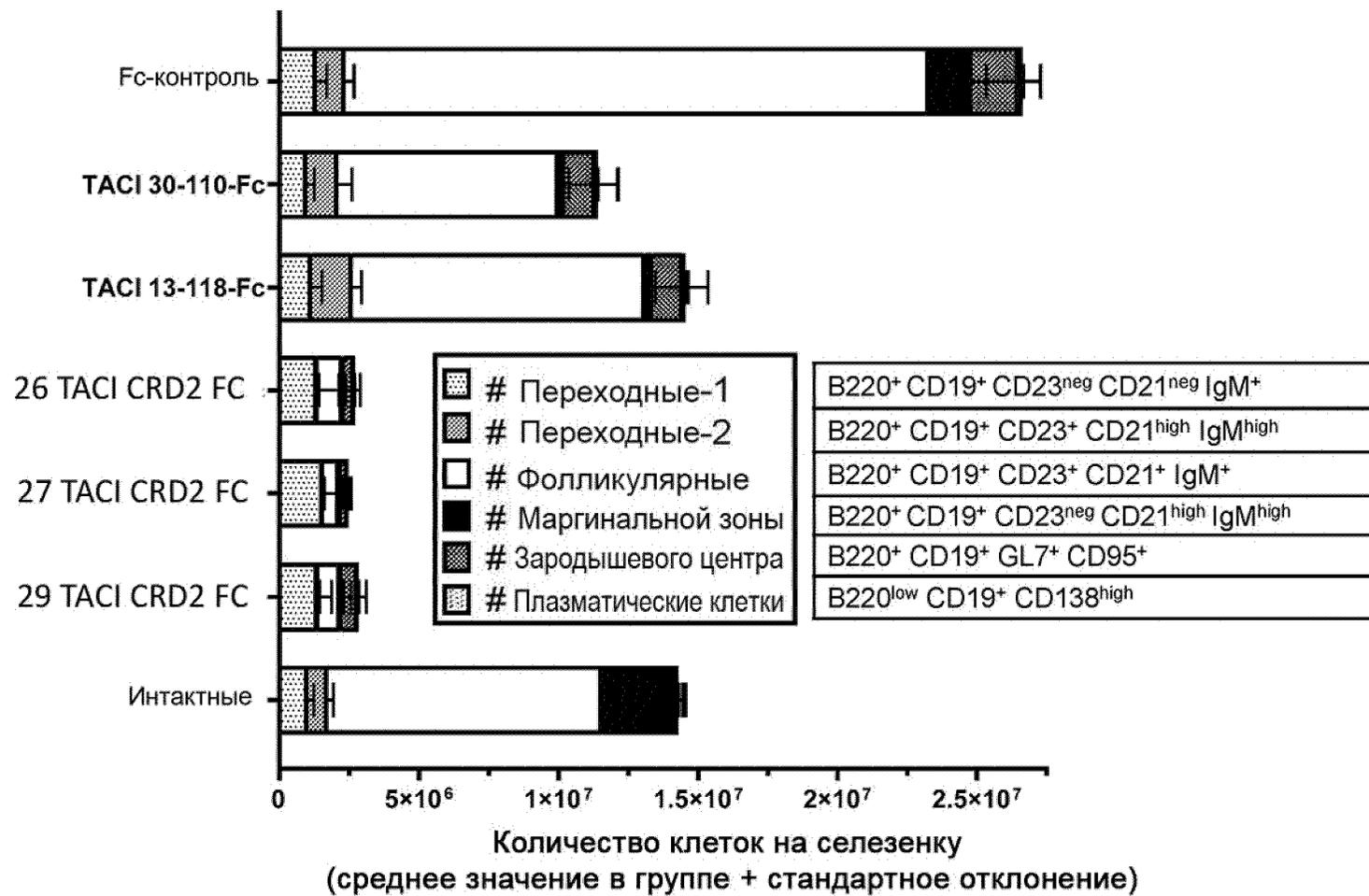


Фиг. 11В

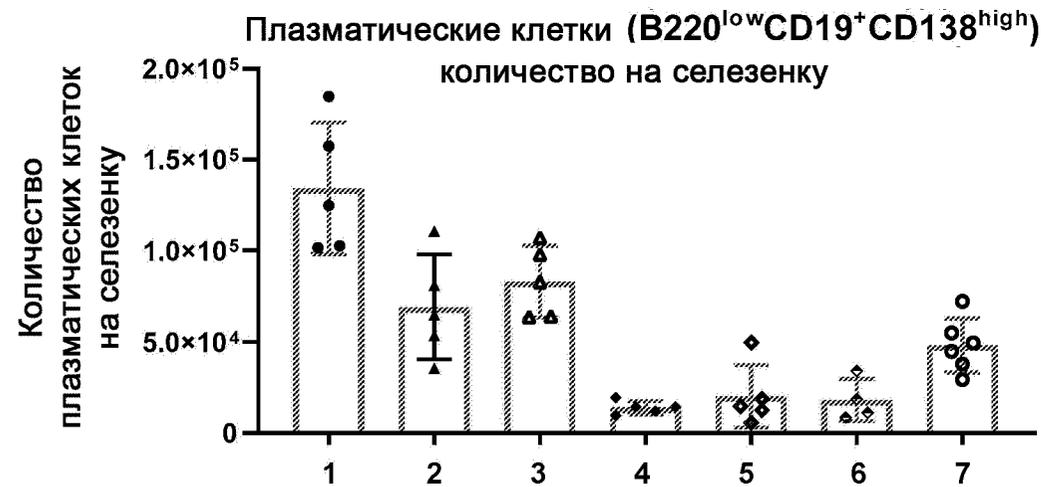
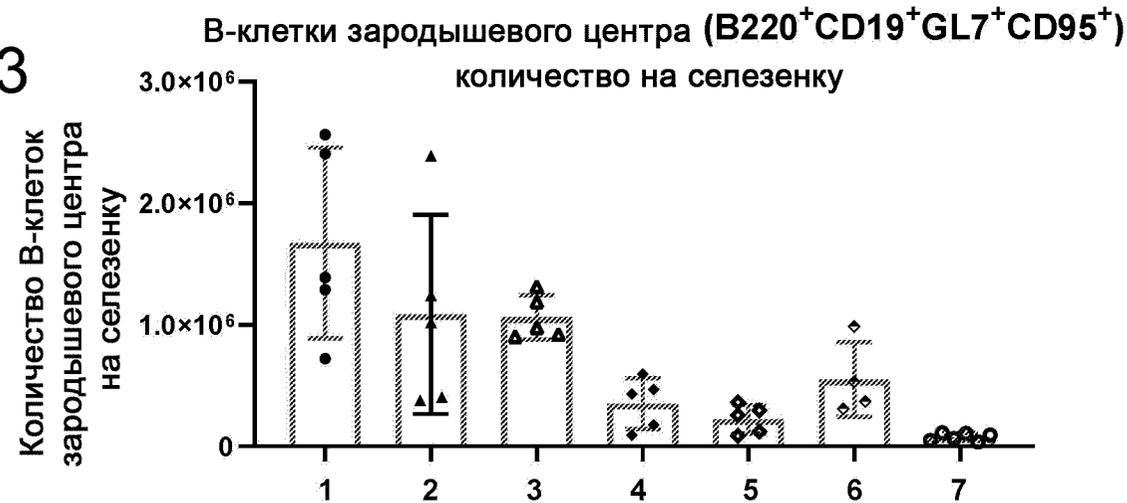


1. Fc-контроль
2. TACI 30-110 – Fc
3. TACI 13-118 – Fc
4. 26 TACI CRD2-Fc
5. 27 TACI CRD2-Fc
6. 29 TACI CRD2-Fc
7. Интактные

