

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202491148 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.08.28

(22) Дата подачи заявки  
2022.03.31

(51) Int. Cl. C07K 14/00 (2006.01)  
C07K 19/00 (2006.01)  
C12N 15/62 (2006.01)  
A61P 37/02 (2006.01)

(54) УСЕЧЕННЫЙ ПОЛИПЕПТИД TACI И ЕГО СЛИТЫЙ БЕЛОК И ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 202110348497.6

(32) 2021.03.31

(33) CN

(86) PCT/CN2022/084256

(87) WO 2022/206872 2022.10.06

(71) Заявитель:

ЦЗЯНСУ ХЭНЖУЙ  
ФАРМАСЬЮТИКАЛС КО.,  
ЛТД.; ШАНХАЙ ХЭНЖУЙ  
ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД. (CN)

(72) Изобретатель:

Мао Ланюнь, Ин Хуа, Цзинь Синьшэн,  
Ли Линлин, Тао Вэйкан (CN)

(74) Представитель:

Харин А.В., Стойко Г.В., Галухина  
Д.В., Буре Н.Н., Алексеев В.В. (RU)

(57) Настоящая заявка относится к усеченному полипептиду TACI и его слитому белку и применению. В частности, предложены полипептид TACI, представленный в SEQ ID NO: 8, его усеченный фрагмент, его мутированная последовательность и слитый белок, содержащий указанный полипептид TACI, и их применение.

A1

202491148

202491148

A1

## УСЕЧЕННЫЙ ПОЛИПЕПТИД ТАС1 И ЕГО СЛИТЫЙ БЕЛОК И ПРИМЕНЕНИЕ

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании патентной заявки Китая № 202110348497.6, поданной 31 марта 2021 года, которая включена в настоящий документ  
5 посредством ссылки в полном объеме.

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии и, в частности,  
относится к новому полипептиду ТАС1 и его слитому белку и применению.  
10

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Утверждения в данном разделе относятся только к общей информации, связанной с  
настоящим изобретением, и не обязательно составляют уровень техники.

Системная красная волчанка (СКВ) – это аутоиммунное заболевание, поражающее  
15 несколько органов. В развитии и прогрессировании СКВ участвуют различные клетки  
(Tsokos, G.C., et al., *Nat Rev Rheumatol*, 2016. 12: стр. 716-730; Larosa, M. et al., *Expert Rev  
Clin Immunol*, 2016. 12: стр. 1309-1320). Нейтрофилы высвобождают ретикулярную  
внеклеточную ловушку, которая захватывает антибактериальные белки и в сочетании с  
интерфероном стимулирует дендритные клетки к секреции большого количества  
20 интерферона I типа. Интерферон дополнительно активирует продуцирование миелоидными  
дендритными клетками различных цитокинов, которые активируют Т-клетки или В-клетки.  
IL-12 и IL-23 представляют собой два цитокина, которые, как известно, активируют  
дифференцировку Т-клеток. IL-12/IL-23 может стимулировать Т-клетки к секреции IL-17 и  
IL-21. IL-17 работает с цитокинами, секретируемыми макрофагами, такими как TNF и IL-6,  
25 для рекрутинга воспалительных клеток и повреждения тканей. Напротив, IL-21 может  
костимулировать В-клетки для участия в регуляции пролиферации В-клеток. BAFF является  
активатором В-клеток. BAFF стимулирует созревание и выживание В-клеток,  
взаимодействуя с рецепторами на поверхности В-клеток, и В-клетки в конечном итоге  
дифференцируются в плазматические клетки и секретируют аутоантитела под совместным  
30 действием нескольких цитокинов. Аутоантитела накапливаются вокруг различных тканей и  
органов, вызывая повреждение тканей и органов (Murphy, G. and D.A. Isenberg, *Nat Rev  
Rheumatol*, 2019. 15: стр. 403-412; Lam, N.C., M.V. Ghetu, and M.L. Bieniek, *Am Fam  
Physician*, 2016. 94: стр. 284-294).

IL-12 и IL-23 представляют собой два цитокина, которые принадлежат к одному и  
35 тому же семейству. И IL-12, и IL-23 представляют собой гетеродимерные белки, состоящие

из двух субъединиц (Moschen, A.R., H. Tilg, and T. Raine, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019. 16: стр. 185-196; Frieder, J., et al., *Clin Pharmacol Ther*, 2018. 103: стр. 88-101). IL-12 состоит из двух субъединиц, p35 и p40, тогда как IL-23 состоит из двух субъединиц, p19 и p40. p40 является общей для них субъединицей, поэтому антитела, нацеленные на p40, могут ингибировать сигнальные пути как IL-12, так и IL-23. IL-12 взаимодействует с рецепторами, в основном активируя дифференцировку клеток Th1, а также участвует в стимуляции секреции интерферона  $\gamma$  и TNF различными иммунными клетками. IL-23 взаимодействует с рецепторами, в основном активируя дифференцировку клеток Th17, и стимулирует секрецию цитокинов, таких как IL-17, IL-22 и TNF, различными клетками (Lee, E.B., et al., *Cutis*, 2018. 101: стр. 5-9; Floss, D.M., et al., *Cytokine Growth Factor Rev*, 2015. 26: стр. 569-578). Эти цитокины, продуцируемые активацией сигнального пути IL-12/IL-23, дополнительно участвуют в прогрессировании СКВ через их соответствующие пути.

TACI представляет собой мембраносвязанный рецептор с внеклеточной областью, содержащей два богатых цистеином псевдоповтора, трансмембранной областью и цитоплазматической областью, которая взаимодействует с SAML (лиганд циклофилина, модулирующий кальций). TACI ассоциирован с одним подтипом В-клеток и Т-клеток. Рецепторы TACI связываются с BAFF семейства лигандов фактора некроза опухоли. BAFF представляет собой активатор В-клеток, принадлежащий к семейству TNF. BAFF в основном экспрессируется на поверхности клеточной мембраны клеток костного мозга и существует в форме тримера. BAFF на поверхности клеточной мембраны гидролизуется протеазой с образованием растворимого BAFF, который поступает в систему кровообращения. Растворимый BAFF характеризуется мультимеризацией, и самая большая образуемая им структура представляет собой 60-мер. Кроме того, BAFF также может взаимодействовать с другим белком того же семейства, APRIL, с образованием гетеротримера. В настоящее время на поверхности В-клеток известны три рецептора BAFF, т. е. BAFF-R, BCMA и TACI. BAFF взаимодействует с этими тремя рецепторами и участвует в созревании дифференцировки, выживании и регуляции В-клеток. APRIL имеет два общих рецептора с BAFF, т. е. BCMA и TACI, и функционирует с этими двумя рецепторами, участвуя в выживании и регуляции В-клеток (Samy, E., et al., *Int Rev Immunol*, 2017. 36: стр. 3-19; Kamal, A. and M. Khamashta, *Autoimmun Rev*, 2014. 13: стр. 1094-1101). BAFF важен для поддержания гомеостаза В-клеток, а чрезмерная активация сигнального пути BAFF приводит к выживанию аутореактивных В-клеток и продукции аутоантител, которые способствуют аутоиммунным ответам (Cancro, M.P., D.P. D'Cruz, and M.A. Khamashta, *J Clin Invest*, 2009. 119: стр. 1066-73).

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Из-за наличия нескольких сайтов расщепления протеазой в последовательности TACI полноразмерный TACI очень восприимчив к расщеплению после экспрессии. Для решения проблемы расщепления TACI в настоящем изобретении разработан новый фрагмент последовательности TACI и заменены аминокислотные остатки в части положений для конструирования нового полипептида TACI и его слитого белка.

Согласно настоящему изобретению предложен полипептид TACI, который имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или представляет собой усеченный фрагмент SEQ ID NO: 8, или их вариант, где усеченный фрагмент содержит аминокислотные остатки в положениях 51-85 SEQ ID NO: 8, и вариант представляет собой вариант, имеющий одну или более аминокислотных замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 52, 53, 57, 65, 82 и 83 в SEQ ID NO: 8 или ее усеченном фрагменте, где положения для аминокислотных замен представляют собой положения аминокислотных остатков, пронумерованные в естественном порядке относительно последовательности SEQ ID NO: 8.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен полипептид TACI, который имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или представляет собой усеченный фрагмент SEQ ID NO: 8, или их вариант, где усеченный фрагмент содержит аминокислотные остатки в положениях 48-85 SEQ ID NO: 8, и вариант представляет собой вариант, имеющий одну или более аминокислотных замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 49, 52, 53, 57, 65, 82 и 83 в SEQ ID NO: 8 или ее усеченном фрагменте, где положения для аминокислотных замен представляют собой положения аминокислотных остатков, пронумерованные в естественном порядке относительно последовательности SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах осуществления предложен полипептид TACI, описанный выше, где усеченный фрагмент полипептида TACI содержит: аминокислотные остатки в положениях 48-86 SEQ ID NO: 8; аминокислотные остатки в положениях 48-87 SEQ ID NO: 8; или аминокислотные остатки в положениях 48-88 SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах осуществления усеченный фрагмент полипептида TACI содержит: аминокислотные остатки в положениях 50-85 SEQ ID NO: 8; или аминокислотные остатки в положениях 49-85 SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах осуществления полипептид TACI, описанный выше, имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления предложен полипептид TACI, который имеет

последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или представляет собой вариант усеченного фрагмента (например, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 15) SEQ ID NO: 8, где вариант представляет собой вариант, имеющий любые 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислотных замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из 5 положений 49, 52, 53, 57, 65, 82 и 83 в последовательности SEQ ID NO: 8 или ее усеченном фрагменте, где положения для аминокислотных замен представляют собой положения аминокислотных остатков, пронумерованные в естественном порядке относительно последовательности SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах осуществления предложен полипептид TACI, описанный 10 выше, где вариант полипептида TACI представляет собой вариант, имеющий одну или более аминокислотных замен (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислотных замен), выбранных из группы, состоящей из 49T или 49R, 52S, 53E или 53Q, 57E, 65T или 65A, 82A или 82R, и 83Y в последовательности SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 15, где положения для аминокислотных замен представляют собой 15 положения аминокислотных остатков, пронумерованные в естественном порядке относительно последовательности SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида TACI представляет собой вариант, имеющий одну или более аминокислотных замен (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислотных замен), выбранных из группы, состоящей из 49T или 49R, 52S, 53E 20 или 53Q, 57E, 65T или 65A, 82A или 82R, и 83Y в последовательности SEQ ID NO: 68, где положения для аминокислотных замен представляют собой положения аминокислотных остатков, пронумерованные в естественном порядке относительно последовательности SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида TACI представляет 25 собой вариант, имеющий одну или более аминокислотных замен (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотных замен), выбранных из группы, состоящей из 52S, 53E или 53Q, 57E, 65T или 65A, 82A или 82R, и 83Y, в последовательности SEQ ID NO: 69 или SEQ ID NO: 70, где положения для аминокислотных замен представляют собой положения аминокислотных остатков, пронумерованные в естественном порядке относительно последовательности 30 SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида TACI, описанный выше, выбран из группы, состоящей из:

варианта, имеющего любую аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из 49T, 52S, 53E, 53Q, 57E и 82A в последовательности SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 15;

35 варианта, имеющего аминокислотные замены 49R и 65T в последовательности SEQ

ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 15;

варианта, имеющего аминокислотные замены 49R и 65A в последовательности SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 15;

5 варианта, имеющего аминокислотные замены 49R, 65T и 82R в последовательности SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 15;

варианта, имеющего аминокислотные замены 53E и 57E в последовательности SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 15;

варианта, имеющего аминокислотные замены 52S, 53E и 57E в последовательности SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 15;

10 варианта, имеющего аминокислотные замены 49T и 82A в последовательности SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 15;

варианта, имеющего аминокислотные замены 49T и 83Y в последовательности SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 15;

15 варианта, имеющего аминокислотные замены 49T, 82A и 83Y в последовательности SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 15; или

варианта, имеющего аминокислотные замены 49T, 53E, 57E и 82A в последовательности SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 15;

20 где положения для аминокислотных замен, описанных выше, представляют собой положения аминокислотных остатков, пронумерованные в естественном порядке относительно последовательности SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида TACI, описанный выше, выбран из группы, состоящей из:

25 варианта, имеющего любую аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из 49T, 52S, 53E, 53Q, 57E и 82A в последовательности SEQ ID NO: 68;

варианта, имеющего любую аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из 52S, 53E, 53Q, 57E и 82A в последовательности SEQ ID NO: 69 или SEQ ID NO: 70;

30 варианта, имеющего аминокислотные замены 49R и 65T в последовательности SEQ ID NO: 68;

варианта, имеющего аминокислотные замены 49R и 65A в последовательности SEQ ID NO: 68;

варианта, имеющего аминокислотные замены 49R, 65T и 82R в последовательности SEQ ID NO: 68;

35 варианта, имеющего аминокислотные замены 53E и 57E в последовательности SEQ

ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 или SEQ ID NO: 70;

варианта, имеющего аминокислотные замены 52S, 53E и 57E в последовательности SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 или SEQ ID NO: 70;

5 варианта, имеющего аминокислотные замены 49T и 82A в последовательности SEQ ID NO: 68;

варианта, имеющего аминокислотные замены 49T и 83Y в последовательности SEQ ID NO: 68;

варианта, имеющего аминокислотные замены 49T, 82A и 83Y в последовательности SEQ ID NO: 68; или

10 варианта, имеющего аминокислотные замены 49T, 53E, 57E и 82A в последовательности SEQ ID NO: 68;

где положения для аминокислотных замен, описанных выше, представляют собой положения аминокислотных остатков, пронумерованные в естественном порядке относительно последовательности SEQ ID NO: 8.

15 В некоторых вариантах осуществления предложен полипептид TACI, описанный выше, который имеет последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13-15 и SEQ ID NO: 18-35. В некоторых вариантах осуществления предложен полипептид TACI, описанный выше, который имеет последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 68-70.

20 В некоторых вариантах осуществления полипептид TACI, описанный выше, имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 35.

25 В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен слитый белок TACI, который содержит полипептид TACI согласно любому из описанных выше вариантов осуществления.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен слитый белок TACI, который содержит полипептид TACI согласно любому из описанных выше вариантов осуществления (например, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 35) и дополнительно содержит константную область иммуноглобулина.

30 В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TACI, описанный выше, который содержит: любой из полипептидов TACI, описанных выше; и Fc-область. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит первую субъединицу и вторую субъединицу, где первая субъединица и вторая субъединица Fc-области могут быть одинаковыми или разными.

35 В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TACI, описанный

выше, где Fc-область содержит две субъединицы, способные связываться друг с другом. В некоторых вариантах осуществления указанные две субъединицы представляют собой первую субъединицу и вторую субъединицу, которые являются одинаковыми или разными. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой Fc-область IgG; в некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой Fc-область человеческого IgG1.

В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TACI, описанный выше, где Fc-область, описанная выше, содержит одну или более аминокислотных замен, где аминокислотные замены способны снижать связывание Fc-области с Fc-рецептором по сравнению с Fc-областью дикого типа; в некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены, описанные выше, способны снижать связывание Fc-области с Fc $\gamma$ -рецептором; в некоторых вариантах осуществления Fc-область имеет мутацию YTE (M252Y, S254T и T256E), мутации L234A и L235A и/или мутацию S228P, где положения мутаций пронумерованы в соответствии с индексом EU.

В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TACI, описанный выше, где Fc-область, описанная выше, содержит первую субъединицу и вторую субъединицу, способные связываться друг с другом, где первая субъединица и вторая субъединица содержат одну или более аминокислотных замен для снижения гомодимеризации. В некоторых вариантах осуществления первая субъединица имеет структуру выпуклости в соответствии с методикой «выступ-во-впадину», и вторая субъединица имеет структуру полости в соответствии с методикой «выступ-во-впадину», или первая субъединица имеет структуру полости в соответствии с методикой «выступ-во-впадину», и вторая субъединица имеет структуру выпуклости в соответствии с методикой «выступ-во-впадину». В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены первой субъединицы включают одну или более аминокислотных замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 354, 356, 358, 366, 394, 405 и 407, и аминокислотные замены второй субъединицы включают одну или более аминокислотных замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 349, 356, 358, 366, 368, 407, 394 и 405. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены первой субъединицы включают одну или более аминокислотных замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 354, 356, 358 и 366, и аминокислотные замены второй субъединицы включают одну или более аминокислотных замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 349, 356, 358, 366, 368 и 407. В некоторых вариантах осуществления первая субъединица содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из 354C, 356E, 358M и 366W, и вторая субъединица

содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из 349С, 356Е, 358М, 366S, 368А и 407V. В некоторых вариантах осуществления первая субъединица содержит аминокислотные замены 354С, 356Е, 358М и 366W, и вторая субъединица содержит аминокислотные замены 349С, 356Е, 358М, 366S, 368А и 407V.

5 В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TACI, описанный выше, где Fc-область, описанная выше, имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62 или SEQ ID NO: 63, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62 или SEQ ID NO: 63. В  
10 некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TACI, описанный выше, где первая субъединица и вторая субъединица Fc-области, описанной выше, являются одинаковыми и имеют последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62 или SEQ ID NO: 63.

В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TACI согласно  
15 любому из описанных выше вариантов осуществления, где каждая из молекул слитого белка TACI содержит 1, 2, 3 или 4 BAFF-связывающих домена и Fc-область. В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TACI, где каждая из молекул слитого белка TACI содержит 2 полипептида TACI и Fc-область. В некоторых вариантах осуществления каждая из молекул слитого белка TACI содержит 4 полипептида TACI и Fc-  
20 область.

В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TACI согласно  
любому из описанных выше вариантов осуществления, где полипептид TACI связан с одной субъединицей Fc-области в любом порядке. В некоторых вариантах осуществления полипептид TACI связан с первой субъединицей или второй субъединицей Fc-области  
25 посредством линкера или непосредственно связан с первой субъединицей или второй субъединицей Fc-области. В некоторых вариантах осуществления С-конец полипептида TACI связан с N-концом первой субъединицы или второй субъединицы Fc-области посредством линкера или непосредственно; или N-конец полипептида TACI связан с С-концом первой субъединицы или второй субъединицы Fc-области посредством линкера или  
30 непосредственно.

В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TACI, описанный выше, который представляет собой димерный белок и содержит полипептидную цепь, выбранную из группы, состоящей из полипептидных цепей, представленных в a, b и c:

a. от N-конца к С-концу: [полипептид TACI]-[линкер]-[субъединица Fc-области];

35 b. от N-конца к С-концу: [субъединица Fc-области]-[линкер]-[полипептид TACI]; и

с. от N-конца к С-концу: [полипептид TAC1 1]-[линкер 1]-[субъединица Fc-области]-  
[линкер 2]-[полипептид TAC1 2], где линкер 1 и линкер 2 могут быть одинаковыми или  
разными, и полипептид TAC1 1 и полипептид TAC1 2 могут быть одинаковыми или разными;  
субъединица Fc-области представляет собой первую субъединицу или вторую субъединицу  
5 Fc-области.

В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TAC1, описанный  
выше, где линкер представляет собой линкер, представленный в SEQ ID NO: 64, или линкер  
выбран из группы, состоящей из линкера  $(G_xS)_y$ , где X представляет собой целое число,  
выбранное из группы, состоящей из 1-5, и Y представляет собой целое число, выбранное из  
10 группы, состоящей из 0-6. Когда Y равен 0, это означает, что линкер представляет собой  
связь, и полипептид TAC1 непосредственно связан с субъединицей Fc-области посредством  
связи. В некоторых вариантах осуществления предложен линкер  $(G_xS)_y$ , где X представляет  
собой целое число от 1 до 5 (например, X представляет собой 4), и Y представляет собой  
целое число, выбранное из группы, состоящей из 1-6 (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6). В  
15 некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой линкер, представленный в  
SEQ ID NO: 65 или SEQ ID NO: 66.

В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TAC1, описанный  
выше, который содержит 2 одинаковые полипептидные цепи. В некоторых вариантах  
осуществления слитый белок TAC1, описанный выше, содержит 2 одинаковых полипептида,  
20 представленных в любой из SEQ ID NO: 36-44, или полипептидную цепь, содержащую  
аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%,  
98% или 99% идентичностью любой из последовательностей SEQ ID NO: 36-44.

В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TAC1, описанный  
выше, который представляет собой слитый белок TAC1 и антитела и содержит полипептид  
25 TAC1 и антитело (далее также называемый слитым белком TAC1 и антитела), где  
полипептид TAC1 представляет собой полипептид TAC1 согласно любому из описанных  
выше вариантов осуществления, и антитело представляет собой антитело к IL23, антитело  
к IL12 или антитело к субъединице p40 IL23/IL12.

В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TAC1 и антитела,  
30 описанный выше, который содержит полипептид TAC1 и антитело к субъединице p40  
IL23/IL12 (субъединица p40 представляет собой субъединицу, общую для IL23 и IL12).

В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TAC1 и антитела,  
описанный выше, который содержит полипептид TAC1 согласно любому из описанных  
выше вариантов осуществления и антитело. В некоторых вариантах осуществления  
35 антитело представляет собой антитело к IL23, антитело к IL12 или антитело к субъединице

p40 IL23/IL12.

В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TAC1 и антитела, описанный выше, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 54, соответственно, и вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 51, соответственно. Области CDR определены в соответствии со схемой нумерации Kabat.

В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TAC1 и антитела, описанный выше, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 45, и вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 46.

В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TAC1 и антитела, описанный выше, где антитело содержит константную область тяжелой цепи антитела и константную область легкой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи выбрана из группы, состоящей из константных областей человеческого IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и константная область легкой цепи выбрана из группы, состоящей из константных областей  $\kappa$ - и  $\lambda$ -цепи человеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TAC1 и антитела, где константная область тяжелой цепи антитела содержит одну или более аминокислотных замен, причем аминокислотные замены способны снижать связывание константной области тяжелой цепи с Fc-рецептором. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены, описанные выше, способны снижать связывание константной области тяжелой цепи с Fc $\gamma$ -рецептором. В некоторых вариантах осуществления Fc-область имеет мутацию YTE (M252Y, S254T и T256E), мутации L234A и L235A и/или мутацию S228P, где мутации пронумерованы в соответствии с индексом EU. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи антитела, описанная выше, содержит первую субъединицу и вторую субъединицу, способные связываться друг с другом, где первая субъединица и вторая субъединица содержат одну или более аминокислотных замен для снижения гомодимеризации. В некоторых вариантах осуществления первая субъединица имеет структуру выпуклости в соответствии с методикой «выступ-во-впадину», и вторая субъединица имеет структуру полости в соответствии с методикой «выступ-во-впадину», или первая субъединица имеет структуру полости в соответствии с методикой «выступ-во-впадину», и вторая субъединица имеет структуру выпуклости в соответствии с методикой «выступ-во-впадину». В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены

первой субъединицы включают одну или более аминокислотных замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 354, 356, 358 и 366, и аминокислотные замены второй субъединицы включают одну или более аминокислотных замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 349, 356, 358, 366, 368 и 407.

5 В некоторых вариантах осуществления первая субъединица содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из 354С, 356Е, 358М и 366W, и вторая субъединица содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из 349С, 356Е, 358М, 366S, 368А и 407V. В некоторых вариантах осуществления первая субъединица содержит аминокислотные замены 354С, 356Е, 358М и  
10 366W, и вторая субъединица содержит аминокислотные замены 349С, 356Е, 358М, 366S, 368А и 407V.

В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TAC1 и антитела, описанный выше, где антитело содержит тяжелую цепь, обладающую по меньшей мере 85% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 47, и легкую цепь, обладающую по  
15 меньшей мере 85% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 48; в некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO: 47, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO: 48.

В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TAC1 и антитела, описанный выше, где полипептид TAC1 связан с тяжелой цепью или легкой цепью антитела  
20 непосредственно или посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления С-конец полипептида TAC1 связан с N-концом тяжелой или легкой цепи антитела посредством линкера; в некоторых вариантах осуществления N-конец полипептида TAC1 связан с С-концом тяжелой или легкой цепи антитела посредством линкера; в некоторых вариантах осуществления С-конец полипептида TAC1 непосредственно связан с N-концом тяжелой  
25 или легкой цепи антитела; в некоторых вариантах осуществления N-конец полипептида TAC1 непосредственно связан с С-концом тяжелой или легкой цепи антитела.

В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TAC1 и антитела, описанный выше, где каждая из молекул слитого белка TAC1 и антитела содержит 1, 2, 3, 4 или более полипептидов TAC1. В некоторых вариантах осуществления предложен слитый  
30 белок TAC1 и антитела, где каждая из молекул слитого белка TAC1 и антитела содержит 1 полипептид TAC1. В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TAC1 и антитела, где каждая из молекул слитого белка TAC1 и антитела содержит 2 полипептида TAC1. В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TAC1 и антитела, где каждая из молекул слитого белка TAC1 и антитела содержит 3 полипептида TAC1. В  
35 некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TAC1 и антитела, где каждая

из молекул слитого белка TAC1 и антитела содержит 4 полипептида TAC1.

В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TAC1 и антитела, где для полипептида TAC1 N-конец по меньшей мере одного из полипептидов TAC1 связан с С-концом тяжелой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TAC1 и антитела, где N-конец по меньшей мере одного из полипептидов TAC1 связан с С-концом легкой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TAC1 и антитела, где С-конец по меньшей мере одного из полипептидов TAC1 связан с N-концом тяжелой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TAC1 и антитела, где С-конец по меньшей мере одного из полипептидов TAC1 связан с N-концом легкой цепи антитела.

В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TAC1 и антитела, описанный выше, который содержит полипептидную цепь, описанную в d или e ниже:

d. первую полипептидную цепь, содержащую [тяжелую цепь антитела]-[линкер]-[полипептид TAC1], от N-конца к С-концу, и

вторую полипептидную цепь, представляющую собой легкую цепь антитела; где тяжелая и легкая цепи антитела образуют антигенсвязывающий сайт;

e. первую полипептидную цепь, содержащую [тяжелую цепь антитела]-[линкер]-[полипептид TAC1], от N-конца к С-концу, и

вторую полипептидную цепь, содержащую [полипептид TAC1]-[линкер]-[легкую цепь антитела], где линкер может присутствовать или не присутствовать; тяжелая и легкая цепи антитела образуют антигенсвязывающий сайт.

В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TAC1 и антитела, описанный выше, где линкер может быть выбран из группы, состоящей из линкера (GxS)<sub>Y</sub>, где X представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1-5, и Y представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 0-6. Когда Y равен 0, это означает, что линкер представляет собой связь, и полипептид TAC1 непосредственно связан с субъединицей Fc-области посредством связи. В некоторых вариантах осуществления X представляет собой целое число от 1 до 5 (например, X представляет собой 4), и Y представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1-6 (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6). В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой линкер, представленный в SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66 или SEQ ID NO: 67. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой мышинное антитело, химерное антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело.

В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TAC1 и антитела, описанный выше, который содержит две одинаковые первые полипептидные цепи,

представленные в SEQ ID NO: 55, и две одинаковые вторые полипептидные цепи, представленные в SEQ ID NO: 56. В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TAC1 и антитела, описанный выше, который содержит две одинаковые первые полипептидные цепи, представленные в SEQ ID NO: 57, и две одинаковые вторые полипептидные цепи, представленные в SEQ ID NO: 58.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая полипептид TAC1 или слитый белок TAC1, описанные выше, и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или эксципиентов.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена выделенная молекула нуклеиновой кислоты (полинуклеотид), кодирующая полипептид TAC1 или слитый белок TAC1 согласно любому из описанных выше вариантов осуществления.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, описанную выше (ДНК или РНК).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, описанную выше.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии, описанный выше.

Из клетки-хозяина, предложенной в настоящем изобретении, не может развиваться животное или растение.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения или облегчения В-клеточного расстройства или аутоиммунного заболевания, включающий стадию введения субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества полипептида TAC1, слитого белка TAC1 или фармацевтической композиции согласно любому из описанных выше вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления В-клеточное расстройство или аутоиммунное заболевание представляет собой заболевание или патологическое состояние, связанное с экспрессией TAC1. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из системной красной волчанки, миастении гравис, рассеянного склероза, инсулинозависимого сахарного диабета, болезни Крона, ревматоидного артрита, полиартрикулярного ювенильного ревматоидного артрита и псориатического артрита; В-клеточное расстройство выбрано из группы, состоящей из опухолей, хронического лейкоцитарного лейкоза, множественной миеломы, неходжкинской лимфомы,

посттрансплантационного лимфопролиферативного расстройства и гаммапатии легких цепей. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное заболевание представляет собой системную красную волчанку.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложено  
5 применение полипептида TACI, слитого белка TACI, молекулы нуклеиновой кислоты или фармацевтической композиции согласно любому из описанных выше вариантов осуществления для получения лекарственного средства для лечения или предупреждения  
заболевания. Согласно настоящему изобретению также предложен полипептид TACI, слитый белок TACI, молекула нуклеиновой кислоты или фармацевтическая композиция  
10 согласно любому из описанных выше вариантов осуществления для применения при лечении или предупреждении заболевания. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой В-клеточное расстройство или аутоиммунное заболевание. В некоторых вариантах осуществления В-клеточное расстройство или аутоиммунное заболевание представляет собой заболевание или патологическое состояние, связанное с  
15 экспрессией TACI. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из системной красной волчанки, миастении гравис, рассеянного склероза, инсулинозависимого сахарного диабета, болезни Крона, ревматоидного артрита, полиартикулярного ювенильного ревматоидного артрита и псориатического артрита; В-клеточное расстройство выбрано из группы, состоящей из  
20 опухолей, хронического лейкоцитарного лейкоза, множественной миеломы, неходжкинской лимфомы, посттрансплантационного лимфопролиферативного расстройства и гаммапатии легких цепей. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное заболевание представляет собой системную красную волчанку.

В другом аспекте настоящего изобретения также предложен полипептид TACI,  
25 слитый белок TACI, молекула нуклеиновой кислоты или композиция согласно любому из описанных выше вариантов осуществления для применения в качестве лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство применяют для лечения В-клеточного расстройства или аутоиммунного заболевания. В некоторых вариантах осуществления В-клеточное расстройство или аутоиммунное заболевание  
30 представляет собой заболевание или патологическое состояние, связанное с экспрессией TACI. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из системной красной волчанки, миастении гравис, рассеянного склероза, инсулинозависимого сахарного диабета, болезни Крона, ревматоидного артрита, полиартикулярного ювенильного ревматоидного артрита и псориатического артрита; В-  
35 клеточное расстройство выбрано из группы, состоящей из опухолей, хронического

лейкоцитарного лейкоза, множественной миеломы, неходжкинской лимфомы, посттрансплантационного лимфопролиферативного расстройства и гаммапатии легких цепей. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное заболевание представляет собой системную красную волчанку.

5

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

ФИГ. 1: схематическая структурная схема слитого белка ТАС1 (N-концевого слитого белка ТАС1 с Fc второго порядка, т. е. слитого белка, содержащего два полипептида ТАС1, где N-конец каждой из первой субъединицы и второй субъединицы Fc-области связан с одним полипептидом ТАС1).

10

ФИГ. 2: схематическая структурная схема слитого белка ТАС1 (слитого белка ТАС1 с Fc четвертого порядка, т. е. слитого белка, содержащего 4 полипептида ТАС1, где N-конец и C-конец каждой из первой субъединицы и второй субъединицы Fc-области связан с одним полипептидом ТАС1).

15

ФИГ. 3: схематическая структурная схема слитого белка ТАС1 (C-концевого слитого белка ТАС1 с Fc второго порядка, т. е. слитого белка, содержащего два полипептида ТАС1, где C-конец каждой из первой субъединицы и второй субъединицы Fc-области связан с одним полипептидом ТАС1).

20

ФИГ. 4: схематическая структурная схема слитого белка ТАС1 и антитела (C-концевого слитого белка ТАС1 с тяжелыми цепями антитела второго порядка, т. е. слитого белка, содержащего два полипептида ТАС1, где C-конец каждой из двух тяжелых цепей связан с одним полипептидом ТАС1).

25

ФИГ. 5: схематическая структурная схема слитого белка ТАС1 и антитела (слитого белка ТАС1 с N-концом легкой цепи и C-концом тяжелой цепи антитела четвертого порядка, т. е. слитого белка, содержащего 4 полипептида ТАС1, где C-конец каждой из двух тяжелых цепей связан с одним полипептидом ТАС1, и N-конец каждой из двух легких цепей связан с одним полипептидом ТАС1).

30

ФИГ. 6: результаты эксперимента по блокированию связывания ВАFF с ВАFF-R слитыми белками ТАС1 и антитела.

30

ФИГ. 7: результаты эксперимента по ингибированию секреции IFN $\gamma$  слитыми белками ТАС1 и антитела.

ФИГ. 8: результаты эксперимента по ингибированию секреции IgA слитыми белками ТАС1 и антитела.

35

ФИГ. 9: результаты эксперимента по ингибированию секреции IL-22 слитыми белками ТАС1 и антитела.

ФИГ. 10: результаты эксперимента по ингибированию секреции TNF $\alpha$  слитыми белками TAC1 и антитела.

ФИГ. 11: результаты оценки патологии почек для слитых белков TAC1 и антитела в фармакодинамическом эксперименте на моделях СКВ.

5 ФИГ. 12: результаты анализа белка в моче для слитых белков TAC1 и антитела в фармакодинамическом эксперименте на моделях СКВ.

ФИГ. 13: результаты анализа IgG к дцДНК для слитых белков TAC1 и антитела в фармакодинамическом эксперименте на моделях СКВ.

## 10 ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

### Термины

Для облегчения понимания настоящего изобретения ниже описаны некоторые технические и научные термины. Если в настоящем документе конкретно не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют те же значения, которые обычно используются специалистом в данной области техники.

15 В контексте описания и формулы изобретения формы единственного числа включают в себя термины во множественном числе, если из контекста однозначно не следует иное.

Если из контекста однозначно не следует иное, во всем описании и формуле изобретения слова «содержать», «иметь», «включать» и тому подобное следует толковать во всеобъемлющем смысле, а не в исключительном или исчерпывающем смысле.

Термин «цитокин» является общим термином для белков, высвобождаемых популяцией клеток и действующих на другие клетки как медиаторы межклеточных взаимодействий. Примеры таких цитокинов включают лимфокины, монокины, хемокины и традиционные полипептидные гормоны. Примеры цитокинов включают: IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF $\alpha$ , IL-17 и IL-5.

20 TAC1, описанный в настоящем документе, представляет собой мембраносвязанный рецептор, и TAC1 человека дикого типа содержит внеклеточную область, содержащую два богатых цистеином псевдоповтора, трансмембранную область и цитоплазматическую область, которая взаимодействует с CAML (лиганд циклофилина, модулирующий кальций). Внеклеточная область (положения 1-165) TAC1 человека дикого типа представлена в SEQ ID NO: 1.

«Внеклеточный домен TAC1» и «внеклеточная область TAC1» в настоящем документе используются взаимозаменяемо.

35 Термин «и/или» предназначен для включения двух значений, «и» и «или». Например,

подразумевается, что выражение «А, В и/или С» охватывает каждое из следующего: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно); и С (отдельно).

5 Трехбуквенные коды и однобуквенные коды для аминокислот, используемые в настоящем документе, соответствуют описанным в *J. biol. chem*, 243, p3558 (1968).

Термин «аминокислота» относится к природным и синтетическим аминокислотам, а также аналогам и миметикам аминокислот, функция которых схожа с природными аминокислотами. Встречающиеся в природе аминокислоты представляют собой аминокислоты, кодируемые генетическим кодом, и те аминокислоты, которые позже  
10 модифицируются, например, гидроксипролину,  $\gamma$ -карбоксихлутаминовой кислоте и О-фосфосерину. Аналоги аминокислот относятся к соединениям, которые имеют по существу одинаковую химическую структуру (т. е.  $\alpha$ -углерод, который связан с водородом, карбоксильной, амина- и R-группой) с встречающимися в природе аминокислотами, например, гомосерину, норлейцину, сульфоксиду метионина и метионинметилсульфонию.  
15 Такие аналоги имеют модифицированную R-группу (например, норлейцин) или модифицированный пептидный скелет, но сохраняют по существу одинаковую химическую структуру с встречающимися в природе аминокислотами. Миметики аминокислот относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, отличную от общей химической структуры аминокислот, но функционируют аналогично встречающимся в  
20 природе аминокислотам.

Термин «аминокислотная мутация» включает аминокислотные замены (также известные как замены аминокислот), делеции, инсерции и модификации. Для получения конечной конструкции может быть выполнена любая комбинация замен, делеций, инсерций и модификаций, при условии, что конечная конструкция обладает желаемыми свойствами,  
25 такими как сниженное связывание с Fc-рецептором. Делеции и инсерции аминокислотной последовательности включают делеции и инсерции на аминоконце и/или карбоксильном конце полипептидной цепи. Конкретные аминокислотные мутации могут представлять собой аминокислотные замены. В одном варианте осуществления аминокислотная мутация представляет собой неконсервативную аминокислотную замену, т. е. замену одной  
30 аминокислоты другой аминокислотой, имеющей другие структурные и/или химические свойства. Аминокислотные замены включают замену не встречающимся в природе аминокислотами или производными 20 нативных аминокислот (например, 4-гидроксипролин, 3-метилгистидин, орнитин, гомосерин и 5-гидроксилизин). Аминокислотные мутации могут быть получены с использованием генетических или  
35 химических методов, хорошо известных в данной области техники. Генетические методы

могут включать сайт-направленный мутагенез, ПЦР (полимеразная цепная реакция), синтез генов и тому подобное. Предполагается, что также могут быть использованы способы изменения групп боковых цепей аминокислот, отличные от геновой инженерии, такие как химическая модификация. В настоящем документе могут быть использованы различные выражения для обозначения одной и той же аминокислотной мутации. В настоящем документе выражение «положение + аминокислотный остаток» может быть использовано для обозначения аминокислотного остатка в определенном положении. Например, 366W обозначает, что аминокислотный остаток в положении 366 представляет собой W. T366W обозначает, что аминокислотный остаток в положении 366 мутирован из исходного T в W.

10 Термин «антитело» используется в самом широком смысле и охватывает различные структуры антител, включая, не ограничиваясь перечисленным, моноклональные антитела, поликлональные антитела; моноспецифические антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и полноразмерные антитела и фрагменты антител (или антигенсвязывающие фрагменты, или антигенсвязывающие части), при условии, что  
15 они проявляют желаемую антигенсвязывающую активность. «Нативное антитело» относится встречающейся в природе молекуле иммуноглобулина. Например, нативное антитело IgG представляет собой гетеротетрамерный гликопротеин массой около 150000 Дальтон, состоящий из двух одинаковых легких цепей и двух одинаковых тяжелых цепей, связанных дисульфидной связью. От N-конца к C-концу каждая тяжелая цепь имеет одну  
20 переменную область (VH), также известную как переменный тяжелый домен или переменная область тяжелой цепи, за которой следуют константные области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи нативного IgG обычно содержит три константных домена (CH1, CH2 и CH3). Аналогичным образом, от N-конца к C-концу каждая легкая цепь имеет одну переменную область (VL), также известную как переменный легкий домен  
25 или переменный домен легкой цепи, за которой следует один константный домен легкой цепи (константная область легкой цепи, CL). Термины «полноразмерное антитело», «интактное антитело» и «целое антитело» в настоящем документе являются взаимозаменяемыми и относятся к антителу, структура которого по существу аналогична структуре нативного антитела, или которое содержит тяжелые цепи в Fc-области, как  
30 определено в настоящем документе. В нативном интактном антителе легкая цепь содержит переменную область легкой цепи VL и константную область CL, где VL расположена на аминоконце легкой цепи, а константная область легкой цепи содержит  $\kappa$ -цепь и  $\lambda$ -цепь; тяжелая цепь содержит переменную область VH и константные области (CH1, CH2 и CH3), где VH расположена на аминоконце тяжелой цепи, а константные области  
35 расположены на карбоксильном конце, где CH3 находится ближе всего к карбоксильному

концу полипептида, и тяжелая цепь может быть любого изотипа, включая IgG (включая подтипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgA (включая подтипы IgA1 и IgA2), IgM и IgE.

Термин «вариабельная область» или «вариабельный домен» антитела относится к домену в тяжелой или легкой цепи антитела, участвующему в связывании антитела с антигеном. В настоящем документе каждая вариабельная область тяжелой цепи (VH) и вариабельная область легкой цепи (VL) антитела содержит четыре консервативные каркасные области (FR) и три определяющие комплементарность области (CDR). Термин «определяющая комплементарность область» или «CDR» относится к области в вариабельном домене, которая в первую очередь способствует связыванию антигена; «каркас» или «FR» относится к остаткам вариабельного домена, отличным от остатков CDR. VH содержит 3 области CDR: HCDR1, HCDR2 и HCDR3; VL содержит 3 области CDR: LCDR1, LCDR2 и LCDR3. Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца (также известного как N-конец) к карбоксильному концу (также известному как C-конец) в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

Границы аминокислотных последовательностей CDR могут быть определены с использованием различных хорошо известных схем, включая схему нумерации «Kabat» (см. Kabat et al. (1991), “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, 5<sup>th</sup> ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD), схему нумерации «Chothia», схему нумерации «ABM», «контактную» схему нумерации (см. Martin, ACR. Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains[J]. 2001) и схему нумерации ImMunoGenTics (IMGT) (Lefranc, M.P. et al., *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55-77 (2003); *Front Immunol.* 2018 Oct 16; 9: 2278), и т. п. Соответствующие взаимосвязи между различными схемами нумерации хорошо известны специалистам в данной области техники и являются иллюстративными, как показано в таблице 1 ниже.

Таблица 1. Взаимосвязи между схемами нумерации CDR

CDR	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Контактная
HCDR1	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
HCDR2	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58
HCDR3	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101
LCDR1	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36
LCDR2	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55
LCDR3	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

Если не указано иное, к последовательностям вариабельных областей и CDR в

настоящем документе применяется схема нумерации «Kabat».

Термин «фрагмент антитела» относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит фрагмент интактного антитела, который связывается с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, не ограничиваясь перечисленным, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, однодоменные антитела, одноцепочечные Fab (scFab), диатела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител (например, scFv) и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Термин «Fc-область» или «область кристаллизуемого фрагмента» используется для определения C-концевой области тяжелой цепи антитела, включая нативные Fc-области и модифицированные Fc-области. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит две субъединицы, которые могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах осуществления Fc-область тяжелой цепи человеческого IgG определена как проходящая от аминокислотного остатка в положении Cys226 или от Pro230 до его карбоксильного конца. Подходящие Fc-области, используемые для антител, описанных в настоящем документе, включают Fc-области человеческого IgG1, IgG2 (IgG2A и IgG2B), IgG3 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления границы Fc-области также могут быть изменены, например, путем делеции C-концевого лизина Fc-области (остатка 447 в соответствии со схемой нумерации EU) или делеции C-концевого глицина и лизина Fc-области (остатки 446 и 447 в соответствии со схемой нумерации EU). Если не указано иное, схема нумерации для Fc-области представляет собой схему нумерации EU, также известную как индекс EU.

Термин «химерное антитело» относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи в антителе происходит из конкретного источника или вида, в то время как остальная часть тяжелой и/или легкой цепи происходит из другого источника или вида.

Термин «гуманизированное антитело» относится к антителу, которое сохраняет реакционную способность антитела нечеловеческого происхождения, обладая при этом низкой иммуногенностью у человека. Например, это может быть достигнуто путем сохранения областей CDR нечеловеческого происхождения и замены остальной части антитела его человеческими аналогами (т. е. константными областями и частью каркасной области переменных областей).

Термины «человеческое антитело», «гуманизированное антитело», «полностью человеческое антитело» и «абсолютно человеческое антитело» используются взаимозаменяемо и относятся к антителам, в которых переменные и константные области представляют собой человеческие последовательности. Данный термин охватывает

антитела, которые получены из человеческих генов, но имеют, например, последовательности, которые были изменены, например, для снижения возможной иммуногенности, повышения аффинности, устранения цистеинов, которые могут вызывать нежелательную укладку, или создания сайтов гликозилирования. Данный термин охватывает антитела, рекомбинантно продуцируемые в клетках, не являющихся человеческими, которые могут обеспечивать гликозилирование, не характерное для человеческих клеток. Данный термин также охватывает антитела, которые культивировали у трансгенных мышей, содержащих некоторые или все локусы тяжелой и легкой цепи человеческого иммуноглобулина. Определение человеческого антитела специально исключает гуманизированные антитела, содержащие антигенсвязывающие остатки нечеловеческого происхождения.

Термин «аффинность» относится к общей силе нековалентного взаимодействия между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, в контексте настоящего документа термин «аффинность» связывания относится к характеристической аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами пары связывания (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к ее лиганду Y обычно может быть обозначена константой диссоциации ( $K_D$ ). Аффинность может быть определена обычными методами, известными в данной области техники, включая описанные в настоящем документе.

В контексте настоящего документа термин « $k_{assoc}$ » или « $k_a$ » относится к степени ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, а термин « $k_{dis}$ » или « $k_d$ » относится к степени диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Термин « $K_D$ » относится к константе диссоциации, которая получена из отношения  $k_d$  к  $k_a$  (т. е.  $k_d/k_a$ ) и обозначается молярной концентрацией (M). Значение  $K_D$  антитела может быть определено методами, хорошо известными в данной области техники. Например, поверхностный плазмонный резонанс определяют с использованием биосенсорной системы, такой как система *biacore*, или аффинность в растворе определяют с помощью титрования при равновесии в растворе (SET).

Термин «эффекторная функция» относится к биологической активности, которая может быть отнесена к Fc-области антитела (либо к нативной последовательности Fc-области, либо к варианту аминокислотной последовательности Fc-области) и варьируется в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают, не ограничиваясь перечисленным: связывание C1q и комплемент-зависимую цитотоксичность, связывание с Fc-рецептором, антителозависимую

клеточноопосредованную цитотоксичность (АЗКЦ), фагоцитоз, понижающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, рецепторов В-клеток) и активацию В-клеток.

5 Термин «моноклональное антитело» относится к популяции по существу гомогенных антител, то есть аминокислотные последовательности молекул антител, содержащихся в популяции, идентичны, за исключением небольшого количества природных мутаций, которые могут существовать. Напротив, препараты на основе поликлональных антител обычно содержат множество различных антител, имеющих различные аминокислотные последовательности в своих варибельных доменах, которые, как правило, специфичны к различным эпитопам. «Моноклональный» относится к 10 характеристикам антитела, полученного из по существу гомогенной популяции антител, и не должен толковаться как требующий получения антитела каким-либо конкретным способом. В некоторых вариантах осуществления предложенное в настоящем изобретении антитело представляет собой моноклональное антитело.

15 Термин «антиген» относится к молекуле или части молекулы, которая способна селективно распознаваться или связываться антигенсвязывающей молекулой (в том числе, например, антителом). Антиген может иметь один или более эпитопов, способных взаимодействовать с различными антигенсвязывающими белками (например, антителами).

Термин «эпитоп» относится к области или участку на антигене, который способен 20 специфически связываться с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Эпитопы могут быть образованы смежными аминокислотами (линейные эпитопы) или содержать несмежные аминокислоты (конформационные эпитопы), например, несмежные аминокислоты, которые находятся в пространственной близости друг от друга из-за укладки антигена (т. е. путем третичной укладки антигена). Разница между конформационным 25 эпитопом и линейным эпитопом заключается в том, что в присутствии денатурирующих растворителей связывание антитела с конформационным эпитопом теряется. Эпитоп содержит по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Скрининг на антитела, которые связываются с конкретными эпитопами (т. е. тех, которые 30 связываются с идентичными эпитопами), может быть проведен обычными методами в данной области техники, включая, например, не ограничиваясь перечисленным, аланиновое сканирование, пептидный блоттинг, анализ расщепления пептида, иссечение эпитопа, экстракцию эпитопа, химическую модификацию антигена (*Prot. Sci.* 9 (2000) 487-496) и перекрестное блокирование.

35 Термин «способный специфично связываться», «специфично связывающийся» или

«связывание» означает, что антитело способно связываться с определенным антигеном или его эпитопом с более высокой аффинностью, чем с другими антигенами или эпитопами. Как правило, антитело связывается с антигеном или его эпитопом с равновесной константой диссоциации ( $K_D$ ), составляющей около  $1 \times 10^{-7}$  или менее (например, около  $1 \times 10^{-8}$  М или менее). В некоторых вариантах осуществления  $K_D$  для связывания антитела с антигеном составляет 10% или менее (например, 1%) от  $K_D$  для связывания антитела с неспецифическим антигеном (например, BSA или казеином).  $K_D$  может быть определена известными методами, например, с помощью анализа методом поверхностного плазмонного резонанса BIACORE®. Однако антитело, которое специфически связывается с антигеном или его эпитопом, может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например, с соответствующими антигенами от других видов (гомологичными), таких как люди или обезьяны, например, *Macaca fascicularis* (яванский макак, суно), *Pan troglodytes* (шимпанзе, chimp) или *Callithrix jacchus* (обыкновенная мартышка, мартышка).

Термин «антитело к субъединице p40 IL23/IL12» относится к антителу, которое способно связываться с достаточной аффинностью с субъединицей p40 IL23 и IL12. В одном варианте осуществления степень связывания с неродственным антителом, которое не является белком IL23 или IL12, составляет менее чем около 10% от связывания антитела с IL23 и IL12, при измерении с помощью анализа методом поверхностного плазмонного резонанса BIACORE®. В отдельных вариантах осуществления изобретения антитело, которое связывается с IL23 и IL12, имеет константу диссоциации ( $K_D$ ) менее около 1 мкМ, менее около 100 нМ, менее около 10 нМ, менее около 1 нМ, менее около 0,1 нМ, менее около 0,01 нМ или менее около 0,001 нМ (например,  $10^{-8}$  М или менее, например, от  $10^{-8}$  М до  $10^{-12}$  М, например, от  $10^{-9}$  М до  $10^{-10}$  М). В некоторых вариантах осуществления антитело к IL23/IL12 связывается с консервативным эпитопом IL23/IL12 от другого вида.

Термин «линкер» относится к линкерному звену, которое связывает два полипептидных фрагмента и, как правило, обладает некоторой гибкостью, так что использование линкера не приводит к потере исходной функции белкового домена. В настоящем документе линкеры, присутствующие в одной и той же структуре, могут быть одинаковыми или разными. Линкер может представлять собой пептидный линкер, содержащий одну или более аминокислот, обычно около 1-30, 2-24 или 3-15 аминокислот. Линкеры, используемые в настоящем документе, могут быть одинаковыми или разными.

Термин «антителозависимая клеточная цитотоксичность», «антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность» или «АЗКЦ» представляет собой механизм индукции гибели клеток, который зависит от взаимодействия клеток-мишеней, покрытых

антителом, с эффекторными клетками с литической активностью, такими как естественные киллерные клетки (NK), моноциты, макрофаги и нейтрофилы, через Fcγ-рецептор (FcγR), экспрессируемый на эффекторных клетках. Например, NK-клетки экспрессируют FcγRIIIa, в то время как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIIIa. Активность АЗКЦ антител, предложенных в настоящем документе, может быть оценена с помощью анализов *in vitro* с использованием клеток, экспрессирующих антиген, в качестве клеток-мишеней, и NK-клеток в качестве эффекторных клеток. Лизис клеток обнаруживают на основании высвобождения метки (например, радиоактивного субстрата, флуоресцентного красителя или природного внутриклеточного белка) из лизированных клеток.

10 Термин «антителозависимый клеточный фагоцитоз» («АЗКФ») относится к механизму, посредством которого клетки-мишени, покрытые антителом, элиминируются путем интернализации фагоцитарными клетками, таких как макрофаги или дендритные клетки.