Фиг. 12

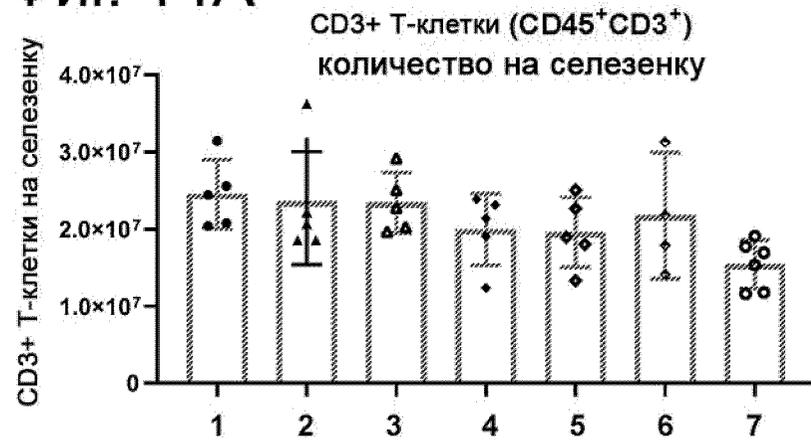


Фиг. 13

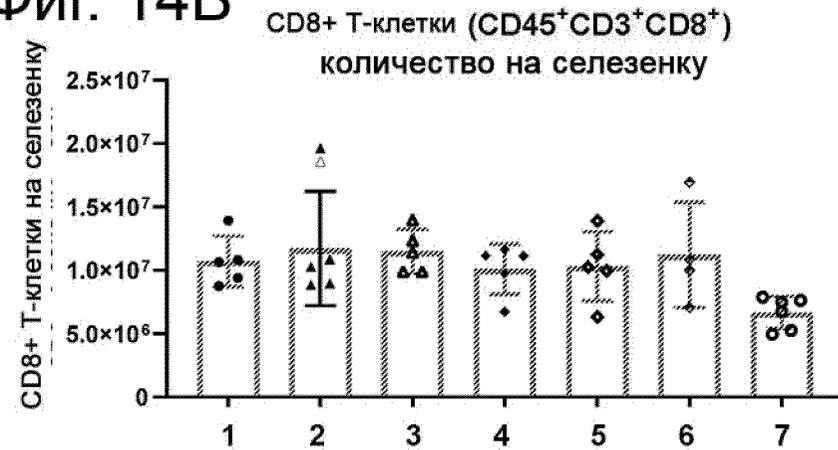


1. Fc-контроль
2. TACI 30-110 – Fc
3. TACI 13-118 – Fc
4. 26 TACI CRD2-Fc
5. 27 TACI CRD2-Fc
6. 29 TACI CRD2-Fc
7. Интактные