15 Термин «комплемент-зависимая цитотоксичность» или «КЗЦ» относится к механизму индукции гибели клеток, при котором эффекторный Fc-домен связывающего мишень антитела связывается с компонентом комплемента C1q и активирует его, а C1q затем активирует каскад комплемента, что приводит к гибели клетки-мишени. Активация комплемента также может приводить к отложению компонентов комплемента на поверхности клеток-мишеней, которые способствуют КЗЦ путем связывания с рецепторами комплемента на лейкоцитах (например, CR3).

20 Термин «нуклеиновая кислота» используется в настоящем документе взаимозаменяемо с термином «полинуклеотид» и относится к дезоксирибонуклеотиду или рибонуклеотиду и их полимеру в одноцепочечной или двухцепочечной форме. Данный термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги нуклеотидов или модифицированные остатки остова или связи, которые являются синтетическими, встречающимися в природе и не встречающимися в природе, имеющие схожие с эталонной нуклеиновой кислотой свойства связывания, и которые метаболизируются способом, подобным эталонному нуклеотиду. Примеры таких аналогов включают, не ограничиваясь перечисленным, тиофосфат, фосфорамидат, метилфосфонат, хиралметилфосфонат, 2-О-метилрибонуклеотид и пептидную нуклеиновую кислоту (PNA).

30 «Выделенная» нуклеиновая кислота относится к молекуле нуклеиновой кислоты, отделенной от компонентов своего природного окружения. Выделенная нуклеиновая кислота включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетке, которая обычно содержит молекулу нуклеиновой кислоты, но молекула нуклеиновой кислоты присутствует 35 внехромосомно или в хромосомном положении, отличном от ее природного хромосомного

положения. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид или слитый белок, относится к одной или более молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим полипептид или слитый белок, включая такие одну или более молекул нуклеиновой кислоты в одном векторе или отдельных векторах, и такие одна или более молекул нуклеиновой кислоты присутствуют в одном или более положениях в клетке-хозяине. Если не указано иное, конкретная нуклеотидная последовательность также в неявной форме охватывает ее консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов) и комплементарные последовательности, а также явным образом указанную последовательность. В частности, как подробно описано ниже, замены вырожденных кодонов могут быть получены путем генерирования последовательностей, в которых третье положение одного или более выбранных (или всех) кодонов заменено смешанными основаниями и/или остатками дезоксиинозина.

Термины «полипептид» и «белок» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и обозначают полимер из аминокислотных остатков. Данные термины относятся к полимерам аминокислот, в которых один или более аминокислотных остатков представляют собой соответствующие встречающиеся в природе аминокислоты или их искусственные химические миметики, а также к встречающимся в природе полимерам аминокислот и не встречающимся в природе полимерам аминокислот. Если не указано иное, конкретная полипептидная последовательность также в неявной форме охватывает ее консервативно модифицированные варианты.

Термин «идентичность» последовательностей относится к степени (проценту), в которой аминокислоты/нуклеиновые кислоты двух последовательностей идентичны в эквивалентных положениях, когда две последовательности оптимально выровнены, с гэпами, введенными по мере необходимости для достижения максимального процента идентичности последовательностей, и без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательностей. Для определения процента идентичности последовательностей могут быть выполнены выравнивания при помощи методик, известных специалистам в данной области техники, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить параметры, подходящие для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине выравниваемых последовательностей.

В настоящем изобретении, например, «положения аминокислотных остатков, пронумерованные в естественном порядке относительно последовательности SEQ ID NO:

XX» относится к положениям рассматриваемой последовательности, соответствующим положениям последовательности XX, то есть относительно положениям двух последовательностей, когда рассматриваемая последовательность оптимально выровнена с последовательностью XX для достижения наивысшего процента идентичности. Например, иллюстративные примеры «положений аминокислотных остатков, пронумерованных в естественном порядке относительно SEQ ID NO: 8» в последовательностях внеклеточных областей SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 10 TAC1 представлены в таблице 2 ниже:

Таблица 2. Соответствующие положения положений SEQ ID NO: 8 в других последовательностях

(на примере SEQ ID NO: 1 и 10)

10

Положения в естественном порядке в SEQ ID NO: 8	Соответствующее положение	
	Соответствующие положения в SEQ ID NO: 1	Соответствующие положения в SEQ ID NO: 10
Положения 48-88	Положения 68-108 (SEQ ID NO: 1, в естественном порядке)	Положения 1-41 (SEQ ID NO: 10, в естественном порядке)
Положения 48-87	Положения 68-107 (SEQ ID NO: 1, в естественном порядке)	Положения 1-40 (SEQ ID NO: 10, в естественном порядке)
Положения 48-86	Положения 68-106 (SEQ ID NO: 1, в естественном порядке)	Положения 1-39 (SEQ ID NO: 10, в естественном порядке)
Положения 48-85	Положения 68-105 (SEQ ID NO: 1, в естественном порядке)	Положения 1-38 (SEQ ID NO: 10, в естественном порядке)
Положение 49	Положение 69 (SEQ ID NO: 1, в естественном порядке)	Положение 2 (SEQ ID NO: 10, в естественном порядке)
Положение 52	Положение 72 (SEQ ID NO: 1, в естественном порядке)	Положение 5 (SEQ ID NO: 10, в естественном порядке)
Положение 53	Положение 73 (SEQ ID NO: 1, в естественном порядке)	Положение 6 (SEQ ID NO: 10, в естественном порядке)
Положение 57	Положение 77 (SEQ ID NO: 1, в естественном порядке)	Положение 10 (SEQ ID NO: 10, в естественном порядке)
Положение 65	Положение 85 (SEQ ID NO: 1, в естественном порядке)	Положение 18 (SEQ ID NO: 10, в естественном порядке)
Положение 82	Положение 102 (SEQ ID NO: 1, в естественном порядке)	Положение 35 (SEQ ID NO: 10, в естественном порядке)

	естественном порядке)	естественном порядке)
Положение 83	Положение 103 (SEQ ID NO: 1, в естественном порядке)	Положение 36 (SEQ ID NO: 10, в естественном порядке)

Примечание: например, положение 49 остатка в естественном порядке в SEQ ID NO: 10 относительно последовательности SEQ ID NO: 8 представляет собой положение 2 остатка (естественный порядок) в SEQ ID NO: 10, а положение 49 остатка, пронумерованное в естественном порядке в SEQ ID NO: 1 относительно последовательности SEQ ID NO: 8, представляет собой положение 69 (естественный порядок) в SEQ ID NO: 1.

Термин «слияние» или «связь» означает, что компоненты (например, полипептид TAC1 и Fc-домен) связаны ковалентной связью либо непосредственно, либо посредством одного или более линкеров. Когда линкер представляет собой пептидный линкер, ковалентная связь представляет собой пептидную связь.

Термин «вектор» означает молекулу полинуклеотида, способную переносить другой связанный с ней полинуклеотид. Один тип вектора представляет собой «плазмиду», которая означает кольцевую двухцепочечную петлю ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, такой как аденоассоциированный вирусный вектор (AAV или AAV2), в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации, и эписомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут быть встроены в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина. Термин «вектор экспрессии» или «конструкция экспрессии» относится к вектору, который может быть трансформирован в клетку-хозяина, и содержит нуклеотидную последовательность, которая направляет и/или контролирует (вместе с клеткой-хозяином) экспрессию одной или более гетерологичных кодирующих областей, функционально связанных с ней. Конструкции экспрессии могут включать, не ограничиваясь перечисленным, последовательности, которые влияют на транскрипцию и трансляцию или контролируют ее, и влияют на сплайсинг РНК кодирующей области, функционально связанной с ними, в присутствии интрона.

Термины «клетка-хозяин», «линия клеток-хозяев» и «культура клеток-хозяев» используются взаимозаменяемо и относятся к клеткам, в которые ввели экзогенную нуклеиновую кислоту, включая потомства таких клеток. Клетки-хозяева включают

«трансформанты» и «трансформированные клетки», которые включают первичные трансформированные клетки и полученные из них потомства, независимо от количества пассажей. Потомство может не совпадать с родительскими клетками с точки зрения содержания нуклеиновой кислоты и может содержать мутации. Мутантные потомки, которые имеют ту же функцию или биологическую активность, что и клетки, прошедшие скрининг или отобранные из первоначально трансформированных клеток, включены в настоящий документ. Клетки-хозяева включают прокариотические и эукариотические клетки-хозяева, где эукариотические клетки-хозяева включают, не ограничиваясь перечисленным, клетки млекопитающих, клеточные линии насекомых, растительные клетки и клетки грибов. Клетки-хозяева млекопитающих включают клетки человека, мыши, крысы, собаки, обезьяны, свиньи, козы, быка, лошади и хомяка, включая, не ограничиваясь перечисленным, клетки яичника китайского хомячка (CHO), NSO, клетки SP2, клетки HeLa, клетки почки новорожденного хомяка (ВНК), клетки почки обезьяны (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Hep G2), клетки A549, клетки 3T3 и клетки HEK-293. Клетки грибов включают дрожжевые клетки и клетки мицелиальных грибов, включая, например, *Pichiapastoris*, *Pichia finlandica*, *Pichia trehalophila*, *Pichia koclamae*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia minuta* (*Ogataea minuta*, *Pichia lindneri*), *Pichiaopuntiae*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia salictaria*, *Pichia guercuum*, *Pichia pijperi*, *Pichia stiptis*, *Pichia stiptis*, *Pichia methanolica*, *Pichia*, *Saccharomycescerevisiae*, *Saccharomyces*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium sp.*, *Fusarium gramineum*, *Fusarium venenatum*, *Physcomitrella patens*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus* и *Yarrowia lipolytica*.

«Необязательный» или «необязательно» означает, что событие или обстоятельство, описанное далее, может, но не обязательно должно, произойти, и что описание включает случай, когда это событие или обстоятельство происходит или не происходит.

Термин «фармацевтическая композиция» относится к смеси, содержащей один или более полипептидов или слитых белков ТАСІ, описанных в настоящем документе, и другие химические компоненты, например, физиологические/фармацевтически приемлемые носители и эксципиенты.

Термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к ингредиенту в фармацевтическом составе, который отличается от активного ингредиента и не токсичен для субъекта. Фармацевтически приемлемые носители включают, не ограничиваясь перечисленным, буферы, эксципиенты, стабилизаторы или консерванты.

Термин «субъект» или «индивидуум» включает человека или животных, отличных

от человека. Животные, отличные от человека, включают всех позвоночных (например, млекопитающих и не млекопитающих), таких как приматы, отличные от человека (например, яванские макаки), овцы, собаки, коровы, куры, земноводные и рептилии. Если не указано иное, термины «пациент» и «субъект» используются в настоящем документе взаимозаменяемо. В контексте настоящего документа термин «яванский макак (суно)» или «яванский» относится к *Macaca fascicularis*. В отдельных вариантах осуществления индивидуум или субъект представляет собой человека.

Термины «введение» или «дача» применительно к животным, людям, подопытным субъектам, клеткам, тканям, органам или биологическим жидкостям относятся к контакту экзогенного лекарственного средства, терапевтического агента, диагностического агента или композиции с указанными животными, людьми, субъектами, клетками, тканями, органами или биологическими жидкостями.

Термин «образец» относится к собранным жидкостям, клеткам или тканям, выделенным у субъекта, а также жидкостям, клеткам или тканям, присутствующим у субъекта. Иллюстративные образцы представляют собой биологические жидкости (такие как кровь; сыворотка; серозные жидкости; плазма; лимфа; моча; слюна; кистозные жидкости; слезы; выделения; мокрота; слизистые выделения секреторной ткани и органов; влагалищные выделения; асцит; жидкости в плевре; перикарде; перитонеальной полости; брюшной полости и других полостях тела; жидкости, собранные из бронхиального лаважа; синовиальные жидкости; жидкие растворы, контактирующие с субъектом или биологическим источником, например, клеточные и органные культуральные среды (включая клеточные или органные кондиционированные среды); лаважные жидкости; и тому подобное), образцы, представляющие собой биоптаты тканей, пункции тонкими иглами, хирургически иссеченные ткани, культуры органов или клеточные культуры.

«Лечение» или «лечить» (и их грамматические вариации) относится к клиническому вмешательству с целью изменения естественного течения у индивидуума, получающего лечение, которое может быть выполнено либо для профилактики, либо в ходе клинической патологии. Желательные эффекты лечения включают, не ограничиваясь перечисленным, предотвращение возникновения или рецидива заболевания, облегчение симптомов, облегчение/уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, снижение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или облегчение болезненного состояния и регрессию или улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления полипептид или слитый белок согласно настоящему изобретению применяют для задержки развития или замедления прогрессирования заболевания.

«Эффективное количество», как правило, представляет собой количество, достаточное для снижения тяжести и/или частоты симптомов, устранения симптомов и/или первопричин, предотвращения возникновения симптомов и/или их первопричин и/или облегчения или улучшения повреждения, вызванного болезненным состоянием или связанного с ним. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой терапевтически эффективное количество или профилактически эффективное количество. «Терапевтически эффективное количество» представляет собой количество, достаточное для лечения болезненного состояния или патологического состояния, в частности, состояния или патологического состояния, связанного с болезненным состоянием, или для того, чтобы каким-либо образом предотвратить, затруднить, задержать или обратить вспять прогрессирующее болезненное состояние или любых других нежелательных симптомов, связанных с заболеванием. «Профилактически эффективное количество» представляет собой количество, которое при введении субъекту будет оказывать predetermined профилактический эффект, например, предотвращая или задерживая начало (или рецидив) болезненного состояния или уменьшая вероятность начала (или рецидива) болезненного состояния или связанных с ним симптомов. Полный терапевтический или профилактический эффект не обязательно возникает после введения одной дозы и может возникать после введения серии доз. Таким образом, терапевтически или профилактически эффективное количество может быть введено в одной или более дозах. «Терапевтически эффективное количество» и «профилактически эффективное количество» могут варьироваться в зависимости от множества факторов, таких как болезненное состояние, возраст, пол и вес индивидуума, а также способность терапевтического агента или комбинации терапевтических агентов вызывать желаемый ответ у индивидуума. Примеры показателей эффективного терапевтического агента или комбинации терапевтических агентов включают, например, улучшение состояния здоровья пациента.

#### **Полипептид TAC1 и его слитый белок согласно настоящему изобретению**

В одном аспекте настоящего изобретения разработаны фрагменты последовательности TAC1 различной длины, и, наконец, получен новый фрагмент последовательности TAC1 SEQ ID NO: 8 (который не содержит аминокислотных остатков в положениях 13 и 14 внеклеточной области (положения 13 и 14 в естественном порядке SEQ ID NO: 1), которые вызывают расщепление TAC1), который обладает лучшей устойчивостью к расщеплению TAC1 и хорошей функциональной активностью полипептида TAC1. Кроме того, путем дополнительного усечения N-конца и C-конца SEQ ID NO: 8 получен фрагмент полипептида TAC1 с лучшей функциональной активностью,

содержащий аминокислотные остатки в положениях 48-85 SEQ ID NO: 8, но не аминокислотные остатки в положениях 34-66 SEQ ID NO: 1 (естественный порядок). Кроме того, аминокислотные остатки в части положений фрагмента полипептида TACI заменены с получением полипептида TACI с лучшей связывающей активностью, блокирующей функцией, стабильностью и пригодностью для разработки лекарственного средства.

#### **А. Иллюстративные полипептиды TACI и их слитые белки**

В одном аспекте настоящего изобретения предложен полипептид TACI, который представляет собой SEQ ID NO: 8 или ее вариант, усеченный фрагмент, содержащий аминокислотные остатки в положениях 48-85 SEQ ID NO: 8, или его вариант, или усеченный фрагмент, содержащий аминокислотные остатки в положениях 51-85 SEQ ID NO: 8, или его вариант. В частности, слитый белок, содержащий полипептид TACI согласно настоящему изобретению (например, TACI-Fc), обладает одной или более из следующих функциональных активностей:

a. отсутствие склонности к образованию фрагментов, вызванных расщеплением TACI, причем в некоторых вариантах осуществления расщепление может быть обнаружено с помощью масс-спектрометрии;

b. способность блокировать связывание BAFF с BAFF-R, причем в некоторых вариантах осуществления TACI-Fc блокирует связывание BAFF с BAFF-R со значением  $IC_{50}$  менее 23 нМ, менее 10 нМ, менее 6 нМ, менее 5 нМ, менее 4 нМ, менее 3 нМ, менее 2 нМ, менее 1 нМ или менее, причем значение  $IC_{50}$  определяют методом ELISA; в некоторых вариантах осуществления метод тестирования для значения  $IC_{50}$  описан в тестовом примере 2;

c. способность связываться с BAFF, причем в некоторых вариантах осуществления TACI-Fc связывается с BAFF со значением  $EC_{50}$  менее 1 нМ, 0,5 нМ, 0,4 нМ, 0,3 нМ, 0,2 нМ, 0,1 нМ или менее, причем значение  $EC_{50}$  определяют методом ELISA; в некоторых вариантах осуществления метод тестирования для значения  $EC_{50}$  описан в анализе связывания ELISA (покрытие антигенным белком) в тестовом примере 1; в некоторых вариантах осуществления TACI-Fc связывается с BAFF со значением  $EC_{50}$  менее 30 нМ, 20 нМ, 10 нМ, 9 нМ, 8 нМ, 7 нМ, 6 нМ или менее, причем значение  $EC_{50}$  определяют методом ELISA (покрытие тестируемым образцом); в некоторых вариантах осуществления метод тестирования для значения  $EC_{50}$  описан в анализе связывания ELISA (покрытие тестируемым образцом) в тестовом примере 1;

d. ингибирование BAFF-индуцированной пролиферации В-клеток, причем в некоторых вариантах осуществления TACI-Fc ингибирует BAFF-индуцированную пролиферацию В-клеток со значением  $IC_{50}$  менее 0,3 нМ, менее 0,2 нМ, менее 0,1 нМ, 0,06

нМ, менее 0,05 нМ, менее 0,01 нМ или менее, причем значение IC<sub>50</sub> определяют методом ELISA; в некоторых вариантах осуществления метод тестирования для значения IC<sub>50</sub> описан в тестовом примере 3;

5 е. ингибирование APRIL-индуцированной пролиферации В-клеток, причем в некоторых вариантах осуществления TACI-Fc ингибирует APRIL-индуцированную пролиферацию В-клеток со значением IC<sub>50</sub> менее 3 нМ, менее 2 нМ, менее 1 нМ, менее 0,5 нМ, менее 0,4 нМ, менее 0,3 нМ, 0,2 нМ, менее 0,1 нМ, менее 0,05 нМ или менее, причем значение IC<sub>50</sub> определяют методом ELISA; в некоторых вариантах осуществления метод тестирования для значения IC<sub>50</sub> описан в тестовом примере 3;

10 f. связывание с высокой аффинностью с BAFF человека и/или APRIL человека, причем в некоторых вариантах осуществления аффинность определяют методом Biacore; в некоторых вариантах осуществления аффинность определяют методом, описанным в тестовом примере 5; в некоторых вариантах осуществления слитый белок TACI-Fc связывается с BAFF человека со значением K<sub>D</sub> менее 1E-10 М, менее 9E-11 М, менее 8E-11 М или менее; в некоторых вариантах осуществления слитый белок TACI-Fc связывается с  
15 APRIL человека со значением K<sub>D</sub> менее 2,3E-11 М, менее 2,0E-11 М, 1,9E-11 М, 1,3E-11 М или менее;

g. хорошая фармакокинетика *in vivo*, причем в некоторых вариантах осуществления TACI-Fc имеет период полувыведения *in vivo* более 4 дней у крыс; в некоторых вариантах  
20 осуществления метод тестирования для периода полувыведения описан в тестовом примере 7; и/или

h. лучшая стабильность, причем в некоторых вариантах осуществления слитый белок TACI-Fc сохраняет чистоту выше 94% (SEC%) при хранении TACI-Fc при постоянной температуре 40 °C в течение четырех недель; в некоторых вариантах осуществления TACI-  
25 Fc имеет значение рI менее 9, менее 8, менее 7, менее 6 или менее, как определено с помощью анализа с использованием системы «18cProt/TrEMBL».

В качестве примера, полипептид TACI согласно настоящему изобретению имеет последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13-15, SEQ ID NO: 18-35 и SEQ ID NO: 68-70, или аминокислотную  
30 последовательность, обладающую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью любой из последовательностей SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13-15, SEQ ID NO: 18-35 и SEQ ID NO: 68-70.

### **В. Иллюстративный слитый белок TACI и антитела**

В одном аспекте слитый белок TACI согласно настоящему изобретению  
35 представляет собой слитый белок антитела, содержащий полипептид TACI согласно

настоящему изобретению и антителу. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело для лечения или облегчения В-клеточного расстройства или аутоиммунного заболевания. В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок TACI и антитела согласно настоящему изобретению, где антитело представляет собой антитело к IL23, антитело к IL12 или антитело к субъединице p40 IL23/IL12. В некоторых вариантах осуществления слитый белок TACI и антитела согласно настоящему изобретению обладает способностью блокировать связывание IL23/IL12 с его рецептором, а также обладает способностью блокировать связывание TACI с его рецептором. В частности, слитый белок, содержащий полипептид TACI согласно настоящему изобретению (например, слитый белок TACI и антитела), обладает одной или более из следующих функциональных активностей:

а. отсутствие склонности к образованию фрагментов, вызванных расщеплением TACI, причем в некоторых вариантах осуществления расщепление может быть обнаружено с помощью масс-спектрометрии;

б. способность блокировать связывание BAFF с BCMA, причем в некоторых вариантах осуществления слитый белок TACI и антитела блокирует связывание BAFF с BCMA со значением  $IC_{50}$  менее 0,4 нМ, менее 0,3 нМ, менее 0,2 нМ, менее 0,1 нМ или менее, причем значение  $IC_{50}$  определяют методом ELISA; в некоторых вариантах осуществления метод тестирования для значения  $IC_{50}$  описан в тестовом примере 2;

в. способность блокировать связывание BAFF с TACI, причем в некоторых вариантах осуществления слитый белок TACI и антитела блокирует связывание BAFF с TACI со значением  $IC_{50}$  менее 0,5 нМ, менее 0,4 нМ, менее 0,3 нМ, менее 0,2 нМ, менее 0,1 нМ или менее, причем значение  $IC_{50}$  определяют методом ELISA; в некоторых вариантах осуществления метод тестирования для значения  $IC_{50}$  описан в тестовом примере 2;

г. способность блокировать связывание APRIL с BCMA, причем в некоторых вариантах осуществления слитый белок TACI и антитела блокирует связывание APRIL с BCMA со значением  $IC_{50}$  менее 25 нМ, менее 20 нМ, менее 15 нМ, менее 10 нМ, менее 5 нМ, менее 4 нМ, менее 3 нМ, менее 2 нМ, менее 1 нМ или менее, причем значение  $IC_{50}$  определяют методом ELISA; в некоторых вариантах осуществления метод тестирования для значения  $IC_{50}$  описан в тестовом примере 2;

д. способность блокировать связывание APRIL с TACI, причем в некоторых вариантах осуществления слитый белок TACI и антитела блокирует связывание APRIL с TACI со значением  $IC_{50}$  менее 3 нМ, менее 2 нМ, менее 1 нМ, менее 0,9 нМ, менее 0,5 нМ или менее, причем значение  $IC_{50}$  определяют методом ELISA; в некоторых вариантах осуществления метод тестирования для значения  $IC_{50}$  описан в тестовом примере 2;

f. способность блокировать связывание p40 с IL-12R $\beta$ 1, причем в некоторых вариантах осуществления слитый белок TACI и антитела блокирует связывание p40 с IL-12R $\beta$ 1 со значением IC<sub>50</sub> менее 3 нМ, менее 2 нМ, менее 1 нМ, менее 0,9 нМ, менее 0,5 нМ или менее, причем значение IC<sub>50</sub> определяют методом ELISA; в некоторых вариантах осуществления метод тестирования для значения IC<sub>50</sub> описан в тестовом примере 2;

g. способность блокировать связывание BAFF с BAFF-R, причем в некоторых вариантах осуществления значение IC<sub>50</sub> для блокирования связывания BAFF с BAFF-R определяют методом ELISA; в некоторых вариантах осуществления метод тестирования для значения IC<sub>50</sub> описан в тестовом примере 2;

h. способность связываться с BAFF, причем в некоторых вариантах осуществления слитый белок TACI и антитела связывается с BAFF со значением EC<sub>50</sub> менее 6 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ или менее, причем значение EC<sub>50</sub> определяют методом ELISA; в некоторых вариантах осуществления метод тестирования для значения EC<sub>50</sub> описан в анализе связывания ELISA (покрытие антигенным белком) в тестовом примере 1;

i. способность связываться с APRIL, причем в некоторых вариантах осуществления слитый белок TACI и антитела связывается с APRIL со значением EC<sub>50</sub> менее 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ, 1 нМ или менее, причем значение EC<sub>50</sub> определяют методом ELISA; в некоторых вариантах осуществления метод тестирования для значения EC<sub>50</sub> описан в анализе связывания ELISA (покрытие антигенным белком) в тестовом примере 1;

j. способность связываться с p40 IL-12/23, причем в некоторых вариантах осуществления слитый белок TACI и антитела связывается с p40 IL-12/23 со значением EC<sub>50</sub> менее 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ, 1 нМ, 0,7 нМ, 0,6 нМ или менее, причем значение EC<sub>50</sub> определяют методом ELISA; в некоторых вариантах осуществления метод тестирования для значения EC<sub>50</sub> описан в анализе связывания ELISA (покрытие антигенным белком) в тестовом примере 1;

k. ингибирование BAFF-индуцированной пролиферации В-клеток, причем в некоторых вариантах осуществления слитый белок TACI и антитела ингибирует BAFF-индуцированную пролиферацию В-клеток со значением IC<sub>50</sub> менее 0,3 нМ, менее 0,2 нМ, менее 0,1 нМ, менее 0,06 нМ, менее 0,05 нМ, менее 0,01 нМ или менее, причем значение IC<sub>50</sub> определяют методом ELISA; в некоторых вариантах осуществления метод тестирования для значения IC<sub>50</sub> описан в тестовом примере 3;

l. ингибирование APRIL-индуцированной пролиферации В-клеток, причем в некоторых вариантах осуществления слитый белок TACI и антитела ингибирует APRIL-индуцированную пролиферацию В-клеток со значением IC<sub>50</sub> менее 1 нМ, менее 0,5 нМ, менее 0,4 нМ, менее 0,3 нМ, 0,2 нМ, менее 0,1 нМ, менее 0,09 нМ или менее, причем

значение  $IC_{50}$  определяют методом ELISA; в некоторых вариантах осуществления метод тестирования для значения  $IC_{50}$  описан в тестовом примере 3;

5 м. ингибирование IL-23-индуцированной секреции IL-17, причем в некоторых вариантах осуществления слитый белок TACI и антитела ингибирует IL-23-индуцированную секрецию IL-17 со значением  $IC_{50}$  менее 3 нМ, менее 2 нМ, менее 2,4 нМ, менее 2,0 нМ, менее 1,7 нМ, менее 1 нМ или менее; в некоторых вариантах осуществления метод тестирования для значения  $IC_{50}$  описан в тестовом примере 4;

10 н. ингибирование IL-12-индуцированной секреции  $IFN\gamma$ , причем в некоторых вариантах осуществления слитый белок TACI и антитела ингибирует IL-12-индуцированную секрецию  $IFN\gamma$  со значением  $IC_{50}$  менее 10 нМ, менее 5 нМ, менее 4 нМ, менее 3 нМ, менее 1 нМ или менее; в некоторых вариантах осуществления метод тестирования для значения  $IC_{50}$  описан в тестовом примере 4;

15 о. связывание с высокой аффинностью с IL-23 человека, IL-12 человека, BAFF человека, APRIL человека, p40 яванского макака, BAFF яванского макака, APRIL яванского макака, BAFF мыши и/или APRIL мыши, причем в некоторых вариантах осуществления аффинность определяют методом Biacore; в некоторых вариантах осуществления анализ аффинности описан в тестовом примере 5; в некоторых вариантах осуществления слитый белок TACI и антитела связывается с BAFF человека со значением  $K_D$  менее  $1E-10$  М, менее  $9E-11$  М, менее  $3E-11$  М или менее; в некоторых вариантах осуществления слитый белок TACI и антитела связывается с BAFF мыши со значением  $K_D$  менее  $1E-10$  М, менее  $8E-11$  М, менее  $4E-11$  М или менее; в некоторых вариантах осуществления слитый белок TACI и антитела связывается с BAFF яванского макака со значением  $K_D$  менее  $4E-10$  М, менее  $3E-10$  М, менее  $1E-11$  М или менее; в некоторых вариантах осуществления слитый белок TACI и антитела связывается с APRIL человека со значением  $K_D$  менее  $2,8E-11$  М, менее  $2,2E-11$  М, менее  $1,5E-11$  М или менее; в некоторых вариантах осуществления слитый белок TACI и антитела связывается с APRIL яванского макака со значением  $K_D$  менее  $4,3E-11$  М, менее  $3,5E-11$  М, менее  $3,3E-11$  М или менее; в некоторых вариантах осуществления слитый белок TACI и антитела связывается с APRIL мыши со значением  $K_D$  менее  $1E-11$  М, менее  $9E-12$  М, менее  $8E-11$  М или менее; в некоторых вариантах осуществления слитый белок TACI и антитела связывается с IL-23 человека со значением  $K_D$  менее  $1E-12$  М, менее  $9E-11$  М, менее  $8E-11$  М или менее; в некоторых вариантах осуществления слитый белок TACI и антитела связывается с p40 яванского макака со значением  $K_D$  менее  $3E-10$  М, менее  $2,7E-10$  М, менее  $2,6E-10$  М или менее; слитый белок TACI и антитела связывается с IL-12 человека со значением  $K_D$  менее  $5E-11$  М, менее  $4E-11$  М, менее  $3E-11$  М или менее;

35 р. хорошая фармакокинетика *in vivo*, причем в некоторых вариантах осуществления

слитый белок TAC1 и антитела имеет период полувыведения *in vivo* более 9 дней у крыс; в некоторых вариантах осуществления метод тестирования для периода полувыведения описан в тестовом примере 7; и/или

5            q. хорошая стабильность в плазме, причем в некоторых вариантах осуществления слитый белок TAC1 и антитела имеет конечную концентрацию 0,1 мг/мл в плазме человека и не имеет обнаружимого расщепления TAC1 при 37 °C после 14 дней инкубации.

10            В качестве примера, слитый белок TAC1 и антитела содержит первую полипептидную цепь, обладающую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 55, и вторую полипептидную цепь, обладающую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 56. В некоторых вариантах осуществления слитый белок TAC1 и антитела содержит первую полипептидную цепь, обладающую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 57, и вторую полипептидную цепь, обладающую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 58.

#### **Модификация Fc-области**

В одном аспекте Fc-область слитого белка TAC1 согласно настоящему изобретению (например, слитого белка TAC1-Fc или TAC1 и антитела) содержит одну или более аминокислотных замен, причем указанные одна или более аминокислотных замен снижают связывание Fc-области с Fc-рецептором, например, связывание Fc-области с Fcγ-рецептором, и снижают или устраняют эффекторные функции. Природная Fc-область IgG, в частности, Fc-область IgG<sub>1</sub> или Fc-область IgG<sub>4</sub>, может вызывать нацеливание слитого белка согласно настоящему изобретению на клетки-мишени, экспрессирующие Fc-рецептор, а не клетки, экспрессирующие антиген. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Fc-область согласно настоящему изобретению демонстрирует сниженную аффинность связывания с Fc-рецептором и/или сниженные эффекторные функции. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Fc-область демонстрирует 50%, 80%, 90% или 95% снижение аффинности связывания с Fc-рецептором по сравнению с нативной Fc-областью. В некоторых вариантах осуществления Fc-рецептор представляет собой Fcγ-рецептор. В некоторых вариантах осуществления Fc-рецептор представляет собой Fcγ-рецептор человека, например, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb или FcγRIIIa. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Fc-область также имеет сниженную аффинность связывания с компонентом (например, C1q) по сравнению с нативной Fc-областью. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Fc-область не имеет сниженной аффинности связывания с неонатальным Fc-рецептором

(FcRn) по сравнению с нативной Fc-областью. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Fc-область имеет сниженные эффекторные функции, которые могут включать, не ограничиваясь перечисленным, одно или более из следующего: сниженная комплемент-зависимая цитотоксичность (КЗЦ), сниженная антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (АЗКЦ), сниженный антитело-зависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ), сниженная секреция цитокинов, сниженное опосредованное иммунным комплексом поглощение антигена антигенпрезентирующими клетками, сниженное связывание с НК-клетками, сниженное связывание с макрофагами, сниженное связывание с моноцитами, сниженное связывание с полиморфноядерными клетками, сниженный апоптоз, индуцированный прямой передачей сигнала, сниженное созревание дендритных клеток и сниженное примирование Т-клеток. Для Fc-области IgG<sub>1</sub> замены аминокислотных остатков в таких положениях, как положения 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329, могут снижать эффекторные функции. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой Fc-область человеческого IgG<sub>1</sub>, и аминокислотные остатки в положениях 234 и 235 представляют собой А, при нумерации в соответствии с индексом EU. Для Fc-области IgG<sub>4</sub> замены аминокислотных остатков в таких положениях, как положение 228, могут снижать эффекторные функции.

Слитый белок может содержать разные антигенсвязывающие домены, слитые с двумя субъединицами Fc-области, и, таким образом, может приводить к нежелательной гомодимеризации. Для повышения выхода и чистоты предпочтительно вводить модификации, которые способствуют гетеродимеризации, в Fc-область слитого белка согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления Fc-область согласно настоящему изобретению содержит модификации в соответствии с методикой «выступ-во-впадину» (КИН), которая включает введение структуры выпуклости (выступа) в области контакта первой субъединицы и структуры полости (впадины) в области контакта второй субъединицы; или наоборот. Таким образом, структура выпуклости может быть расположена в структуре полости, тем самым способствуя образованию гетеродимеров и ингибируя продукцию гомодимеров. Структуру выпуклости конструируют путем замены небольшой боковой цепи аминокислоты в области контакта первой субъединицы более крупной боковой цепью (например, тирозином или триптофаном). Структуру полости создают в области контакта второй субъединицы путем замены большой боковой цепи аминокислоты меньшей боковой цепью аминокислоты (например, аланином или треонином). Структуры выпуклости и полости получают путем изменения нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, необязательными аминокислотными заменами, представленными в таблице 3 ниже:

Таблица 3. Комбинации мутаций КИИ

Первая субъеди ница	T366Y	T366W	T394W	F405W	T366W	T366Y F405A	T366W F405W	F405W Y407A	354C
									356E
									358M
									366W
Вторая субъеди ница	Y407T	Y407A	F405A	T394S	T366S L368A Y407V	T394W Y407T	T394W Y407A	T366W T394S	349C
									356E
									358M
									366S
									368A
									407V

В дополнение к методике «выступ-во-впадину» в данной области техники также известны другие методики модификации домена СНЗ тяжелой цепи мультиспецифических антител для достижения гетеродимеризации, например, WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954 и WO 013/096291.

С-конец Fc-области может представлять собой интактный С-конец, заканчивающийся аминокислотными остатками PGK, или укороченный С-конец, например, укороченный С-конец, в котором один или два С-концевых аминокислотных остатка были удалены. В предпочтительном аспекте С-конец тяжелой цепи представляет собой укороченный С-конец, заканчивающийся PG. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления композиция интактных антител может содержать популяции антител, в которых все остатки K447 и/или остатки G446 + K447 удалены. В некоторых вариантах осуществления композиция интактных антител может содержать популяции антител без удаления остатка K447 и/или остатков G446 + K447. В некоторых вариантах осуществления композиция интактных антител содержит популяции антител, содержащие смесь антител с остатками K447 и/или остатками G446 + K447 и без них.

### Метод рекомбинации

Полипептид TАСI или слитый белок (например, слитый белок TАСI и антитела) может быть получен с использованием рекомбинантных методов. Для этих методов предложены одна или более выделенных нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид или слитый белок.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид или слитый белок, описанные выше. Каждая

из таких нуклеиновых кислот может независимо кодировать любую из полипептидных цепей, описанных выше. В другом аспекте настоящего изобретения предложены один или более векторов (например, векторов экспрессии), содержащих такие нуклеиновые кислоты. В другом аспекте настоящего изобретения предложена клетка-хозяин, содержащая такие нуклеиновые кислоты. В одном варианте осуществления предложен способ получения полипептида или слитого белка, включающий культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид или слитый белок, как предложено выше, в условиях, подходящих для экспрессии, и необязательно сбор антитела из клетки-хозяина (или среды клетки-хозяина).

10 Для рекомбинантного получения полипептида или слитого белка нуклеиновую кислоту, кодирующую белок, выделяют и встраивают в один или более векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такие нуклеиновые кислоты могут быть легко выделены и секвенированы с использованием обычных методов или получены рекомбинантными методами, или получены химическим синтезом.

15 Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии вектора, кодирующего полипептид или слитый белок, включают прокариотические или эукариотические клетки, описанные в настоящем документе. Например, полипептид или слитый белок могут быть получены в бактерии, в частности, когда гликозилирование и эффекторные функции Fc не требуются. После экспрессии полипептид или слитый белок может быть выделен из бактериальной клеточной пасты в растворимой фракции и может быть дополнительно очищен.

Помимо прокариот, эукариотические микроорганизмы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи, являются подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих слитые белки, включая штаммы грибов и дрожжей. Подходящие клетки-хозяева для экспрессии слитого белка также могут быть получены из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных); примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Был идентифицирован ряд штаммов бакуловирусов, которые могут быть использованы в комбинации с клетками насекомых, в частности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*; культуры растительных клеток также могут быть использованы в качестве хозяев, см., например, US 25 5959177, US 6040498, US 6420548, US 7125978 и US 6417429; клетки позвоночных также могут быть использованы в качестве хозяев, например, линии клеток млекопитающих, адаптированные для роста в суспензии. Другие примеры подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих включают линию почки обезьяны CV1, трансформированную SV40 (COS- 30 7); линию эмбриональной почки человека (клетки 293 или 293T); клетки почки

новорожденного хомяка (ВНК); клетки Сертоли мышцы (клетки ТМ4); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки африканской зеленой обезьяны (VERO-76); клетки рака шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK); клетки печени крысы Buffalo (BRL3A); клетки легких человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI; клетки MRC5 и клетки FS4. Другие подходящие линии клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичника китайского хомячка (CHO), включая клетки DHFR-CHO; и линии клеток миеломы, такие как Y0, NS0 and Sp2/0. Обзоры отдельных линий клеток-хозяев млекопитающих, подходящих для продукции полипептида или слитого белка, см., например, в Yazaki, P. and Wu, A.M., *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B.K.C. (eds.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), стр. 255-268.

### **Анализ**

Полипептид или слитый белок, предложенные в настоящем документе, могут быть идентифицированы, подвергнуты скринингу или охарактеризованы с точки зрения их физических/химических характеристик и/или биологической активности с помощью различных анализов, известных в данной области техники. В одном аспекте полипептид или слитый белок согласно настоящему изобретению тестируют на активность, например, с помощью известных методов, таких как ELISA, вестерн-блоттинг и тому подобное.

### **Способ лечения и способ введения**

Любой из полипептидов TAC1 или их слитых белков (например, слитых белков антител), предложенных в настоящем документе, может быть использован в способе лечения. В еще одном аспекте настоящего изобретения предложено применение полипептида TAC1 или его слитого белка для изготовления или получения лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления В-клеточное расстройство или аутоиммунное заболевание представляет собой заболевание или патологическое состояние, связанное с экспрессией TAC1. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из системной красной волчанки, миастении гравис, рассеянного склероза, инсулинозависимого сахарного диабета, болезни Крона, ревматоидного артрита, полиартикулярного ювенильного ревматоидного артрита и псориатического артрита; В-клеточное расстройство выбрано из группы, состоящей из опухолей, хронического лейкоцитарного лейкоза, множественной миеломы, неходжкинской лимфомы, посттрансплантационного лимфопролиферативного расстройства и гаммапатии легких цепей. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное заболевание представляет собой системную красную волчанку. В одном из таких вариантов осуществления применение дополнительно включает введение субъекту эффективного

количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента (например, одного, двух, трех, четырех, пяти или шести дополнительных терапевтических агентов). «Субъект» в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления может представлять собой человека.

5 В еще одном аспекте предложена фармацевтическая композиция, содержащая полипептид или слитый белок, например, для любого из вышеуказанных фармацевтических применений или способов лечения. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит любой из полипептидов или слитых белков, предложенных в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В другом варианте  
10 осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент.

Полипептиды или слитые белки согласно настоящему изобретению могут быть использованы отдельно или в комбинации с дополнительными агентами для лечения. Например, антитело согласно настоящему изобретению может быть введено совместно с по  
15 меньшей мере одним дополнительным терапевтическим агентом.

Полипептиды или слитые белки согласно настоящему изобретению (и любые дополнительные терапевтические агенты) могут быть введены любым подходящим способом, включая парентеральное, внутрилегочное и интраназальное введение, и, если требуется при локальном лечении, внутриочаговое введение. Парентеральная инфузия  
20 включает внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Введение может быть осуществлено любым подходящим способом, например, путем инъекции, такой как внутривенная или подкожная инъекция, в зависимости от того, является ли введение краткосрочным или долгосрочным. В настоящем документе рассматриваются различные схемы введения, включая, не ограничиваясь  
25 перечисленным, однократное введение или многократное введение в несколько моментов времени, болюсное введение и импульсную инфузию.

Полипептид или слитый белок согласно настоящему изобретению будут составлять, вводить и применять в соответствии с надлежащей медицинской практикой (GMP). Факторы, рассматриваемые в этом контексте, включают конкретное патологическое  
30 состояние, подлежащее лечению, конкретное вскармливающее, подлежащее лечению, клиническое состояние отдельного пациента, причину патологического состояния, место доставки агента, способ введения, время введения и другие факторы, известные практикующим врачам. Полипептид или слитый белок может быть составлен с одним или более агентами, применяемыми в настоящее время для предотвращения или лечения  
35 патологического состояния, или без них. Эффективное количество таких дополнительных

агентов зависит от количества, присутствующего в фармацевтической композиции, типа патологического состояния или лечения и других факторов. Как правило, их применяют в таких же дозировках и посредством тех же способов введения, как описано в настоящем документе, или в дозировке, составляющей от около 1 до 99% от дозировок, описанных в настоящем документе, или в других дозировках, и посредством любого способа введения, эмпирически/клинически определенного как подходящий.

Для предотвращения или лечения заболевания подходящая дозировка полипептида или слитого белка согласно настоящему изобретению (при использовании отдельно или в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими агентами) будет зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа терапевтической молекулы, тяжести и течения заболевания, цели введения (профилактическое или терапевтическое), предыдущего лечения, клинического анамнеза и ответа на терапевтическую молекулу пациента и усмотрения лечащего врача. Терапевтическую молекулу подходящим образом вводят пациенту в ходе одной или серии процедур.

### **Изделие**

В другом аспекте настоящего изобретения предложено изделие, которое содержит материалы, пригодные для лечения, предотвращения и/или диагностики вышеуказанного состояния. Изделие содержит контейнер и этикетку или вкладыш в упаковку на контейнере или связанные с ним. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы, пакеты с раствором для в/в введения и тому подобное. Контейнер может быть изготовлен из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит композицию, эффективную при лечении, предотвращении и/или диагностике заболевания, отдельно или в комбинации с другой композицией, и может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет с раствором для внутривенного введения или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций). По меньшей мере один активный агент в композиции представляет собой полипептид ТАСІ или слитый белок согласно настоящему изобретению. На этикетке или вкладыше в упаковку указано, что композиция предназначена для применения для лечения выбранного патологического состояния. Кроме того, изделие может содержать: (а) первый контейнер, содержащий композицию, где композиция содержит полипептид ТАСІ или слитый белок согласно настоящему изобретению; и (b) второй контейнер, содержащий композицию, где композиция содержит другие цитотоксические агенты или дополнительные терапевтические агенты. Изделие в этом варианте осуществления настоящего изобретения может дополнительно содержать вкладыш в упаковку, указывающий, что композиция может применяться для лечения конкретного патологического состояния. В качестве альтернативы

или дополнительно, изделие может дополнительно содержать второй (или третий) контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер. С коммерческой и пользовательской точки зрения оно может дополнительно содержать другие материалы по мере необходимости, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

5

### Примеры и тестовые примеры

Настоящее изобретение дополнительно описано ниже со ссылкой на следующие примеры и тестовые примеры, которые, однако, не ограничивают настоящее изобретение. Экспериментальные методы в примерах и тестовых примерах согласно настоящему изобретению, в которых не указаны конкретные условия, обычно проводили в обычных условиях, таких как «Antibodies: A Laboratory Manual» и «Molecular Cloning: A Laboratory Manual» от Cold Spring Harbor Laboratory, или в условиях, рекомендованных производителями исходных материалов или коммерческих продуктов. Реагенты без указания конкретного происхождения являются коммерчески доступными обычными реагентами.

15

### Пример 1. Анализ и конструирование последовательности TACI

Из-за наличия нескольких сайтов расщепления протеазой в последовательности TACI полноразмерный TACI очень восприимчив к расщеплению после экспрессии. В этом эксперименте были сконструированы сегменты последовательностей TACI различной длины, и были введены аминокислотные мутации в легко расщепляемые положения TACI, чтобы сделать последовательности более стабильными. Иллюстративные последовательности TACI представляют собой следующие:

> TACI-0 (аминокислотные остатки в положениях 1-165 TACI человека дикого типа)

MSGLGRSRRGGRSRVDQEERFPQGLWTGVAMRSCPEEQYWDPLLGTCSCKTICNHQS  
QRTCAAFCRSLSCRKEQGKIFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPVNLPPEL  
RRQRSGEVENNSDNSGRYQGLEHRGSEASPALPGLKLSADQVALVYS

SEQ ID NO: 1

> TACI-1

SGLGRSRKGGKSRVDQEERFPQGLWTGVAMRSCPEEQYWDPLLGTCSCKTICNHQSQ  
RTCAAFCRSLSCRKEQGKIFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPVNLPPELR  
KQRSGEVEQNSDNSGKYQGLEHRGSEASPALPGLKLSADQVALVYS

SEQ ID NO: 2

> TACI-2

SGLGRSRKGGKSRVDQEERFPQGLWTGVAMRSCPEEQYWDPLLGTCSCKTICNHQSQ

35

RTCAAFCRSLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPVNLPPELR  
KQRSGEVENNSDNSG

SEQ ID NO: 3

&gt; TACI-3

5 SGLGRSRKGGKSRVDQEERFPQGLWTGVAMRSCPEEQYWDPLLGTCSCKTICNHQSQ  
RTCAAFCRSLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPVNLPPELR  
KQRSGEVE

SEQ ID NO: 4

&gt; TACI-4

10 GGRSRVDQEERFPQGLWTGVAMRSCPEEQYWDPLLGTCSCKTICNHQSQRTCAAFCR  
SLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPVNLPPELRKQRSGEVE  
NNSDNSGKYQGLEHRGSEASPALPGLKLSADQVALVYS

SEQ ID NO: 5

&gt; TACI-5

15 GGRSRVDQEERFPQGLWTGVAMRSCPEEQYWDPLLGTCSCKTICNHQSQRTCAAFCR  
SLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPVNLPPELRKQRSGEVE  
NNSDNSG

SEQ ID NO: 6

&gt; TACI-6

20 GGRSRVDQEERFPQGLWTGVAMRSCPEEQYWDPLLGTCSCKTICNHQSQRTCAAFCR  
SLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPVNLPPELRKQRSGEVE

SEQ ID NO: 7

&gt; TACI-7

25 FPQGLWTGVAMRSCPEEQYWDPLLGTCSCKTICNHQSQRTCAAFCRSLSCRKEQGK  
FYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPVNLPP

SEQ ID NO: 8

&gt; TACI-8

30 SLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPVNLPPELRKQRSGEVE  
NNSDNSGKYQGLEHRGSEASPALPGLKLSADQVALVYS

SEQ ID NO: 9

&gt; TACI-9

35 SLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKL

SEQ ID NO: 10

&gt; Последовательность Fc человеческого IgG

DKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD

GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKA  
 KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD  
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 11

- 5 С-конец вышеуказанных фрагментов полипептида TACI непосредственно сливали с N-концом Fc (SEQ ID NO: 11) человеческого IgG для конструирования слитых белков TACI-Fc, каждый из которых был трансфицирован и экспрессирован в 293Е (эмбриональная клетка почки человека, модифицированная геном EBNA1), и очищен с получением слитых белков TACI-Fc, содержащих два одинаковых полипептида (структуру см. на ФИГ. 1).
- 10 Положительный контроль RCT-18 (телитаццент) представляет собой слитый белок TACI-Fc, сконструированный из двух одинаковых последовательностей:

> Аминокислотная последовательность RCT-18

SRVDQEERFPQGLWTGVAMRSCPEEQYWDPLLGTCMSCKTICNHQSQRTCAAFCRSLSC

RKEQGKFYDHLRLDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPVNLPPELDKTHTCPPCPAPE

- 15 AEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP  
 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL  
 LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT  
 VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 12

- 20 Примечание: в последовательности RCT-18 подчеркнутая часть обозначает последовательность TACI (положения 13-118 внеклеточной области TACI человека), а неподчеркнутая часть обозначает последовательность Fc.

- Полученные слитые белки TACI-Fc анализировали с помощью масс-спектрометрии. Результаты эксперимента представлены в таблице 4. Результаты эксперимента показали, что
- 25 фрагментов расщепления TACI не было обнаружено в TACI-7Fc или TACI-9Fc, но фрагменты расщепления TACI были обнаружены в RCT-18 положительного контроля и других слитых белках TACI-Fc, например, TACI-2 Fc; даже несмотря на то, что лабильные аминокислоты (аргинин) в сайтах расщепления протеазой (9, 12, 120) были заменены более стабильными аминокислотами (лизин), фрагменты расщепления TACI, тем не менее,
- 30 были обнаружены. Расщепление RCT-18 дополнительно анализировали (см. тестовый пример 8 настоящей заявки), и были обнаружены фрагменты расщепления TACI, расщепленные в положениях 1 и 2 N-конца RCT-18.

Таблица 4. Анализ расщепления слитых белков TACI-Fc

Слитый	Фрагмент TACI	Результаты
--------	---------------	------------

белок	Сайт начала TACI	Сайт окончания TACI	Одновременное введение мутаций для обеспечения стабильности	анализа расщепления методом масс-спектрометрии
TACI-1 Fc	2	165	R9K,R12K,R120K,R135K,N128Q	Расщепление
TACI-2 Fc	2	134	R9K,R12K,R120K	Расщепление
TACI-3 Fc	2	127	R9K,R12K,R120K	Расщепление
TACI-4 Fc	10	165	R120K,R135K	Расщепление
TACI-5 Fc	10	134	R120K	Расщепление
TACI-6 Fc	10	127	R120K	Расщепление
TACI-7 Fc	21	116	Мутация отсутствует	Расщепление отсутствует
TACI-8 Fc	68	165	R120K,R135K	Расщепление
TACI-9 Fc	68	108	Мутация отсутствует	Расщепление отсутствует
RCT-18	13	118	Мутация отсутствует	Расщепление

Примечание: положения в таблице представляют собой положения остатков (пронумерованные в естественном порядке) относительно TACI-0 (SEQ ID NO: 1). Например, «R120K» обозначает, что аминокислотный остаток в положении 120 (пронумерованный в естественном порядке) полипептида TACI-0 мутирован из R в K; слитый белок «TACI-5 Fc» представляет собой слитый белок TACI-Fc, в котором С-конец TACI-5 (состоящий из аминокислотных остатков в положениях 10-134 TACI-0 после мутации R120K) непосредственно слит с N-концом Fc (SEQ ID NO: 11) человеческого IgG.

Вышеуказанный слитый белок TACI-Fc анализировали на функцию блокирования связывания BAFF с BAFF-R (метод анализа см. в тестовом примере 2). Результаты эксперимента представлены в таблице 5. Результаты эксперимента показали, что функциональная активность TACI-9 Fc в отношении блокирования связывания BAFF с BAFF-R была значительно сильнее, чем у контрольного RCT-18.