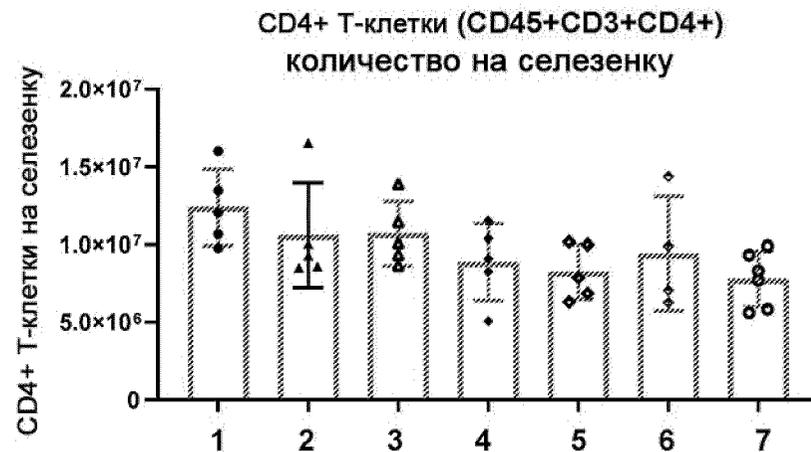
Фиг. 14А



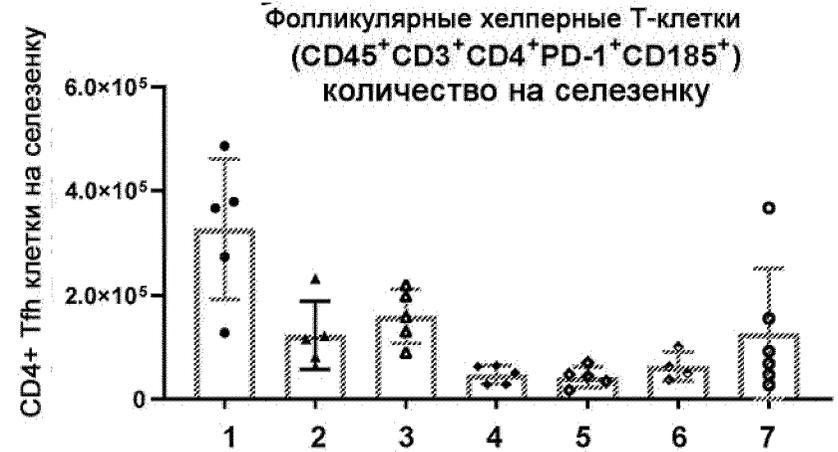
Фиг. 14В



Фиг. 14С

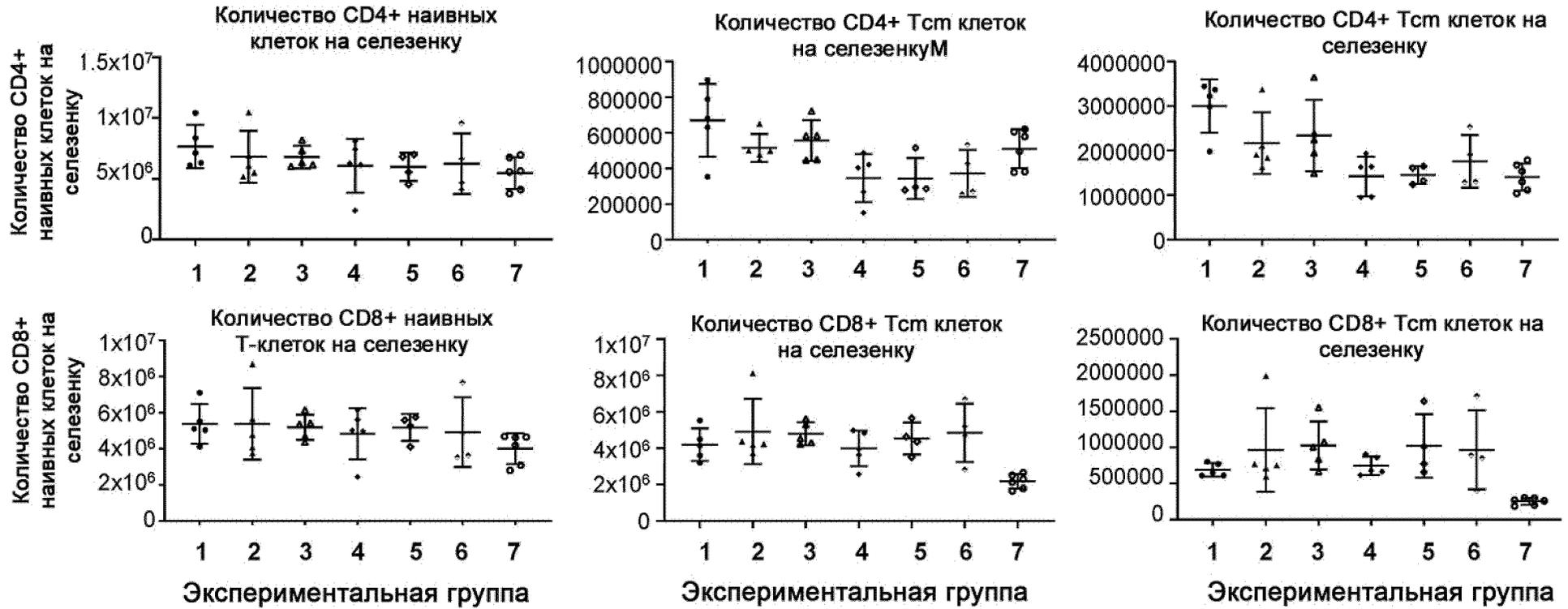


Фиг. 14Д



1. Fc-контроль
2. TACI 30-110 – Fc
3. TACI 13-118 – Fc
4. 26 TACI CRD2-Fc
5. 27 TACI CRD2-Fc
6. 29 TACI CRD2-Fc
7. Интактные