Таблица 5. Активность слитых белков TACI-Fc в отношении блокирования связывания BAFF с BAFF-R

Слитый белок TACI	Значение IC <sub>50</sub> (нМ) TACI-Fc для блокирования связывания BAFF с BAFF-R
TACI-1 Fc	44,72
TACI-2 Fc	42,85
TACI-3 Fc	826,00
TACI-4 Fc	33,48
TACI-5 Fc	25,40
TACI-6 Fc	18,50
TACI-7 Fc	27,86

TACI-8 Fc	22,51
TACI-9 Fc	5,02
RCT-18	27,48

### Пример 2. Анализ усечения TACI

Последовательность TACI дополнительно усекали на основе TACI-9, и усеченный фрагмент TACI анализировали на функциональную активность. Последовательности усеченных фрагментов TACI представляют собой следующие:

> TACI-10 (усечение на С-конце TACI-9 на 1 аминокислоту «L»)

SLSCRKEQGKIFYDHLLRDCISCASICGQHHPKQCAAYFCENK

SEQ ID NO: 13

> TACI-11 (усечение на С-конце TACI-9 на 2 аминокислоты «KL»)

10 SLSCRKEQGKIFYDHLLRDCISCASICGQHHPKQCAAYFCEN

SEQ ID NO: 14

> TACI-12 (усечение на С-конце TACI-9 на 3 аминокислоты «NKL»)

SLSCRKEQGKIFYDHLLRDCISCASICGQHHPKQCAAYFCE

SEQ ID NO: 15

15 > TACI-13 (усечение на С-конце TACI-9 на 4 аминокислоты «ENKL»)

SLSCRKEQGKIFYDHLLRDCISCASICGQHHPKQCAAYFC

SEQ ID NO: 16

> TACI-14 (усечение на С-конце TACI-9 на 5 аминокислот «CENKL»)

SLSCRKEQGKIFYDHLLRDCISCASICGQHHPKQCAAYF

20 SEQ ID NO: 17

С-конец вышеуказанных усеченных фрагментов TACI непосредственно сливали с N-концом Fc (SEQ ID NO: 11) человеческого IgG для конструирования слитых белков TACI-Fc, каждый из которых был трансфицирован и экспрессирован в 293E (эмбриональная клетка почки человека, модифицированная геном EBNA1), и очищен с получением слитых белков TACI-Fc, содержащих два одинаковых полипептида (структуру см. на ФИГ. 1).

Полученные выше слитые белки TACI-Fc анализировали с помощью масс-спектрометрии. Результаты эксперимента представлены в таблице 6-1. Результаты эксперимента показали, что ни один из слитых белков TACI-Fc, сконструированных с усеченными фрагментами TACI-9, не имел обнаружимого расщепления полипептида TACI.

30 Кроме того, сконструированные слитые белки TACI-Fc анализировали на активность связывания с BAFF (метод эксперимента см. в анализе связывания ELISA (покрытие антигенным белком) в тестовом примере 1 настоящего изобретения) и на функциональное блокирование для блокирования связывания BAFF с BAFF-R (метод эксперимента см. в

тестовом примере 2 настоящего изобретения). Результаты эксперимента представлены в таблице 6-1. Результаты эксперимента показали, что слитые белки TACI-10 Fc, TACI-11 Fc и TACI-12 Fc, сконструированные с усеченными фрагментами TACI-9 TACI-10, TACI-11 и TACI-12, имели тот же уровень активности связывания с BAFF и функциональной активности блокирования связывания BAFF с BAFF-R, что и слитый белок TACI-9Fc, в то время как слитые белки, сконструированные с усеченными фрагментами TACI-13 и TACI-14, имели значительно более слабую функцию блокирования связывания BAFF с BAFF-R, чем слитый белок TACI-9Fc.

Таблица 6-1. Результаты анализа функциональной активности и расщепления слитых белков TACI-Fc с помощью масс-спектрометрии

Слитый белок	Анализ расщепления TACI	EC <sub>50</sub> (нМ) для связывания TACI-Fc с BAFF	IC <sub>50</sub> (нМ) TACI-Fc для блокирования связывания BAFF с BAFF-R
TACI-9 Fc	Расщепление отсутствует	0,4903	2,09
TACI-10 Fc	Расщепление отсутствует	0,5606	2,7
TACI-11 Fc	Расщепление отсутствует	0,5841	2,621
TACI-12 Fc	Расщепление отсутствует	0,8944	3,862
TACI-13 Fc	Расщепление отсутствует	3,661	30,11
TACI-14 Fc	Расщепление отсутствует	64,2	780,1

Последовательности дополнительных усеченных фрагментов TACI представлены следующим образом:

> Аминокислотная последовательность TACI-16 (усечение на С-конце TACI-9 на 3 аминокислоты «NKL» и на N-конце на 1 аминокислоту «S») (SEQ ID NO: 68):

LSCRKEQGKIFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCA YFCE

> Аминокислотная последовательность TACI-17 (усечение на С-конце TACI-9 на 3 аминокислоты «NKL» и на N-конце на 2 аминокислоты «SL») (SEQ ID NO: 69):

SCRKEQGKIFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCA YFCE

> Аминокислотная последовательность TACI-18 (усечение на С-конце TACI-9 на 3 аминокислоты «NKL» и на N-конце на 3 аминокислоты «SLS») (SEQ ID NO: 70):

CRKEQGKIFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCA YFCE

> Аминокислотная последовательность TACI-19 (усечение на С-конце TACI-9 на 3 аминокислоты «NKL» и на N-конце на 4 аминокислоты «SLSC») (SEQ ID NO: 71):

RKEQGKIFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAIFYCE

> Аминокислотная последовательность TACI-20 (усечение на С-конце TACI-9 на 3 аминокислоты «NKL» и на N-конце на 5 аминокислот «SLSCR») (SEQ ID NO: 72):

KEQGKIFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAIFYCE

5 > Аминокислотная последовательность TACI-21 (усечение на С-конце TACI-9 на 3 аминокислоты «NKL» и на N-конце на 6 аминокислот «SLSCRK») (SEQ ID NO: 73):

EQGKIFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAIFYCE

10 С-конец вышеуказанных усеченных фрагментов TACI непосредственно сливали с N-концом Fc (SEQ ID NO: 11) человеческого IgG для конструирования слитых белков TACI-Fc, каждый из которых был трансфицирован и экспрессирован в 293E (эмбриональная клетка почки человека, модифицированная геном EBNA1), и очищен с получением слитых белков TACI-Fc, содержащих два одинаковых полипептида (структуру см. на ФИГ. 1).

15 Полученные выше слитые белки TACI-Fc анализировали с помощью масс-спектрометрии. Результаты эксперимента представлены в таблице 6-2. Результаты эксперимента показали, что ни один из слитых белков TACI-Fc, сконструированных с усеченными фрагментами TACI-9, не имел обнаружимого расщепления полипептида TACI.

20 Кроме того, сконструированные слитые белки TACI-Fc анализировали на активность связывания с BAFF (метод эксперимента см. в анализе связывания ELISA (покрытие антигенным белком) в тестовом примере 1 настоящего изобретения) и на функциональное блокирование для блокирования связывания BAFF с BAFF-R (метод эксперимента см. в тестовом примере 2 настоящего изобретения). Результаты эксперимента представлены в таблице 6-2. Результаты эксперимента показали, что слитые белки TACI-Fc, сконструированные с усеченными фрагментами TACI-9 TACI-16, TACI-17 и TACI-18 TACI-9, обладали хорошей активностью связывания с BAFF и функциональной активностью блокирования связывания BAFF с BAFF-R, в то время как слитый белок TACI-Fc, сконструированный с усеченными фрагментами TACI-19, TACI-20 и TACI-21, обладал значительно более слабой блокирующей активностью.

Таблица 6-2. Результаты анализа функциональной активности и расщепления слитых белков TACI-Fc с помощью масс-спектрометрии

Слитый белок	Анализ расщепления TACI	EC <sub>50</sub> (нМ) для связывания TACI-Fc с BAFF	IC <sub>50</sub> (нМ) TACI-Fc для блокирования связывания BAFF с BAFF-R
TACI-16Fc	Расщепление отсутствует	0,5987	2,224
TACI-17Fc	Расщепление отсутствует	0,9958	2,824
TACI-18Fc	Расщепление	0,9924	3,256

	отсутствует		
TACI-19Fc	Расщепление отсутствует	4,988	2219
TACI-20Fc	Расщепление отсутствует	7,188	2361
TACI-21Fc	Расщепление отсутствует	9,798	2524

### Пример 3. Конструирование последовательности TACI

Белки TACI легко агрегировать в нейтральном растворе. Для дальнейшего улучшения стабильности TACI гидрофобные группы и ионные группы в фрагментах TACI анализировали на основе кристаллической структуры TACI (PDB ID: 1XU1) с использованием программного обеспечения МОЕ (молекулярная рабочая среда), и осуществляли аминокислотные замены при аминокислотных остатках в положениях 2, 5, 6, 10, 18, 35 и/или 36 TACI-9, так что площади открытых гидрофобных групп и ионных групп белков TACI уменьшились, агрегация TACI снизилась, а стабильность TACI улучшилась, в то же время в основном оставаясь функциональной активностью TACI. Аминокислотные последовательности сконструированных фрагментов TACI представляют собой следующие:

> TACI-9-1 (TACI-9 с заменой L2T)

**S**TSCRKEQGKFDHLLRDCISCASICGQHPKQCAAYFCENKL

15 SEQ ID NO: 18

> TACI-9-2 (TACI-9 с мутацией R5S)

SLSCSKEQGKFDHLLRDCISCASICGQHPKQCAAYFCENKL

SEQ ID NO: 19

> TACI-9-3 (TACI-9 с мутацией K6E)

20 SLSCREEQGKFDHLLRDCISCASICGQHPKQCAAYFCENKL

SEQ ID NO: 20

> TACI-9-4 (TACI-9 с мутацией K6Q)

SLSCRQEQGKFDHLLRDCISCASICGQHPKQCAAYFCENKL

SEQ ID NO: 21

25 > TACI-9-5 (TACI-9 с мутацией K10E)

SLSCRKEQGEFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAAYFCENKL

SEQ ID NO: 22

> TACI-9-6 (TACI-9 с мутациями L2R и D18T)

**S**RSCRKEQGKFDHLLRTCISCASICGQHPKQCAAYFCENKL

30 SEQ ID NO: 23

> TACI-9-7 (TACI-9 с мутациями L2R и D18A)

SRSCRKEQGKIFYDHLLRACISCASICGQHHPKQCAYFCENKL

SEQ ID NO: 24

> TACI-9-8 (TACI-9 с мутацией Y35A)

5 SLSCRKEQGKIFYDHLLRDCISCASICGQHHPKQCAAFCENKL

SEQ ID NO: 25

> TACI-9-9 (TACI-9 с мутациями L2R, D18T и Y35R)

SRSCRKEQGKIFYDHLLRTCISCASICGQHHPKQCARFCENKL

SEQ ID NO: 26

10 > TACI-9-10 (TACI-9 с мутациями K6E и K10E)

SLSCREEQGEFYDHLLRDCISCASICGQHHPKQCAYFCENKL

SEQ ID NO: 27

> TACI-9-11 (TACI-9 с мутациями R5S, K6E и K10E)

15 SLSCSEEQGEFYDHLLRDCISCASICGQHHPKQCAYFCENKL

SEQ ID NO: 28

> TACI-9-12 (TACI-9 с мутациями L2T и Y35A)

STSCRKEQGKIFYDHLLRDCISCASICGQHHPKQCAAFCENKL

SEQ ID NO: 29

> TACI-9-13 (TACI-9 с мутациями L2T и F36Y)

20 STSCRKEQGKIFYDHLLRDCISCASICGQHHPKQCAYFCENKL

SEQ ID NO: 30

> TACI-9-14 (TACI-9 с мутациями L2T, Y35A и F36Y)

STSCRKEQGKIFYDHLLRDCISCASICGQHHPKQCAAYFCENKL

SEQ ID NO: 31

25 > TACI-9-15 (TACI-9 с мутациями L2T, K6E, K10E и Y35A)

STSCREEQGEFYDHLLRDCISCASICGQHHPKQCAAFCENKL

SEQ ID NO: 32

Примечание: в приведенных выше последовательностях подчеркнутые части обозначают аминокислотные остатки после мутации.

30 С-конец вышеуказанных фрагментов TACI, полученных с помощью конструирования на основе TACI-9, сливали с N-концом Fc (SEQ ID NO: 11) человеческого IgG для конструирования слитых белков TACI-Fc (структуры сконструированных слитых белков см. на ФИГ. 1), которые трансфицировали и экспрессировали в 293E (эмбриональные клетки почек человека, модифицированные геном EBNA1) и очищали с помощью  
35 аффинной хроматографии с белком А с получением слитых белков TACI-Fc, содержащих

два одинаковых полипептида.

Сконструированные слитые белки TACI-Fc анализировали на активность связывания с BAFF (метод эксперимента см. в анализе связывания ELISA (покрытие антигенным белком) в тестовом примере 1 настоящего изобретения). Результаты эксперимента представлены в таблице 7:

Таблица 7. Активность слитых белков TACI-Fc в отношении связывания с BAFF

Слитый белок TACI-Fc	Положения мутаций в последовательности TACI	EC <sub>50</sub> (нМ) для связывания слитого белка TACI-Fc с BAFF
TACI-9Fc	Отсутствуют	0,4181
TACI-9-1Fc	L2T	0,3820
TACI-9-2Fc	R5S	0,2785
TACI-9-3Fc	K6E	0,2654
TACI-9-4Fc	K6Q	0,4695
TACI-9-5Fc	K10E	0,1456
TACI-9-6Fc	L2R,D18T	0,3672
TACI-9-7Fc	L2R,D18A	0,7273
TACI-9-8Fc	Y35A	0,1999
TACI-9-9Fc	L2R,D18T,Y35R	0,9368
TACI-9-10Fc	K6E,K10E	0,1199
TACI-9-11Fc	R5S,K6E,K10E	0,1950
TACI-9-12Fc	L2T, Y35A	0,1223
TACI-9-13Fc	L2T, F36Y	0,4327
TACI-9-14Fc	L2T, Y35A,F36Y	0,2233
TACI-9-15Fc	L2T,K6E,K10E,Y35A	0,0869

Примечание: положения мутаций в таблице представляют собой положения аминокислотных остатков (пронумерованные в естественном порядке) относительно TACI-9. Например, «L2T» обозначает, что аминокислотный остаток в положении 2 (пронумерованном в естественном порядке) последовательности SEQ ID NO: 10 мутирован из исходного «L» в «T».

Кроме того, часть слитых белков TACI-Fc, полученных очисткой, каждый подвергали замене буфера на раствор PBS при pH 7,4 с использованием пробирки для ультрафильтрации, и наблюдали внешний вид раствора, чтобы определить, имело ли место осаждение в растворе слитого белка TACI-Fc. Результаты эксперимента представлены в таблице 8. Результаты эксперимента показали, что в растворе слитых белков TACI-Fc, сконструированных с помощью сконструированных фрагментов TACI, не было осаждения, в то время как в растворе RCT-18 в PBS было осаждение.

Таблица 8. Осаждение слитых белков TACI-Fc в растворе PBS

Слитый белок TACI-Fc	Наличие или отсутствие осаждения
----------------------	----------------------------------

TACI-9-2Fc	Отсутствует
TACI-9-3Fc	Отсутствует
TACI-9-4Fc	Отсутствует
TACI-9-5Fc	Отсутствует
TACI-9-8Fc	Отсутствует
TACI-9-10Fc	Отсутствует
TACI-9-11Fc	Отсутствует
TACI-9-12Fc	Отсутствует
TACI-9-13Fc	Отсутствует
TACI-9-14Fc	Отсутствует
TACI-9-15Fc	Отсутствует
RCT-18	Присутствует

Кроме того, значения pI части слитых белков TACI-Fc анализировали с помощью системы «18cProt/TrEMBL», и результаты анализа представлены в таблице 9:

Таблица 9. Значения pI слитых белков TACI-Fc

Слитый белок TACI-Fc	значение pI
TACI-9 Fc	8,3
TACI-9-3 Fc	7,3
TACI-9-5 Fc	7,3
TACI-9-10 Fc	5,7
TACI-9-11 Fc	5,0
TACI-9-15 Fc	5,7

5

Кроме того, каждый из слитых белков TACI-Fc в концентрации 40 мг/мл подвергали замене буфера на раствор PBS при pH 7,4, раствор помещали в инкубатор с постоянной температурой при 40 °C для ускоренного испытания стабильности, в котором образцы отбирали каждую неделю для анализа чистоты с помощью SEC (эксклюзионная хроматография); результат эксперимента представлен в таблице 10. Результат эксперимента показал, что слитый белок TACI-9-15Fc обладал наилучшими характеристиками стабильности, и после хранения при постоянной температуре 40 °C в течение по меньшей мере четырех недель все еще имел чистоту более 94%.

10

Таблица 10. Изменение чистоты по SEC слитых белков TACI-Fc в растворе PBS

Название образца	TACI-9Fc	TACI-9-10Fc	TACI-9-15Fc
------------------	----------	-------------	-------------

Чистота по SEC (%)	Вначале	97,14%	85,38%	96,52%
	1 неделя	59,18%	83,27%	95,66%
	2 недели	57,13%	83,11%	95,19%
	3 недели	55,99%	82,73%	95,00%
	4 недели	48,37%	80,23%	94,54%

#### Пример 4. Конструирование слитых белков TACI-Fc

TACI-9-15 или его усеченные формы (TACI-9-15a, TACI-9-15b и TACI-9-15c) сливали с Fc человеческого IgG для конструирования двухвалентных или четырехвалентных слитых белков TACI-Fc. Схематические структурные схемы сконструированных слитых белков TACI-Fc показаны на ФИГ. 1, 2 и 3.

> Последовательность TACI-9-15a

STSCREEQGEFYDHLRLDCISCASICGQHHPKQCAAFCE

SEQ ID NO: 33

10 > Последовательность TACI-9-15b

STSCREEQGEFYDHLRLDCISCASICGQHHPKQCAAFCE

SEQ ID NO: 34

> Последовательность TACI-9-15c

STSCREEQGEFYDHLRLDCISCASICGQHHPKQCAAFCE

15 SEQ ID NO: 35

Полноразмерные последовательности сконструированных слитых белков TACI-Fc представляют собой следующие:

> Последовательность слитого белка TACI-9-15Fc1

STSCREEQGEFYDHLRLDCISCASICGQHHPKQCAAFCENKLEPKSSDKTHTCPPCPAPELL  
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP  
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD  
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

SEQ ID NO: 36

25 > Последовательность слитого белка TACI-9-15Fc2

STSCREEQGEFYDHLRLDCISCASICGQHHPKQCAAFCENEPKSSDKTHTCPPCPAPELLG  
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS  
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK  
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

30 SEQ ID NO: 37

> Последовательность слитого белка TACI-9-15Fc3

STSCREEQGEFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAAFCEEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGP  
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR  
5 DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS  
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 38

> Последовательность слитого белка TACI-9-15Fc4

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD  
10 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK  
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV  
LSDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSSTSCREE  
QGEFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAAFCENK

SEQ ID NO: 39

15 > Последовательность слитого белка TACI-9-15Fc5

STSCREEQGEFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAAFCEDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLF  
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK  
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ  
20 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 40

> Последовательность слитого белка TACI-9-15Fc6

STSCREEQGEFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAAFCEEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAP  
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
25 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR  
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS  
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 41

> Последовательность слитого белка TACI-9-15Fc7

30 STSCREEQGEFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAAFCEEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAP  
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR  
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS  
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSSTSCREEQGEFYDHLLRDCISCAS  
35 ICGQHPKQCAAFCEQK

SEQ ID NO: 42

&gt; Последовательность слитого белка TACI-9-15Fc8

STSCREEQGEFYDHLRLDCISCASICGQHPKQCAAFCEEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAP  
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
 5 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR  
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS  
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSSTSCREEQGEFYDHLRLDCISCAS  
ICGQHPKQCAAFCESK

SEQ ID NO: 43

10 &gt; Последовательность слитого белка TACI-9-15Fc9

STSCREEQGEFYDHLRLDCISCASICGQHPKQCAAFCEEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAP  
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR  
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS  
 15 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSSTSCREEQGEFYDHLRLDCISCAS  
ICGQHPKQCAAFCESS

SEQ ID NO: 44

Примечание: в полноразмерной последовательности слитого белка TACI-Fc часть с  
 одинарным подчеркиванием обозначает последовательность TACI, часть с волнистой  
 20 линией обозначает последовательность Fc человеческого IgG, часть, выделенная  
 полужирным шрифтом, обозначает линкерную последовательность, и часть, выделенная  
 курсивом, обозначает защитную аминокислоту.

Иллюстративные последовательности Fc:

&gt; Последовательность Fc 1 человеческого IgG

25 DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD  
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK  
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL  
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 61

30 &gt; Последовательность Fc 2 человеческого IgG

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD  
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK  
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL  
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

35 SEQ ID NO: 62

> Последовательность Fc 3 человеческого IgG

DKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD  
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKA  
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD  
5 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 63

Иллюстративные линкерные последовательности:

> Линкерная последовательность 1

EPKSS SEQ ID NO: 64

10 > Линкерная последовательность 2

GGGS SEQ ID NO: 65

> Линкерная последовательность 3

GGGGS SEQ ID NO: 66

> Линкерная последовательность 4

15 GGGGSGGGGSGGGGS SEQ ID NO: 67

### Пример 5. Конструирование слитых белков TAC1 и антитела

Легкие и/или тяжелые цепи антитела к субъединице р40 IL-12/IL-23 устекиномаба сливали с полипептидом TAC1 для конструирования слитого белка TAC1 и антитела, TAC1-  
20 Mab.

Последовательности антитела устекиномаб представлены ниже:

> Вариабельная область тяжелой цепи устекиномаба

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWLGWVRQMPGKGLDWIGIMSPVDS DIR  
YSPSFQGQVTMSVDKSITTAYLQWNSLKASDTAMY CARRRPGQGYFDFWGGTLVTV  
25 SS

SEQ ID NO: 45

> Вариабельная область легкой цепи устекиномаба

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSR  
FSGSGGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYNIYPYTFGGGTKLEIK

30 SEQ ID NO: 46

> Тяжелая цепь устекиномаба

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWLGWVRQMPGKGLDWIGIMSPVDS DIR  
YSPSFQGQVTMSVDKSITTAYLQWNSLKASDTAMY CARRRPGQGYFDFWGGTLVTV  
SSSSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQS  
35 SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG

GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPS  
 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK  
 SRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5 SEQ ID NO: 47

> Легкая цепь устекинумаба

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISSWLA WYQOKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSR  
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDE FATYYCOQYNIYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ  
 LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSK  
 10 ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 48

Примечание: в приведенных выше последовательностях тяжелой и легкой цепей  
 устекинумаба часть с двойным подчеркиванием обозначает последовательность  
 15 вариабельной области, а неподчеркнутая часть обозначает последовательность константной  
 области.

Последовательности CDR устекинумаба представлены в таблице 11:

Таблица 11. Последовательности CDR антитела устекинумаб

LCDR1	RASQGISSWLA (SEQ ID NO: 49)	HCDR1	TYWLG (SEQ ID NO: 52)
LCDR2	AASSLQS (SEQ ID NO: 50)	HCDR2	IMSPVDS DIRYSPSFQG (SEQ ID NO: 53)
LCDR3	QQYNIYPYT (SEQ ID NO: 51)	HCDR3	RRPGQGYFDF (SEQ ID NO: 54)

Примечание: вышеуказанные CDR определены в соответствии со схемой нумерации Kabat.

20 TACI сливали с тяжелыми и/или легкими цепями устекинумаба для конструирования  
 слитых белков антитела TACI-Mab1 (схематическую структурную схему см. на ФИГ. 4) и  
 TACI-Mab2 (схематическую структурную схему см. на ФИГ. 5). Последовательности  
 представляют собой следующие:

> Тяжелая цепь TACI-Mab1

25 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWLGWVRQMPGKGLDWIGIMSPVDS DIR  
YSPSFQGV TMSVDK SITTAYLQWNSLKASDTAMYYCARRRPGQGYFDFWGQGLTVTV  
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQS  
SGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG  
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
 30 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPS  
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK

SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSSTSCREEQGEFYDHLRLDCISCA  
SICGQHPKQCAAFCEK

SEQ ID NO: 55

> Легкая цепь TACI-Mab1

5 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQOKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSR  
FSGSGGTDFLTISLQPEDEFATYYCOQYNIYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ  
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSLSSTLTLSK  
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 56

10 > Тяжелая цепь TACI-Mab2

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWLGWVRQMPGKGLDWIGIMSPVDSDIR  
YSPFQGOVTMSVDKSITTAYLQWNSLKASDTAMYYCARRRPGQGYFDFWGQGTLLTV  
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTEFPAVLQS  
SGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG  
15 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS  
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK  
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSSTSCREEQGEFYDHLRLDCISCA  
SICGQHPKQCAAFCEK

20 SEQ ID NO: 57

> Легкая цепь TACI-Mab2

STSCREEQGEFYDHLRLDCISCASICGQHPKQCAAFCEKLGGGGSGGGGSGGGGSDI  
QMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQOKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFS  
GSGSGTDFLTISLQPEDEFATYYCOQYNIYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL  
25 KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSLSSTLTLSKA  
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 58

Примечание: в последовательностях легкой цепи и тяжелой цепи слитого белка антитела часть с одинарным подчеркиванием обозначает последовательность TACI, часть с  
30 двойным подчеркиванием обозначает последовательность вариабельной области, часть с волнистой линией обозначает последовательность константной области, и часть, выделенная полужирным шрифтом, обозначает линкерную последовательность.

Доступное на рынке антитело к BAFF белимумаб использовали в качестве контрольного антитела. Последовательности антитела белимумаб описаны в WO  
35 2015173782A1, и конкретно представляют собой следующие:

> Тяжелая цепь белимумаба

QVQLQQSGAEVKKPGSSVRVSCASGGTFNNNAINWVRQAPGQGLEWMGGIIPMFGTA  
KYSQNFQGRVAITADESTGTASMESSLRSEDTAVYYCARSRDLLLFPHHALSPWGRGT  
MVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFP  
5 AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA  
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK  
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVY  
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL  
TVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10 SEQ ID NO: 59

> Легкая цепь белимумаба

SSELTQDPAVSVALGQTVRVTCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDR  
FSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCSSRDSSGNHWVFGGGTELTVLGQPKAAPSVTLF  
PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPPSKQSNKYAASSYL  
15 SLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO: 60

## Тестовый пример 1. Анализ связывания ELISA

### I. Анализ связывания ELISA (покрытие антигенным белком)

20 Связывающую активность антител или слитых белков в отношении BAFF, APRIL и p40 IL-12/23 анализировали методом ELISA (покрытие антигенным белком). Конкретные процедуры представляли собой следующие:

Белок BAFF (Sino biological, 10056-HNCH), APRIL (R&D Systems, 5860-AP-010/CF) или p40 IL-12/23 (Sino biological, 10052-H08H) разводили до 1 мкг/мл буфером PBS (BasalMedia, B320) при pH 7,4 и добавляли в 96-луночный микропланшет (Corning, 3590) при 100 мкл/лунку. Планшет инкубировали при 4 °C в течение ночи. После отбрасывания жидкости в каждую лунку добавляли 300 мкл 5% обезжиренного молока (BD, 232100), разбавленного PBS, для блокирования, и инкубировали планшет при 37 °C в течение 2 часов. После завершения блокирования блокирующий раствор отбрасывали; и планшет 30 промывали 3 раза буфером PBST (pH 7,4, PBS, содержащий 0,1% tween-20). В каждую лунку добавляли 100 мкл раствора градиентно разведенного тестируемого антитела или слитого белка и инкубировали планшет при 37 °C в течение 1 часа. После завершения инкубации планшет промывали 3 раза PBST. В каждую лунку добавляли 100 мкл мышинового античеловеческого IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, 209-035-088, разведенный в 35 соотношении 1:8000) и инкубировали планшет при 37 °C в течение 1 часа. Планшет

промывали 3 раза PBST. В каждую лунку добавляли 100 мкл хромогенного субстрата ТМВ (KPL, 5120-0077) и инкубировали планшет при комнатной температуре в течение 10-15 мин. Реакцию останавливали путем добавления 50 мкл 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в каждую лунку. Значения поглощения при 450 нм планшета считывали на считывателе микропланшетов, кривые связывания антител с антигеном аппроксимировали с помощью программного обеспечения и рассчитывали значения EC<sub>50</sub>. Результаты эксперимента представлены в таблицах 12-14 ниже. Результаты эксперимента показали, что TACI-Mab1 и TACI-Mab2 имели хорошую связывающую активность со всеми из BAFF, APRIL и p40 IL-12/23 и имели значения EC<sub>50</sub> для связывания с BAFF меньше, чем у RCT-18, и значения EC<sub>50</sub> для связывания с p40 IL-12/23 меньше, чем у устекинумаба.

Таблица 12. Результаты эксперимента по связыванию слитых белков антитела с BAFF

Образец	EC <sub>50</sub> (нМ) для связывания с BAFF
TACI-Mab1	3,748
TACI-Mab2	4,788
RCT-18	6,713
Устекинумаб	Связывание отсутствует

Таблица 13. Результаты эксперимента по связыванию слитых белков антитела с APRIL

Образец	EC <sub>50</sub> (нМ) для связывания с APRIL
TACI-Mab1	1,844
TACI-Mab2	1,291
Белимумаб	Связывание отсутствует
Устекинумаб	Связывание отсутствует

Таблица 14. Результаты эксперимента по связыванию слитых белков антитела с p40 IL-12/23

Образец	EC <sub>50</sub> (нМ) для связывания с p40 IL-12/23
TACI-Mab1	0,6187
TACI-Mab2	0,5421
RCT-18	Связывание отсутствует
Белимумаб	Связывание отсутствует
Устекинумаб	0,7856

## II. Анализ связывания методом ELISA (покрытие тестируемым образцом)

Связывающую активность слитых белков TACI в отношении BAFF и APRIL анализировали методом ELISA (покрытие тестируемым образцом слитого белка). Конкретные процедуры представляли собой следующие:

Тестируемый образец разводили до 2 мкг/мл буфером PBS (BasalMedia, B320) при

рН 7,4 и добавляли в 96-луночный микропланшет (Corning, 3590) при 100 мкл/лунку. Планшет инкубировали при 4 °С в течение ночи. После отбрасывания жидкости в каждую лунку добавляли 300 мкл 5% обезжиренного молока (BD, 232100), разбавленного PBS, для блокирования, и инкубировали планшет при 37 °С в течение 2 часов. После завершения

5 блокирования блокирующий раствор отбрасывали; и планшет промывали 3 раза буфером PBST (рН 7,4, PBS, содержащий 0,1% tween-20). В каждую лунку добавляли 100 мкл градиентно разведенных BAFF (ACROBiosystems, BAF-H5248) или APRIL (R&D Systems, 5860-AP-010/CF) и инкубировали планшет при 37 °С в течение 1 часа. После инкубации планшет промывали 3 раза PBST. При детектировании связывания с BAFF в каждую лунку

10 добавляли 100 мкл анти-His-HRP ((Sino biological, 105327-MM02T-H, разведенный в соотношении 1:2000); при детектировании связывания с APRIL в каждую лунку добавляли 100 мкл анти-НА-HRP (Abcam, ab1190, разведенный в соотношении 1:4000). Планшет инкубировали при 37 °С в течение 1 часа. Планшет промывали 3 раза PBST. В каждую лунку добавляли 100 мкл хромогенного субстрата ТМВ (KPL, 5120-0077) и инкубировали планшет

15 при комнатной температуре в течение 10-15 мин. Реакцию останавливали путем добавления 50 мкл 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в каждую лунку. Значения поглощения при 450 нм планшета считывали на считывателе микропланшетов, кривые связывания антител с антигеном аппроксимировали с помощью программного обеспечения и рассчитывали значения EC<sub>50</sub>. Результаты эксперимента представлены в таблице 15 ниже. Результаты эксперимента

20 показали, что активность слитых белков TACI-Fc, сконструированных согласно настоящему изобретению, в отношении связывания с BAFF была значительно сильнее, чем у контрольного RCT-18.

Таблица 15. Результаты эксперимента по связыванию слитых белков TACI-Fc с BAFF

Слитый белок TACI	EC <sub>50</sub> (нМ) для связывания с BAFF
TACI-9-15Fc1	7,023
TACI-9-15Fc2	8,801
TACI-9-15Fc3	9,072
TACI-9-15Fc4	20,09
TACI-9-15Fc5	8,889
TACI-9-15Fc6	8,477
TACI-9-15Fc7	8,952
TACI-9-15Fc8	10,48
TACI-9-15Fc9	8,940
RCT-18	96,2

25 **Тестовый пример 2. Анализ блокирования лиганда и рецептора**  
 Блокирующую активность антител и слитых белков в отношении рецепторов и

лигандов, таких как BAFF/BAFF-R, BAFF/BCMA, BAFF/TACI, APRIL/BCMA, APRIL/TACI и p40/IL-12R $\beta$ 1, анализировали методом ELISA. Конкретные процедуры представляли собой следующие:

Рецепторный белок разводили до 2 мкг/мл с помощью PBS при pH 7,4 (BasalMedia, B320) и добавляли в 96-луночный микропланшет (Corning, 3590) при 100 мкл/лунку. Планшет инкубировали при 4 °C в течение ночи. После отбрасывания жидкости в каждую лунку добавляли 200 мкл 1% блокирующего раствора казеина (Thermo, 37528) для блокирования и инкубировали планшет при 37 °C в течение 2 часов. После завершения блокирования блокирующий раствор отбрасывали и планшет промывали 3 раза буфером PBST (pH 7,4, PBS, содержащий 0,1% tween-20) для последующего использования. Меченый биотином лигандный белок в фиксированной концентрации смешивали с градиентно разведенным антителом или слитым белком, предварительно инкубировали при 37 °C в течение 30 мин и добавляли в заблокированный микропланшет. Планшет инкубировали при 37 °C в течение 1,5 ч. После завершения инкубации планшет промывали 3 раза PBST. В каждую лунку добавляли 100 мкл стрептавидина-HRP (Invitrogen, 434323, разведенного в соотношении 1:4000) и инкубировали планшет при 37 °C в течение 1 часа. Супернатант удаляли и промывали планшет 3 раза PBST. В каждую лунку добавляли 100 мкл хромогенного субстрата TMB (KPL, 5120-0077) и инкубировали планшет при комнатной температуре в течение 10-15 мин. Реакцию останавливали путем добавления 50 мкл 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в каждую лунку. Значения поглощения при 450 нм планшета считывали на считывателе микропланшетов, кривые ингибирования связывания лигандов с рецепторами аппроксимировали с помощью программного обеспечения и рассчитывали значения IC<sub>50</sub>.

Информация об источниках лигандных и рецепторных белков, использованных в этом тестовом примере, является следующей: BAFF (Sino biological, 10056-HNCH), APRIL (R&D Systems, 5860-AP-010/CF), p40 (Sino biological, 10052-H08H), BAFF-R (Sino biological, 16079-H02H), BCMA (Sino biological, 10620-H02H), TACI (ACROBiosystems, TAI-H5256), IL-12R $\beta$ 1 (ACROBiosystems, ILB-H5255).

Результаты эксперимента по блокированию функции связывания BAFF с BAFF-R слитыми белками согласно настоящему изобретению представлены в таблице 16 ниже. Результаты эксперимента показали, что активность слитых белков TACI, сконструированных согласно настоящему изобретению, в отношении связывания BAFF с BAFF-R была сильнее, чем у контрольного RCT-18.

Таблица 16. Результаты эксперимента по блокированию связывания BAFF с BAFF-R слитыми белками TACI

IC <sub>50</sub> (нМ) слитых белков TACI	для блокирования связывания
--	-----------------------------

	BAFF с BAFF-R
TACI-9-15Fc1	2,621
TACI-9-15Fc2	1,355
TACI-9-15Fc3	1,066
TACI-9-15Fc4	1,232
TACI-9-15Fc5	1,439
TACI-9-15Fc6	1,872
TACI-9-15Fc7	1,379
TACI-9-15Fc8	1,559
TACI-9-15Fc9	1,185
RCT-18	19,24

Для слитых белков антител согласно настоящему изобретению результаты эксперимента по блокированию связывания BAFF с BAFF-R представлены на ФИГ. 6, результаты эксперимента по блокированию связывания BAFF с BCMA представлены в таблице 17, результаты эксперимента по блокированию связывания BAFF с TACI представлены в таблице 18, результаты эксперимента по блокированию связывания APRIL с BCMA представлены в таблице 19, результаты эксперимента по блокированию связывания APRIL с TACI представлены в таблице 20, и результаты эксперимента по блокированию связывания p40 с IL-12Rβ1 представлены в таблице 21. Результат эксперимента показал, что слитые белки TACI и антитела, сконструированные согласно настоящему изобретению, были способны эффективно блокировать связывание родственных рецепторов с их лигандами и обладали более высокой активностью в отношении блокирования связывания BAFF с BAFF-R, BAFF с BCMA, BAFF с TACI, APRIL с BCMA и APRIL с TACI, чем контроль; слитые белки TACI и антитела, сконструированные согласно настоящему изобретению, были способны эффективно блокировать связывание p40 с IL-12Rβ1, в то время как RCT-18 и белимумаб не обладали такой блокирующей активностью.

Таблица 17. Результаты эксперимента по блокированию связывания BAFF с BCMA слитыми белками TACI и антитела

Образец	IC <sub>50</sub> (нМ) для блокирования связывания BAFF с BCMA
TACI-Mab1	0,1429
TACI-Mab2	0,1947
RCT-18	0,9725
Белимумаб	0,4584
Устекинумаб	Блокирующая активность отсутствует

20

Таблица 18. Результаты эксперимента по блокированию связывания BAFF с TACI слитыми

## белками TAC1 и антитела

Образец	IC <sub>50</sub> (нМ) для блокирования связывания BAFF с TAC1
TAC1-Mab1	0,2525
TAC1-Mab2	0,1841
RCT-18	0,7788
Белимумаб	0,5666
Устекинумаб	Блокирующая активность отсутствует

Таблица 19. Результаты эксперимента по блокированию связывания APRIL с BCMA слитыми белками TAC1 и антитела

Образец	IC <sub>50</sub> (нМ) для блокирования связывания APRIL с BCMA
TAC1-Mab2	2,431
RCT-18	25,12
Белимумаб	Блокирующая активность отсутствует
Устекинумаб	Блокирующая активность отсутствует

5

Таблица 20. Результаты эксперимента по блокированию связывания APRIL с TAC1 слитыми белками TAC1 и антитела

Образец	IC <sub>50</sub> (нМ) для блокирования связывания APRIL с TAC1
TAC1-Mab2	0,8334
RCT-18	3,297
Белимумаб	Блокирующая активность отсутствует
Устекинумаб	Блокирующая активность отсутствует

Таблица 21. Результаты эксперимента по блокированию связывания p40 с IL-12Rβ1 слитыми белками TAC1 и антитела

10

Образец	IC <sub>50</sub> (нМ) для блокирования связывания p40 с IL-12Rβ1
TAC1-Mab1	2,063
TAC1-Mab2	2,085
RCT-18	Блокирующая активность отсутствует
Белимумаб	Блокирующая активность отсутствует
Устекинумаб	2,077

### Тестовый пример 3. Анализ пролиферации клеток

15 Был проведен анализ пролиферации В-клеток, чтобы определить, способны ли антитела и слитые белки ингибировать пролиферацию В-клеток, индуцированную BAFF и APRIL. Конкретные процедуры представляли собой следующие:

Селезенки мышей измельчали и центрифугировали при 4 °C в течение 5 мин, и

собирали клетки нижнего слоя, промывали один раз промывочным раствором (PBS + 2% FBS + 2 мМ ЭДТА) и центрифугировали. Супернатант удаляли, добавляли буфер для лизиса эритроцитов (Invitrogen, 00-4333-57) и оставляли смесь выдерживаться при комнатной температуре в течение 5 минут до полного лизиса эритроцитов. Лизат центрифугировали, клетки ресуспендировали и подсчитывали. Клеточную суспензию сортировали с использованием набора для выделения В-клеток (Miltenyi Biotec, 130-090-862), и выделенные В-клетки ресуспендировали в среде RPMI 1640 (Gibco, 11875119) + 10% FBS (Gibco, 10099-141) + 50 мкМ 2-меркаптоэтанола (Sigma-Aldrich, M6250) и подсчитывали. Клетки высевали в 96-луночный клеточный планшет (Costar, 3903) для последующего использования. Белок BAFF (R&D Systems, 7537-BF) или APRIL (R&D Systems, 5860-AP) разводили до фиксированной концентрации и добавляли градиентно разведенные антитело или слитый белок. Смесь перемешивали до однородности, инкубировали при 37 °С в течение 30 мин, добавляли в 96-луночный клеточный планшет и затем культивировали в клеточном инкубаторе при 37 °С в течение 48 часов. Планшет для культивирования клеток вынимали и в каждую лунку добавляли 50 мкл раствора для детекции Celltiter Glo (Promega, G7573). Планшет инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 10 мин. Сигналы биолюминесценции детектировали с помощью считывателя микропланшетов, результаты детектирования аппроксимировали для получения кривой ингибирования с помощью программного обеспечения и рассчитывали значения IC<sub>50</sub>.

Результаты эксперимента по активности слитых белков TACI и антитела согласно настоящему изобретению в отношении ингибирования BAFF-индуцированной пролиферации В-клеток представлены в таблице 22 ниже. Результаты эксперимента показали, что TACI-Mab1 и TACI-Mab2 согласно настоящему изобретению обладали самой сильной активностью в отношении ингибирования BAFF-индуцированной пролиферации В-клеток, белимумаб обладал второй по величине активностью, RCT-18 обладал более слабой активностью, а устекинумаб не обладал активностью в отношении ингибирования BAFF-индуцированной пролиферации В-клеток.

Таблица 22. Результаты эксперимента по ингибированию BAFF-индуцированной пролиферации В-клеток слитыми белками TACI и антитела

Образец	IC <sub>50</sub> (нМ) для ингибирования BAFF-индуцированной пролиферации В-клеток
TACI-Mab1	0,06715
TACI-Mab2	0,05711
RCT-18	0,386
Белимумаб	0,1464
Устекинумаб	Ингибирующая активность отсутствует

Результаты эксперимента по активности слитых белков TACI и антитела согласно настоящему изобретению в отношении ингибирования APRIL-индуцированной пролиферации В-клеток представлены в таблице 23 ниже. Результаты эксперимента показали, что активность TACI-Mab2 согласно настоящему изобретению в отношении ингибирования APRIL-индуцированной пролиферации В-клеток была повышена в 12,2 раза по сравнению с RCT-18, в то время как белимумаб и устекинумаб не проявляли активности в отношении ингибирования APRIL-индуцированной пролиферации В-клеток.

Таблица 23. Результаты эксперимента по ингибированию APRIL-индуцированной пролиферации В-клеток слитыми белками TACI и антитела

Образец	IC <sub>50</sub> (нМ) для ингибирования APRIL-индуцированной пролиферации В-клеток
TACI-Mab2	0,08921
RCT-18	1,087
Белимумаб	Ингибирующая активность отсутствует
Устекинумаб	Ингибирующая активность отсутствует

Результаты эксперимента по активности слитых белков TACI-Fc согласно настоящему изобретению в отношении ингибирования пролиферации В-клеток, индуцированной BAFF или APRIL, представлены в таблицах 24 и 25. Результаты эксперимента показали, что слитые белки TACI, сконструированные согласно настоящему изобретению, способны эффективно ингибировать BAFF-индуцированную активность пролиферации В-клеток, а также способны эффективно ингибировать APRIL-индуцированную активность пролиферации В-клеток.

Таблица 24. Результаты эксперимента по ингибированию BAFF-индуцированной пролиферации В-клеток слитыми белками TACI-Fc

Слитый белок TACI	IC <sub>50</sub> (нМ) для ингибирования BAFF-индуцированной пролиферации В-клеток
RCT-18	0,3815
TACI-9-15Fc2	0,054
TACI-9-15Fc6	0,04808
TACI-9-15Fc7	0,02436
TACI-9-15Fc8	0,02911
TACI-9-15Fc9	0,02623

Таблица 25. Результаты эксперимента по ингибированию APRIL-индуцированной пролиферации В-клеток слитыми белками TACI-Fc

Слитый белок TACI	IC <sub>50</sub> (нМ) для ингибирования APRIL-
-------------------	--

	индуцированной пролиферации В-клеток
TACI-9-15Fc2	0,2305
TACI-9-15Fc6	0,1400
TACI-9-15Fc7	0,004805
TACI-9-15Fc8	0,004767
TACI-9-15Fc9	0,009472

#### Тестовый пример 4. Анализ секреции IFN $\gamma$ и IL-17

Проводили анализы секреции IFN $\gamma$  и IL-17 для определения того, были ли антитела и слитые белки способны ингибировать дифференцировку Т-клеток, индуцированную IL-12 и IL-23. Конкретные процедуры представляли собой следующие:

100 мкл 2 мкг/мл антитела к CD3 мыши (BioLegend, 100238) и 2 мкг/мл антитела к CD28 мыши (BioLegend, 102116) добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета (Corning, 3599). Планшет инкубировали при 37 °C в течение 1 часа и дважды промывали PBS для последующего использования. Селезенки мышей измельчали и центрифугировали при 4 °C в течение 5 мин, и собирали клетки нижнего слоя, промывали один раз промывочным раствором (PBS + 2% FBS + 2 мМ ЭДТА) и центрифугировали. Супернатант удаляли, добавляли буфер для лизиса эритроцитов (Invitrogen, 00-4333-57) и оставляли смесь выдерживаться при комнатной температуре в течение 5 минут до полного лизиса эритроцитов. Лизат центрифугировали, клетки ресуспендировали и подсчитывали. Клеточную суспензию сортировали с помощью набора Mouse CD4 Cells (Invitrogen, 11415D) и выделенные CD4<sup>+</sup> Т-клетки ресуспендировали в среде RPMI 1640 (Gibco, 11875119) + 10% FBS (Gibco, 10099-141) и подсчитывали для последующего использования.

При детектировании дифференцировки Т-клеток, индуцированной IL-12, к Т-клеткам добавляли 20 мкг/мл антитела к IL-4 мыши (BioLegend, 504122), и клеточную суспензию наносили на 96-луночный планшет с покрытием. Химерный белок IL-12 (p40 человека-p35 мыши) в фиксированной концентрации смешивали с градиентно разведенным антителом или слитым белком, предварительно инкубировали при 37 °C в течение 1 часа, добавляли в 96-луночный планшет и культивировали в клеточном инкубаторе при 37 °C в течение 48 часов. 96-луночный планшет вынимали и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 3 мин. Супернатант собирали и анализировали на содержание IFN $\gamma$  с использованием набора Mouse IFN-gamma DuoSet ELISA (R&D Systems, DY485).

При детектировании дифференцировки Т-клеток, индуцированной IL-23, клеточную суспензию наносили на 96-луночный планшет с покрытием. IL-23 (R&D Systems, 1290-IL-010) в фиксированной концентрации смешивали с градиентно разведенным антителом или слитым белком, предварительно инкубировали в течение 1 часа, добавляли в 96-луночный

планшет и культивировали в клеточном инкубаторе при 37 °С в течение 48 часов. 96-луночный планшет вынимали и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 3 мин. Супернатант собирали и анализировали на содержание IL-17 с использованием набора Mouse IL-17 DuoSet ELISA (R&D Systems, DY421).

- 5            Результаты эксперимента по ингибированию IL-23-индуцированной секреции IL-17 слитыми белками TACI и антитела согласно настоящему изобретению представлены в таблице 26 ниже. Результаты эксперимента показали, что RCT-18 и белимумаб не имели функции ингибирования IL-23-индуцированной секреции IL-17, в то время как TACI-Mab1 и TACI-Mab2 согласно настоящему изобретению были способны эффективно ингибировать  
10 IL-23-индуцированную секрецию IL-17 со значениями IC<sub>50</sub> ниже, чем у устекинумаба.

Таблица 26. Результаты эксперимента по ингибированию IL-23-индуцированной секреции IL-17 слитыми белками TACI и антитела

Образец	IC <sub>50</sub> (нМ) для ингибирования IL-23-индуцированной секреции IL-17
TACI-Mab1	1,693
TACI-Mab2	2,339
RCT-18	Ингибирующая активность отсутствует
Белимумаб	Ингибирующая активность отсутствует
Устекинумаб	2,487

- 15            Результаты эксперимента по ингибированию IL-12-индуцированной секреции IFN $\gamma$  слитыми белками TACI и антитела согласно настоящему изобретению представлены в таблице 27 ниже. Результаты эксперимента показали, что TACI-Mab1 и TACI-Mab2 согласно настоящему изобретению были способны эффективно ингибировать IL-12-индуцированную секрецию IFN $\gamma$ , в то время как RCT-18 и белимумаб не проявляли  
20 активности в отношении ингибирования IL-12-индуцированной секреции IFN $\gamma$ .

Таблица 27. Результаты эксперимента по ингибированию IL-12-индуцированной секреции IFN $\gamma$  слитыми белками TACI и антитела

Образец	IC <sub>50</sub> (нМ) для ингибирования IL-12-индуцированной секреции IFN $\gamma$
TACI-Mab1	3,067
TACI-Mab2	9,306
RCT-18	Ингибирующая активность отсутствует
Белимумаб	Ингибирующая активность отсутствует

### Тестовый пример 5. Анализ аффинности

- 25            Определенное количество тестируемого образца подвергали аффинному захвату

биосенсорным чипом с белком А (GE, 29127556), затем пропускали антигены в ряде градиентов концентрации по поверхности чипа. Сигналы реакции детектировали в режиме реального времени с помощью прибора Biacore (GE, 8K) для получения кривых ассоциации и диссоциации. После завершения диссоциации для каждого цикла биосенсорный чип промывали и регенерировали 10 мМ раствором глицина и соляной кислоты при pH 1,5 (GE, BR-1003-54). Данные, полученные в результате эксперимента, аппроксимировали с помощью программного обеспечения BIAevaluation версии 4.1, GE с использованием модели 1:1 для получения значений аффинности. Соответствующие антигенные белки, использованные в этом анализе, представляют собой следующие: IL-23 человека (CT048-H08H, Sino biological), IL-12 человека (CT050-H08H, Sino biological), BAFF человека (10056-HNCH, Sino biological), APRIL человека (5860-AP-010/CF, R&D Systems), p40 яванского макака (10215-CL, R&D Systems), BAFF яванского макака (BAF-CM412B, Kactus), APRIL яванского макака (APR-CM410B, Kactus), BAFF мыши (BAF-M521y, Acro Biosystems) и APRIL мыши (7907-AP/CF, R&D Systems).

Результаты эксперимента для слитых белков TAC1 и антитела, сконструированных согласно настоящему изобретению, представлены в таблицах 28-36 ниже. Результаты эксперимента показали, что слитые белки антитела, сконструированные согласно настоящему изобретению, были способны с высокой аффинностью связываться с IL-23 человека, IL-12 человека, BAFF человека, APRIL человека, p40 яванского макака, BAFF яванского макака, APRIL яванского макака, BAFF мыши и APRIL мыши. Слитые белки антитела имели более сильную аффинность к BAFF человека и BAFF мыши, чем контрольные RCT-18 и белимумаб, и обладали перекрестной активностью связывания BAFF яванского макака и BAFF мыши.