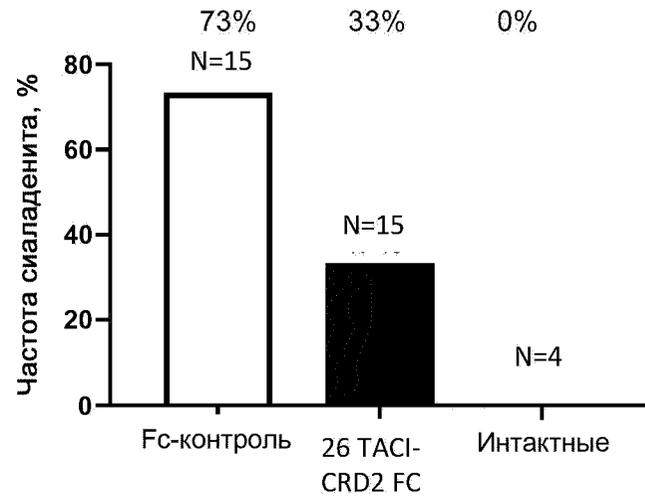
Фиг. 15



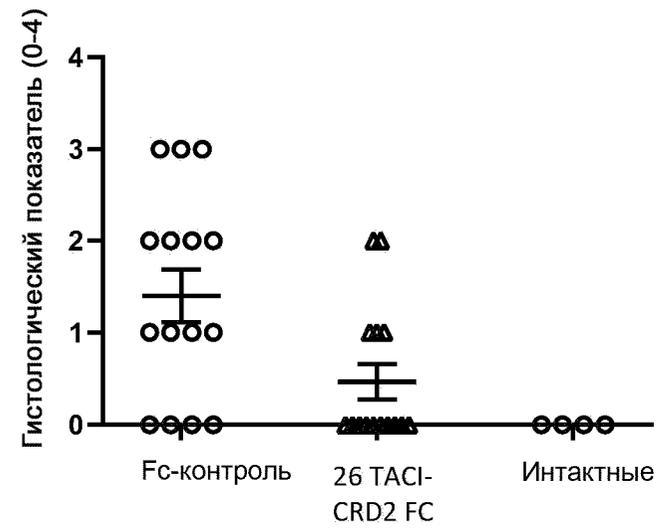
1. Fc-контроль
2. TACI 30-110 – Fc
3. TACI 13-118 – Fc
4. 26 TACI CRD2-Fc
5. 27 TACI CRD2-Fc
6. 29 TACI CRD2-Fc
7. Интактные

Количество CD4+ наивных Т-клеток на селезенку

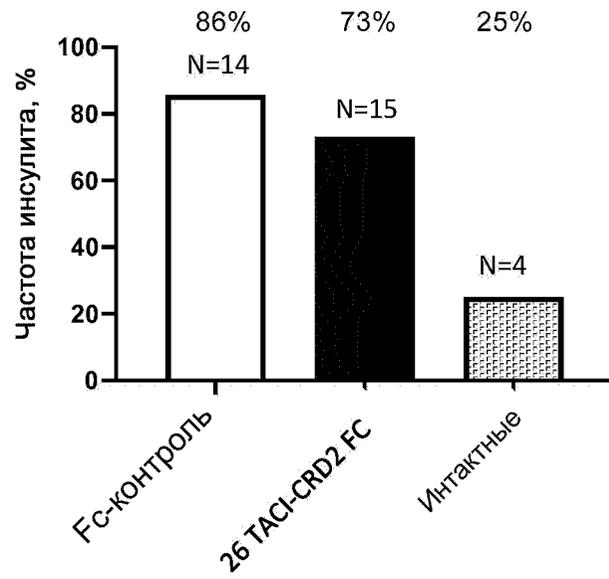
Фиг. 16А



Фиг. 16В



Фиг. 17А



Фиг. 17В