Таблица 28. Результаты эксперимента для анализа Biacore со слитыми белками TAC1 и антитела и белком BAFF человека

Название	BAFF человека		
	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)
TAC1-Mab1	1,01E+06	9,72E-05	9,66E-11
TAC1-Mab2	2,24E+06	5,32E-05	2,38E-11
RCT-18	9,64E+05	1,80E-04	1,86E-10
Белимумаб	1,64E+06	1,71E-04	1,05E-10

Таблица 29. Результаты эксперимента для анализа Biacore со слитыми белками TAC1 и антитела и белком BAFF мыши

Название	BAFF мыши		
	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)
TAC1-Mab1	1,27E+06	9,53E-05	7,49E-11

TACI-Mab2	2,01E+06	6,56E-05	3,26E-11
RCT-18	7,40E+05	8,98E-05	1,21E-10
Белимуаб	1,38E+06	1,44E-04	1,04E-10

Таблица 30. Результаты эксперимента для анализа Віасоге со слитыми белками TACI и антитела и белком BAFF яванского макака

Название	BAFF яванского макака		
	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)
TACI-Mab1	3,03E+05	7,81E-05	2,58E-10
TACI-Mab2	6,33E+05	5,91E-05	9,33E-11
Белимуаб	4,81E-05	2,21E-04	4,59E-10

5 Таблица 31. Результаты эксперимента для анализа Віасоге со слитыми белками TACI и антитела и белком APRIL человека

Название	APRIL человека		
	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)
TACI-Mab1	2,14E+07	4,88E-04	2,29E-11
TACI-Mab2	1,16E+07	1,72E+04	1,48E-11
RCT-18	2,34E+07	6,58E-04	2,81E-11

Таблица 32. Результаты эксперимента для анализа Віасоге со слитыми белками TACI и антитела и белком APRIL яванского макака

Название	APRIL яванского макака		
	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)
TACI-Mab1	7,27E+06	2,35E-04	3,23E-11
TACI-Mab2	3,95E+06	1,31E-04	3,31E-11
RCT-18	1,16E+07	5,07E-04	4,36E-11

10

Таблица 33. Результаты эксперимента для анализа Віасоге со слитыми белками TACI и антитела и белком APRIL мыши

Название	APRIL мыши		
	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)
TACI-Mab1	3,75E+06	2,89E-05	7,70E-12
TACI-Mab2	3,19E+06	2,62E-05	8,21E-12
RCT-18	2,52E+06	1,69E-05	6,71E-12

Таблица 34. Результаты эксперимента для анализа Віасоге со слитыми белками TACI и антитела и белком IL-23 человека

15

Название	IL-23 человека		
	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)
TACI-Mab1	1,24E+06	8,83E-05	7,10E-11

TACI-Mab2	1,14E+06	1,03E-04	9,00E-11
Устекинумаб	1,26E+06	1,07E-04	8,44E-11

Таблица 35. Результаты эксперимента для анализа Viacore со слитыми белками TACI и антитела и белком p40 яванского макака

Название	p40 яванского макака		
	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)
TACI-Mab1	8,91E+05	2,38E-04	2,67E-10
Устекинумаб	9,31E+05	2,36E+04	2,54E-10

5 Таблица 36. Результаты эксперимента для анализа Viacore со слитыми белками TACI и антитела и белком IL-12 человека

Антитела	IL-12 человека		
	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)
TACI-Mab1	4,97E+06	2,11E-04	4,24E-11
Устекинумаб	4,66E+06	1,80E-04	3,87E-11

Результаты эксперимента по аффинности иллюстративных слитых белков TACI-Fc согласно настоящему изобретению в отношении BAFF человека и APRIL человека 10 представлены в таблицах 37 и 38. Результаты эксперимента показали, что все из TACI-9Fc, TACI-9-10Fc и TACI-9-15Fc, сконструированных согласно настоящему изобретению, были способны с высокой аффинностью связываться с BAFF человека и APRIL человека.

15 Таблица 37. Результаты эксперимента для анализа Viacore со слитыми белками TACI-Fc и белком BAFF человека

Название	BAFF человека		
	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)
TACI-9Fc	2,17E+05	1,62E-05	7,48E-11
TACI-9-10Fc	2,34E+05	1,89E-05	8,10E-11
TACI-9-15Fc	2,74E+05	2,12E-05	7,73E-11

Таблица 38. Результаты эксперимента для анализа Viacore со слитыми белками TACI-Fc и белком APRIL человека

Название	BAFF человека		
	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)
TACI-9Fc	1,15E+07	2,07E-04	1,80E-11
TACI-9-10Fc	8,75E+06	1,12E-04	1,28E-11
TACI-9-15Fc	7,67E+06	9,60E-05	1,25E-11

### Тестовый пример 6. Оценка активности *in vivo*

Три белка, т. е. химерный IL-12 (p40 человека-p35 мыши), IL-23 человека и ВАFF человека, использовали для одновременной стимуляции мышей, чтобы индуцировать продукцию цитокинов, таких как IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-22 и IgA, у мышей, и определяли уровни этих цитокинов для оценки активности антител или слитых белков *in vivo*.

Самок мышей SPF (свободные от специфической патогенной микрофлоры) C57BL/6 (Zhejiang Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd., возрастом 8 недель) случайным образом разделяли на группы по 5 мышей в каждой группе и внутрибрюшинно вводили три белка: химерный IL-12 (2 мкг/мышь), IL-23 человека (2 мкг/мышь) и ВАFF человека (1 мг/кг) один раз в сутки в течение четырех дней. Каждый из тестируемых образцов (устекинумаб 8 мг/кг, RCT-18 4 мг/кг, RCT-18 8 мг/кг, белимумаб 8 мг/кг, белимумаб 16 мг/кг, TACI-Mab1 4,15 мг/кг, TACI-Mab1 8,3 мг/кг, TACI-Mab2 4,45 мг/кг и TACI-Mab2 8,9 мг/кг) вводили внутрибрюшинно за один час до инъекции белка в первый и третий день. Образцы плазмы собирали на пятый день у каждой группы мышей и тестировали на уровни IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-22 и IgA. Информация об источниках наборов для анализа, использованных в этом тестовом примере, является следующей: набор Mouse IFN-gamma Quantikine ELISA (R&D Systems, MIF00), набор Mouse TNF-alpha Quantikine ELISA (R&D Systems, MTA00B), набор Mouse/Rat IL-22 Quantikine ELISA (R&D Systems, M2200) и набор Mouse IgA ELISA (Abcam, ab157717). RCT-18, белимумаб и устекинумаб использовали в качестве положительных контролей, а PBS использовали в качестве отрицательного контроля. Молярные концентрации лекарственного средства TACI-Mab1 8,3 мг/кг, TACI-Mab2 8,9 мг/кг и белимумаба 8 мг/кг были идентичны молярным концентрациям RCT-18 4 мг/кг; молярные концентрации лекарственного средства TACI-Mab1 8,3 мг/кг и TACI-Mab2 8,9 мг/кг были идентичны молярным концентрациям устекинумаба 8 мг/кг.

Результаты эксперимента показаны на ФИГ. 7-10. Результаты эксперимента показали, что слитые белки антител TACI-Mab1 и TACI-Mab2 согласно настоящему изобретению были способны значительно ингибировать секрецию TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  и IL-22, в то время как RCT-18 и белимумаб не были способны ингибировать секрецию TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  и IL-22. Кроме того, слитые белки антител TACI-Mab1 и TACI-Mab2 были способны значительно ингибировать секрецию IgA в обеих дозах и обладали более сильной ингибирующей активностью, чем RCT-18 и белимумаб, в то время как устекинумаб не был способен ингибировать секрецию IgA.

### Тестовый пример 7. Фармакокинетический эксперимент на крысах

Фармакокинетическое исследование *in vivo* проводили на крысах линии SD (Спрег-

Доули). Самцов крыс SD (Zhejiang Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.) случайным образом разделяли на группы по 4 крысы в каждой группе и вводили лекарственные средства путем внутривенной инъекции. 0,2 мл цельной крови собирали до введения и через 5 мин, 8 ч, 24 ч, 48 ч, 84 ч, 9 дней, 10 дней, 14 дней, 21 день и 28 дней после введения. Без антикоагуляции собранную кровь оставляли стоять при 4 °С в течение 30 мин и центрифугировали при 1000 g в течение 15 мин. Супернатант верхнего слоя добавляли в пробирку EP и хранили при -80 °С. Концентрацию в плазме в сыворотке определяли методом ELISA, и рассчитывали фармакокинетические параметры и период полувыведения тестируемых лекарственных средств *in vivo* с помощью программного обеспечения Winnolin.

Результаты эксперимента в отношении фармакокинетики слитых белков TACI согласно настоящему изобретению на крысах представлены в таблице 39. Результаты эксперимента показали, что слитые белки TACI согласно настоящему изобретению имели лучшую стабильность с периодом полувыведения *in vivo* более 4 дней.

Таблица 39. Результаты эксперимента в отношении фармакокинетики слитых белков TACI на крысах

Название образца	TACI-9-15Fc1	TACI-9-15Fc2	TACI-9-15Fc3
Доза в/в	5 мг/кг	5 мг/кг	5 мг/кг
Период полувыведения	4,2 ± 0,3 дня	4,4 ± 0,8 дней	4,2 ± 0,3 дня

Результаты эксперимента в отношении фармакокинетики слитых белков TACI согласно настоящему изобретению на крысах представлены в таблице 40. Результаты эксперимента показали, что слитые белки антител TACI-Mab1 и TACI-Mab2 согласно настоящему изобретению имели хороший период полувыведения у крыс, причем период полувыведения трех частей – конца устекинумаба, конца TACI и интактной молекулы – составлял около 9 дней; в то время как RCT-18 имеет более короткий период полувыведения, составляющий всего около 0,7 дня.

Таблица 40. Результаты эксперимента в отношении фармакокинетики слитых белков TACI и антитела на крысах

Название образца	TACI-Mab1	TACI-Mab2	RCT-18
Доза в/в	12,5 мг/кг	13,5 мг/кг	6 мг/кг
Конец устекинумаба	9,8 ± 0,6 дня	9,2 ± 2,6 дня	/
Конец TACI	9,0 ± 1,2 дня	9,4 ± 1,4 дня	0,7 ± 0,06 дня
Интактная молекула	9,3 ± 1,2 дня	9,1 ± 1,8 дня	/

### Тестовый пример 8. Тест на стабильность в плазме

Тестируемые образцы, подвергнутые стерилизующей фильтрации, добавляли в человеческую плазму с получением конечной концентрации 0,1 мг/мл и инкубировали смесь при 37 °С в течение 14 дней. Тестируемые образцы отбирали в 0 день, 7 день и 14 день и хранили при -80 °С для последующего использования. 100 мкл Dynabeads M-280 со стрептавидином (Invitrogen, 11206D) промывали три раза 1 мл PBST (PBS + 0,05% Tween-20) и добавляли 1 мл 0,1% казеина Blocker™ (Thermo, 37528) (содержащего 8 мкг меченого биотином BAFF). Смесь перемешивали до однородности, переворачивая пробирку вверх дном, и инкубировали при 37 °С в течение 60 мин. Магнитные шарики Dynabeads M-280 с покрытием промывали 3 раза 1 мл PBST и 50 мкл тестируемого образца (образец разводили 1 мл 0,1% казеина Blocker™). Смесь перемешивали до однородности, переворачивая пробирку вверх дном при 37 °С в течение 120 мин для захвата образца в плазме. Шарики трижды промывали PBST, дважды PBS и дважды сверхчистой водой, и добавляли 30 мкл элюента Pierce™ IgG (Thermo Scientific, 21004). Смесь перемешивали до однородности, переворачивая пробирку вверх дном при комнатной температуре в течение 6 мин. Элюированный раствор нейтрализовали добавлением 1 М трис-HCl при pH 8,0 и концентрировали путем ротационного выпаривания досуха для удаления воды. Добавляли 8 М гидрохлорида гуанидина и инкубировали смесь при 70 °С в течение 10 мин, затем разбавляли сверхчистой водой. Добавляли дегликазу PNGase F (Biolabs, P0704L) и инкубировали смесь при 37 °С в течение 2 часов. Добавляли DTT и инкубировали смесь при 70 °С в течение 10 мин. Образец подвергали анализу расщепления с помощью масс-спектрометрии.

Результаты теста стабильности в плазме представлены в таблице 41 ниже. Результаты теста показали, что в человеческой плазме не было обнаружено расщепления слитых белков антител TACI-Mab1 и TACI-Mab2 согласно настоящему изобретению, в то время как RCT-18 продемонстрировал постепенное увеличение количества фрагментов расщепления с увеличением времени инкубации, и процент молекул расщепления составлял более 60% к 14 дню.

Таблица 41. Тест стабильности в плазме слитых белков TACI

Дни	TACI-Mab1	TACI-Mab2	RCT-18
0 день	Расщепления не обнаружено	Расщепления не обнаружено	Процент расщепления TACI 17,51%
7 день	Расщепления не обнаружено	Расщепления не обнаружено	Процент расщепления TACI 27,10%
14 день	Расщепления не обнаружено	Расщепления не обнаружено	Процент расщепления TACI 62,59%

**красной волчанки**

У мышей MRL/lpr будут спонтанно развиваться симптомы аутоиммунного заболевания, схожего с системной красной волчанкой человека, по мере увеличения возраста в неделях.

5           Самок мышей MRL/lpr приобретали у Cavens Laboratory Animal Co., Ltd. и содержали по 5 мышей/клетку в среде SPF-класса с температурой 20-25 °C и влажностью 40-60%. Мышей акклиматизировали в лабораторных условиях в течение по меньшей мере одной недели до эксперимента. Когда мыши достигли возраста от 10 до 12 недель и имели значительно более высокие значения белка в моче и IgG к дцДНК, чем нормальные  
10           контрольные мыши, лекарственные средства (RCT-18 8 мг/кг (т. е. 8 мг/кг для каждой дозы, то же самое применимо в дальнейшем), TACI-Mab1 8,3 мг/кг, TACI-Mab1 16,6 мг/кг, TACI-Mab2 8,9 мг/кг, TACI-Mab2 17,8 мг/кг и PBS в качестве отрицательного контроля) вводили путем подкожной инъекции два раза в неделю (один раз в понедельник и один раз в четверг) в течение 8 недель подряд. Мышей регулярно наблюдали на предмет состояния шерсти и  
15           кожи, собирали мочу и плазму и определяли содержание белка в моче и уровни IgG к дцДНК в плазме. После завершения эксперимента почки мышей собирали, фиксировали и окрашивали Н&Е (гематоксилином и эозином) для наблюдения поражений клубочков и канальцев и инфильтрации воспалительными клетками ткани почек мышей в каждой группе, и для оценки степени поражения почек. В этом тестовом примере концентрацию  
20           белка в моче определяли с использованием набора Bradford Protein Assay (приобретенного у Shanghai Beyotime Biological Tech. Co., Ltd.), а также набора Mouse anti-dsDNA IgG-specific ELISA (приобретенного у Alpha Diagnostic International).

          Результаты эксперимента показаны на ФИГ. 11-13. Результаты эксперимента показали, что ткань почек мышей в группе отрицательного контроля имела относительно  
25           значительную инфильтрацию воспалительными клетками, а степень поражения почек в группах TACI-Mab1 и TACI-Mab2 согласно настоящему изобретению снижалась вместе с увеличением дозы, демонстрируя определенный эффект дозы. Кроме того, TACI-Mab1 8,3 мг/кг и TACI-Mab2 17,8 мг/кг согласно настоящему изобретению были способны значительно снижать концентрацию мочи у мышей; концентрация IgG к дцДНК в группах  
30           TACI-Mab1 8,3 мг/кг, TACI-Mab1 16,6 мг/кг и TACI-Mab2 8,9 мг/кг была меньше, чем в группе отрицательного контроля.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид TACI, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или представляющий собой усеченный фрагмент SEQ ID NO: 8, или их вариант, где усеченный фрагмент содержит аминокислотные остатки в положениях 48-85 SEQ ID NO: 8;

вариант представляет собой вариант, имеющий одну или более аминокислотных замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 49, 52, 53, 57, 65, 82 и 83 в SEQ ID NO: 8 или ее усеченном фрагменте, где положения для аминокислотных замен представляют собой положения аминокислотных остатков, пронумерованные в естественном порядке относительно последовательности SEQ ID NO: 8.

2. Полипептид TACI, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или представляющий собой усеченный фрагмент SEQ ID NO: 8, или их вариант, где усеченный фрагмент содержит аминокислотные остатки в положениях 51-85 SEQ ID NO: 8, и вариант представляет собой вариант, имеющий одну или более аминокислотных замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 52, 53, 57, 65, 82 и 83 в SEQ ID NO: 8 или ее усеченном фрагменте, где положения для аминокислотных замен представляют собой положения аминокислотных остатков, пронумерованные в естественном порядке относительно последовательности SEQ ID NO: 8.

3. Полипептид TACI по п. 1 или п. 2, где усеченный фрагмент полипептида TACI содержит:

аминокислотные остатки в положениях 48-86 SEQ ID NO: 8;

аминокислотные остатки в положениях 48-87 SEQ ID NO: 8;

аминокислотные остатки в положениях 48-88 SEQ ID NO: 8;

аминокислотные остатки в положениях 50-85 SEQ ID NO: 8; или

аминокислотные остатки в положениях 49-85 SEQ ID NO: 8.

4. Полипептид TACI по любому из пп. 1-3, где:

вариант представляет собой вариант, имеющий одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из 49T или 49R, 52S, 53E или 53Q, 57E, 65T или 65A, 82A или 82R, и 83Y в последовательности SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 68, или

вариант представляет собой вариант, имеющий одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из 52S, 53E или 53Q, 57E, 65T или 65A, 82A или 82R, и 83Y в последовательности SEQ ID NO: 69 или SEQ ID NO: 70;

где положения для аминокислотных замен представляют собой положения

аминокислотных остатков, пронумерованные в естественном порядке относительно последовательности SEQ ID NO: 8;

предпочтительно вариант представляет собой:

вариант, имеющий любую аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из 49T, 52S, 53E, 53Q, 57E и 82A в последовательности SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 68;

вариант, имеющий любую аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из 52S, 53E, 53Q, 57E и 82A в последовательности SEQ ID NO: 69 или SEQ ID NO: 70;

вариант, имеющий аминокислотные замены 49R и 65T в последовательности SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 68;

вариант, имеющий аминокислотные замены 49R и 65A в последовательности SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 68;

вариант, имеющий аминокислотные замены 49R, 65T и 82R в последовательности SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 68;

вариант, имеющий аминокислотные замены 53E и 57E в последовательности SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 или SEQ ID NO: 70;

вариант, имеющий аминокислотные замены 52S, 53E и 57E в последовательности SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 или SEQ ID NO: 70;

вариант, имеющий аминокислотные замены 49T и 82A в последовательности SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 68;

вариант, имеющий аминокислотные замены 49T и 83Y в последовательности SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 68;

вариант, имеющий аминокислотные замены 49T, 82A и 83Y в последовательности SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 68; или

вариант, имеющий аминокислотные замены 49T, 53E, 57E и 82A в последовательности SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 68;

где положения для аминокислотных замен представляют собой положения аминокислотных остатков, пронумерованные в естественном порядке относительно

последовательности SEQ ID NO: 8.

5. Полипептид TAC1 по любому из пп. 1-4, где полипептид TAC1 имеет последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13-15, SEQ ID NO: 18-35 и SEQ ID NO: 68-70; предпочтительно полипептид TAC1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 35.

6. Слитый белок TAC1, содержащий полипептид TAC1 по любому из пп. 1-5.

7. Слитый белок TAC1 по п. 6, содержащий:

A) полипептид TAC1 по любому из пп. 1-5; и

B) Fc-область.

8. Слитый белок TAC1 по п. 7, где Fc-область представляет собой Fc-область человеческого IgG1;

предпочтительно Fc-область содержит первую субъединицу и вторую субъединицу, способные связываться друг с другом, где первая субъединица и вторая субъединица содержат одну или более аминокислотных замен для снижения гомодимеризации; или

первая субъединица и/или вторая субъединица Fc-области содержит одну или более аминокислотных замен, причем аминокислотные замены способны снижать связывание Fc-области с Fc-рецептором, и предпочтительно аминокислотные замены способны снижать связывание Fc-области с Fc $\gamma$ -рецептором;

более предпочтительно Fc-область имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62 или SEQ ID NO: 63, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62 или SEQ ID NO: 63.

9. Слитый белок TAC1 по любому из пп. 6-8, представляющий собой димерный белок и содержащий полипептидную цепь, выбранную из группы, состоящей из полипептидных цепей, представленных в a, b и c:

a. от N-конца к C-концу: [полипептид TAC1]-[линкер]-[субъединица Fc-области];

b. от N-конца к C-концу: [субъединица Fc-области]-[линкер]-[полипептид TAC1]; и

c. от N-конца к C-концу: [полипептид TAC1 1]-[линкер 1]-[субъединица Fc-области]-[линкер 2]-[полипептид TAC1 2], где линкер 1 и линкер 2 могут быть одинаковыми или разными, и полипептид TAC1 1 и полипептид TAC1 2 могут быть одинаковыми или разными;

где предпочтительно линкер в полипептидной цепи, представленной в a, b или c, выбран из группы, состоящей из линкера, представленного в SEQ ID NO: 64, или выбран из группы, состоящей из линкера (G<sub>x</sub>S)<sub>y</sub>, где X представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1-5, и Y представляет собой целое число, выбранное из группы,

состоящей из 0-6; предпочтительно линкер представляет собой линкер, представленный в SEQ ID NO: 65 или SEQ ID NO: 66;

более предпочтительно слитый белок TACI содержит 2 одинаковые полипептидные цепи, имеющие последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 36-44.

10. Слитый белок TACI, представляющий собой слитый белок TACI и антитела и содержащий полипептид TACI и антитело, где:

А. полипептид TACI представляет собой полипептид TACI по любому из пп. 1-5; и

В. антитело представляет собой антитело к IL23, антитело к IL12 или антитело к субъединице p40 IL23/IL12.

11. Слитый белок TACI по п. 10, где антитело представляет собой антитело к субъединице p40 IL23/IL12;

предпочтительно антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи,

где переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 54, соответственно; и

переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 51, соответственно.

12. Слитый белок TACI по п. 10 или п. 11, где антитело содержит переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 45, и переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 46.

13. Слитый белок TACI по любому из пп. 10-12, где антитело содержит константные области тяжелой и легкой цепи антитела;

предпочтительно константная область тяжелой цепи выбрана из группы, состоящей из константных областей человеческого IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и константная область легкой цепи выбрана из группы, состоящей из константных областей  $\kappa$ - и  $\lambda$ -цепи человеческого антитела,

более предпочтительно антитело содержит тяжелую цепь, обладающую по меньшей мере 85% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 47, и легкую цепь, обладающую по меньшей мере 85% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 48;

наиболее предпочтительно антитело содержит тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO: 47, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO: 48.

14. Слитый белок TACI по любому из пп. 10-13, содержащий полипептидную цепь, описанную в d или e:

d. первую полипептидную цепь, содержащую [тяжелую цепь антитела]-[линкер]-[полипептид TACI], от N-конца к C-концу, и

вторую полипептидную цепь, представляющую собой легкую цепь антитела;  
е. первую полипептидную цепь, содержащую [тяжелую цепь антитела]-[линкер]-[полипептид TACI], от N-конца к С-концу, и

вторую полипептидную цепь, содержащую [полипептид TACI]-[линкер]-[легкую цепь антитела], от N-конца к С-концу;

где предпочтительно линкер может быть выбран из группы, состоящей из линкера  $(G_xS)_y$ , где X представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1-5, и Y представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 0-6; предпочтительно линкер представляет собой линкер, представленный в SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66 или SEQ ID NO: 67.

15. Слитый белок TACI по любому из пп. 10-14, где

слитый белок TACI содержит две одинаковые первые полипептидные цепи, представленные в SEQ ID NO: 55, и две одинаковые вторые полипептидные цепи, представленные в SEQ ID NO: 56; или

слитый белок TACI содержит две одинаковые первые полипептидные цепи, представленные в SEQ ID NO: 57, и две одинаковые вторые полипептидные цепи, представленные в SEQ ID NO: 58.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая:

полипептид TACI по любому из пп. 1-5 или слитый белок TACI по любому из пп. 6-15, и

один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или эксципиентов.

17. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид TACI по любому из пп. 1-5 или слитый белок TACI по любому из пп. 6-15.

18. Клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 17.

19. Способ лечения или облегчения В-клеточного расстройства или аутоиммунного заболевания, включающий стадию введения субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества полипептида TACI по любому из пп. 1-5, терапевтически эффективного количества слитого белка TACI по любому из пп. 6-15 или терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п. 16;

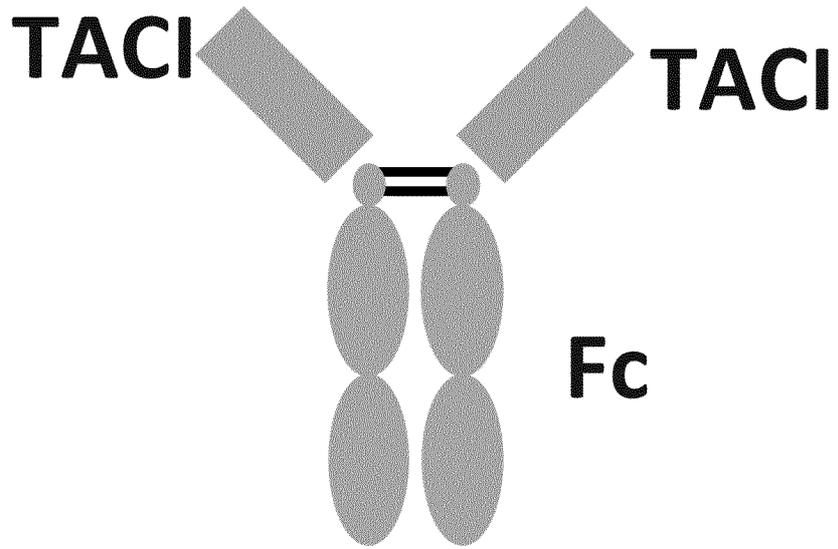
где предпочтительно В-клеточное расстройство или аутоиммунное заболевание представляет собой заболевание или патологическое состояние, связанное с экспрессией TACI;

более предпочтительно аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из системной красной волчанки, миастении гравис, рассеянного склероза,

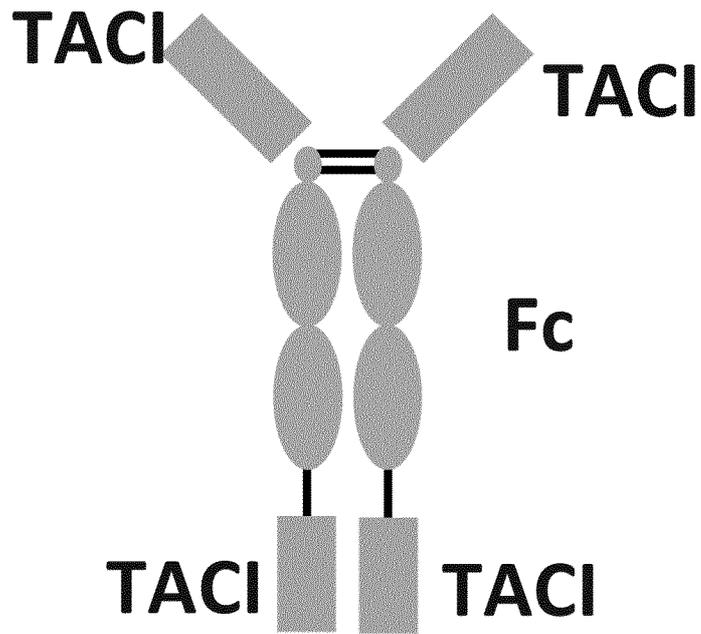
инсулинозависимого сахарного диабета, болезни Крона, ревматоидного артрита, полиартикулярного ювенильного ревматоидного артрита и псориатического артрита;

В-клеточное расстройство выбрано из группы, состоящей из опухолей, хронического лейкоцитарного лейкоза, множественной миеломы, неходжкинской лимфомы, посттрансплантационного лимфопролиферативного расстройства и гаммапатии легких цепей;

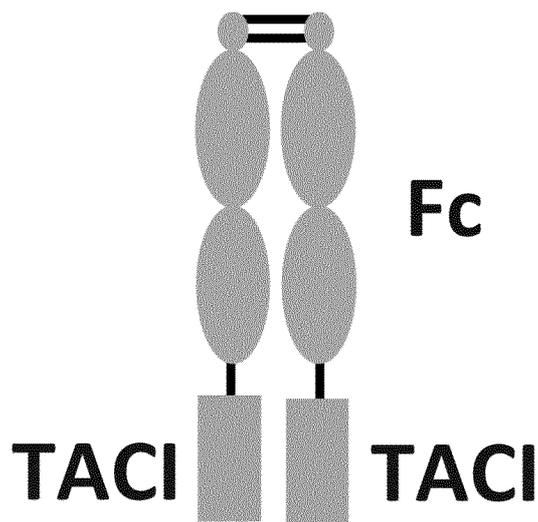
наиболее предпочтительно аутоиммунное заболевание представляет собой системную красную волчанку.



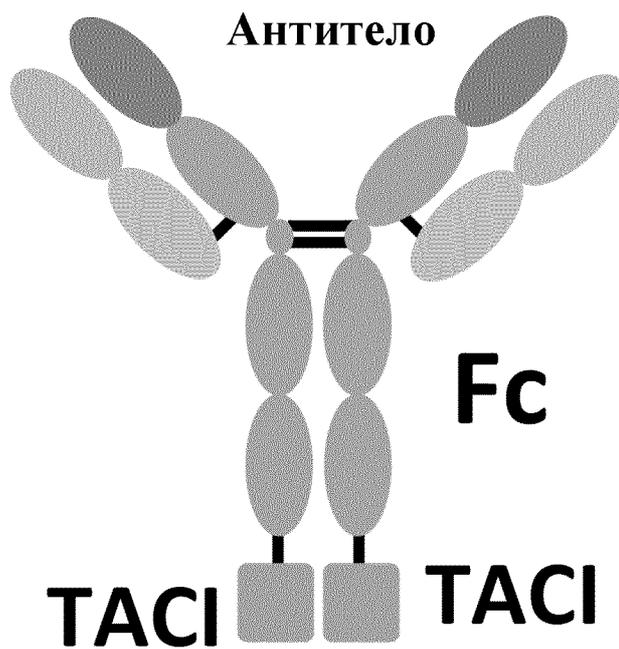
ФИГ. 1



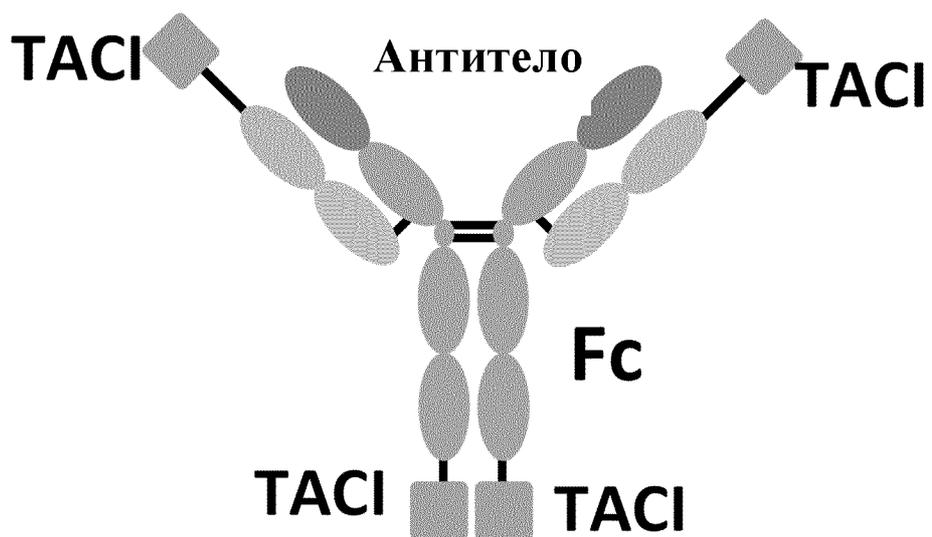
ФИГ. 2



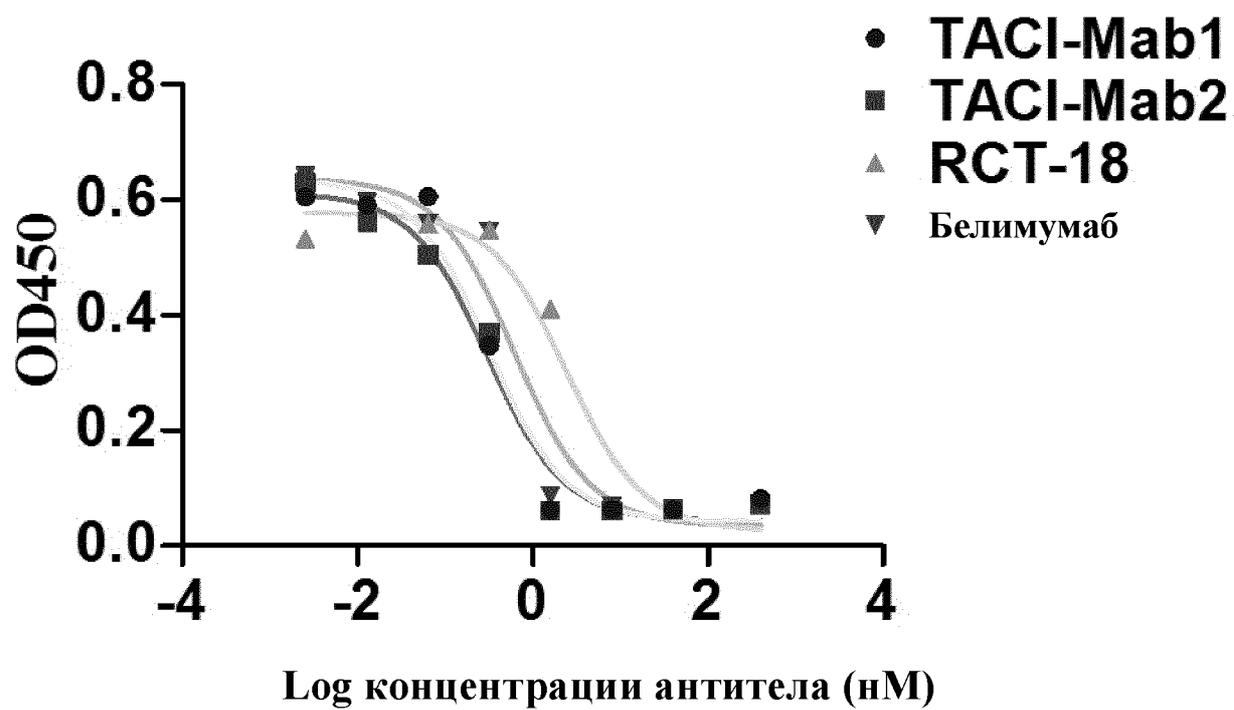
ФИГ. 3



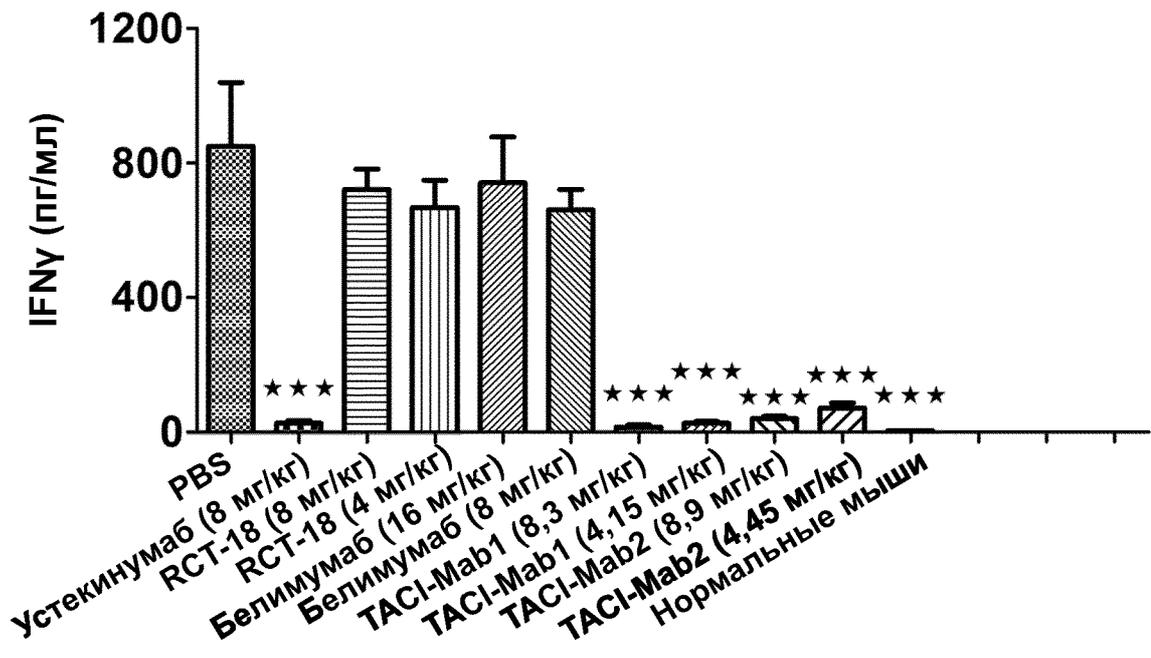
ФИГ. 4



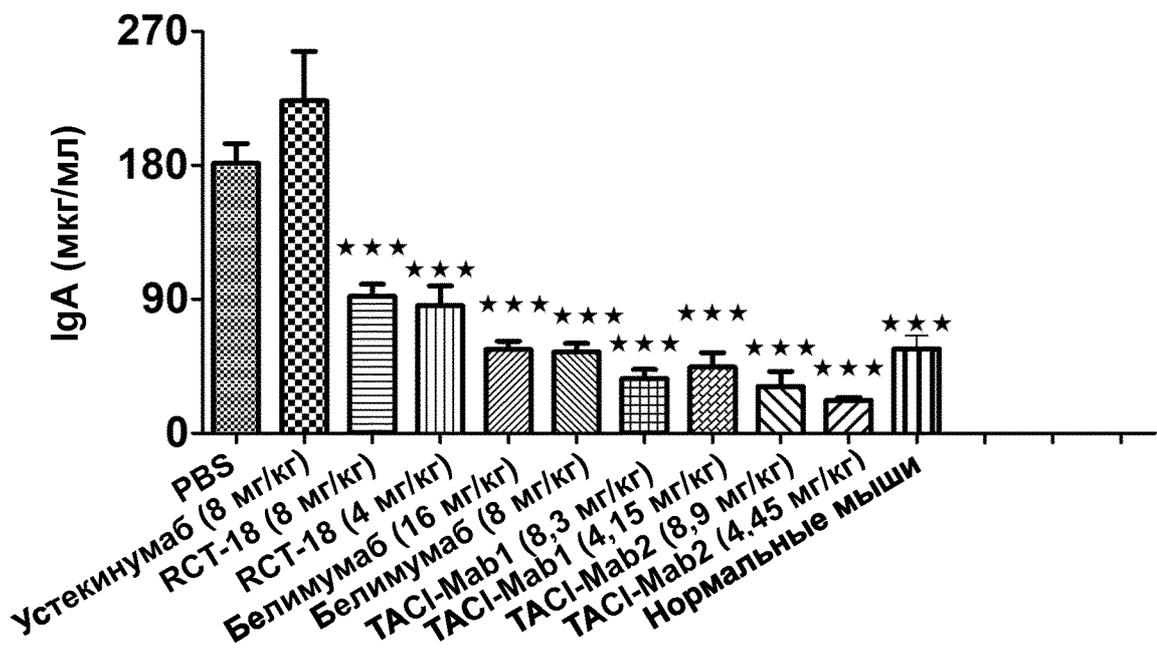
ФИГ. 5



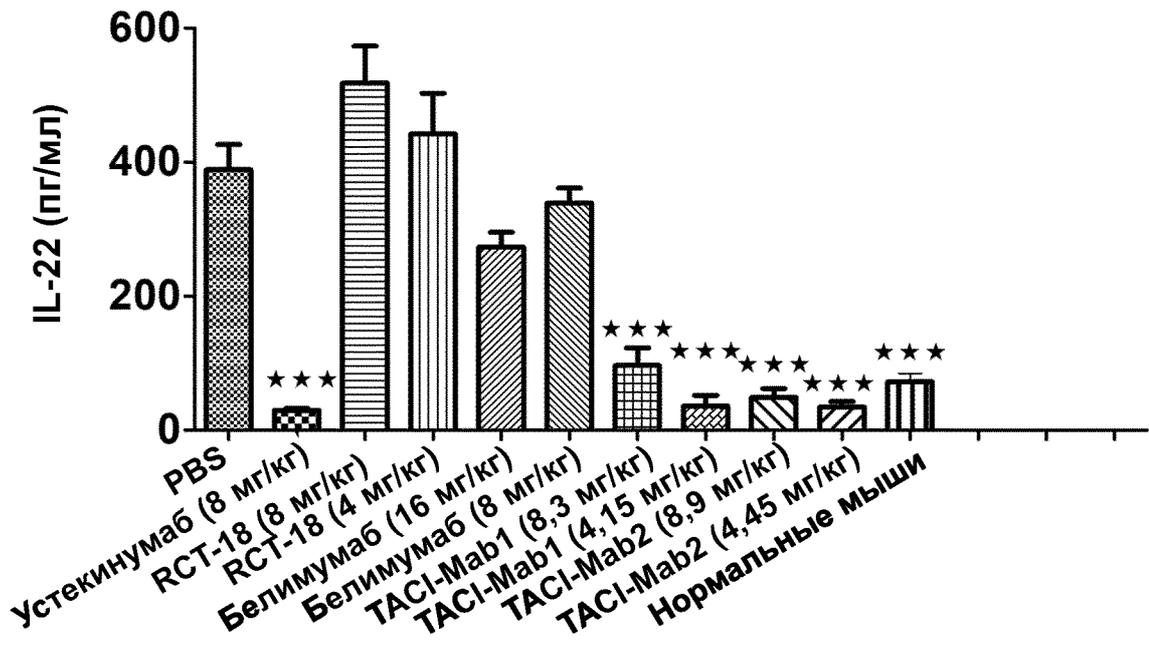
ФИГ. 6



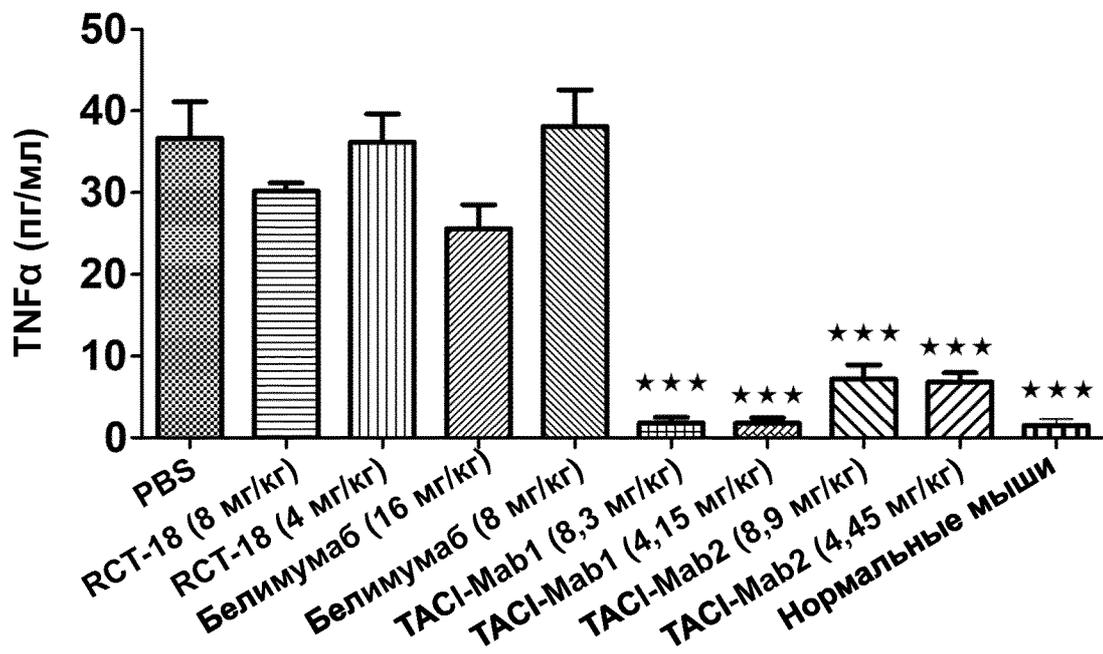
ФИГ. 7



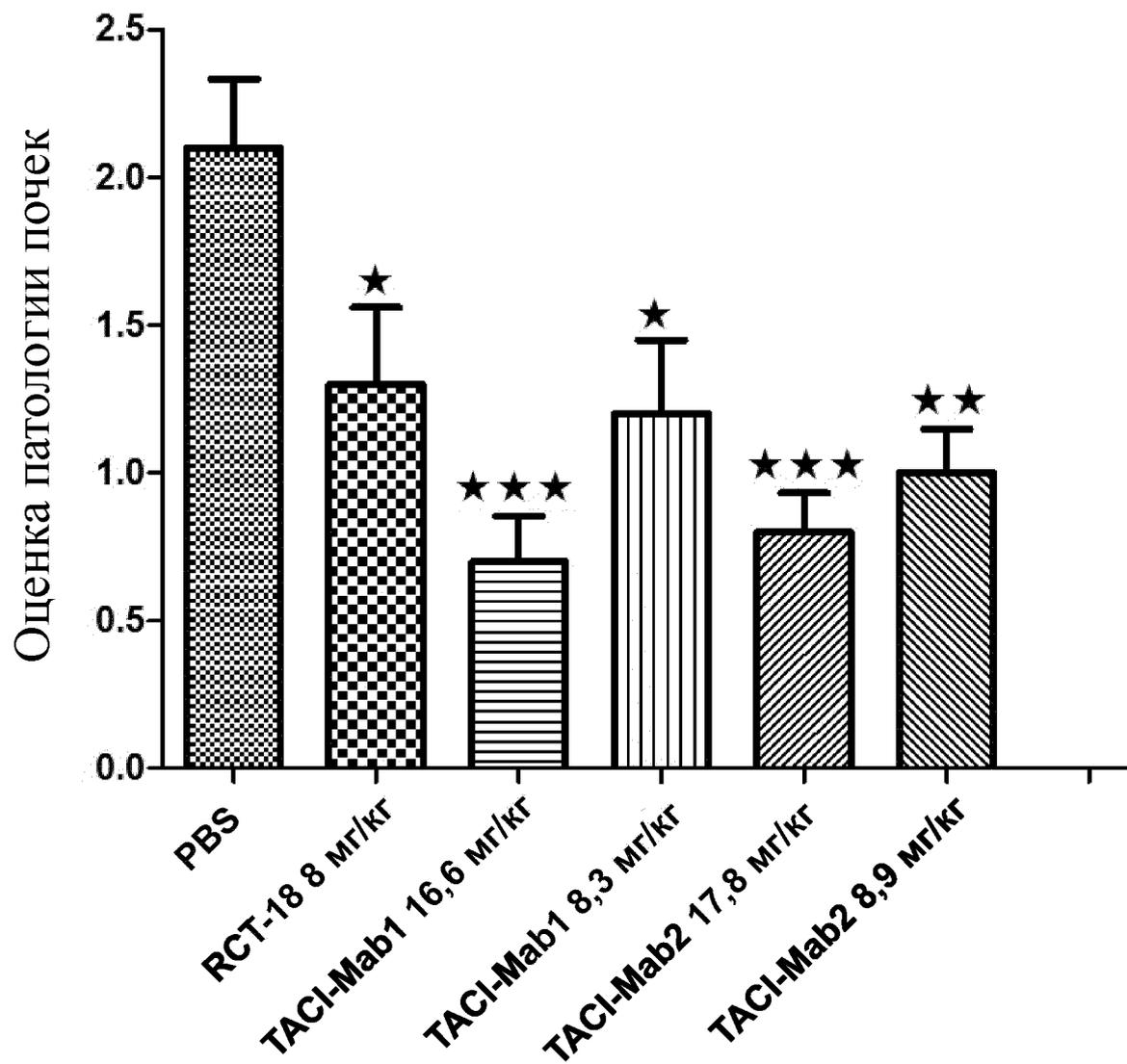
ФИГ. 8



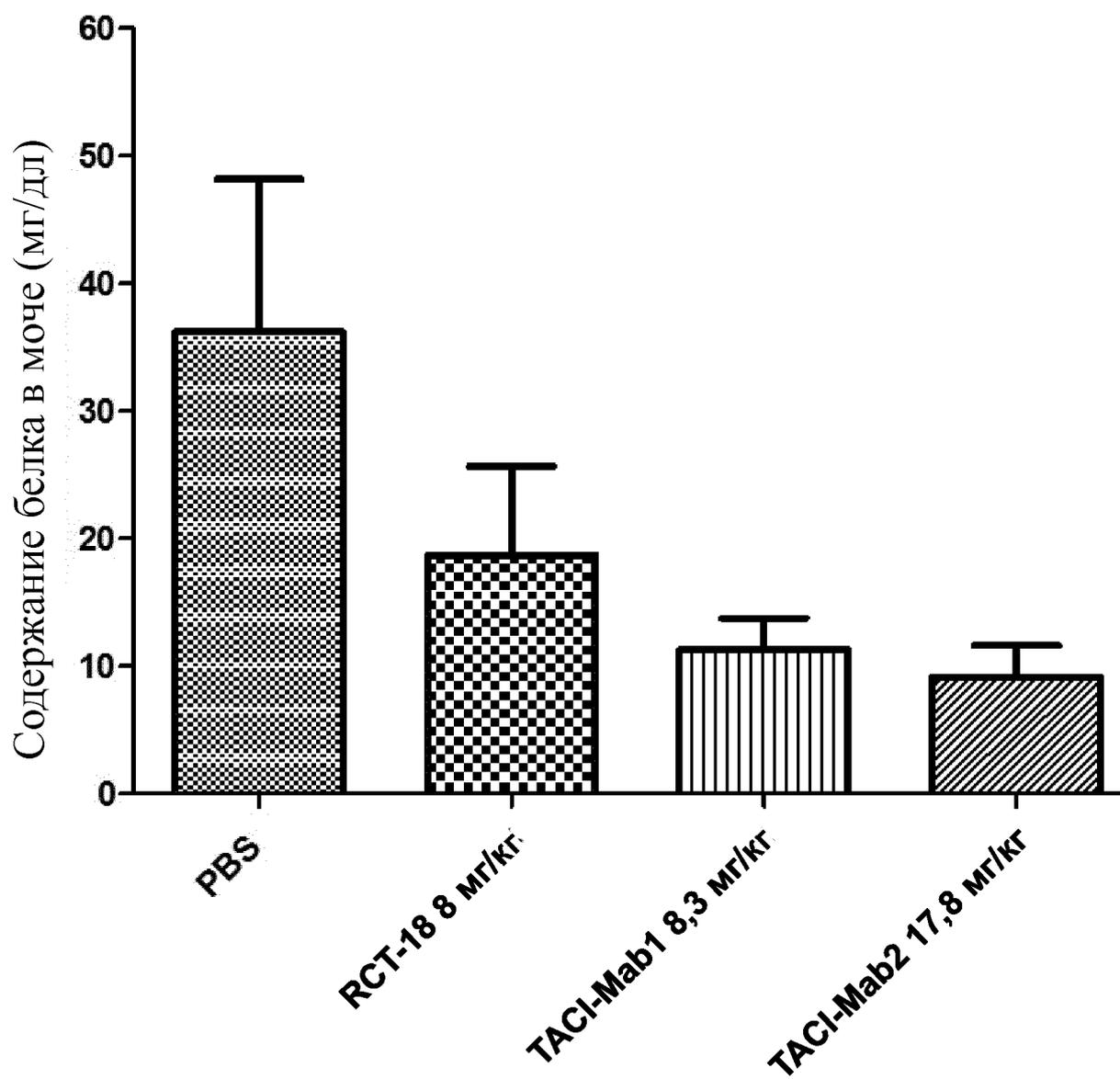
ФИГ. 9



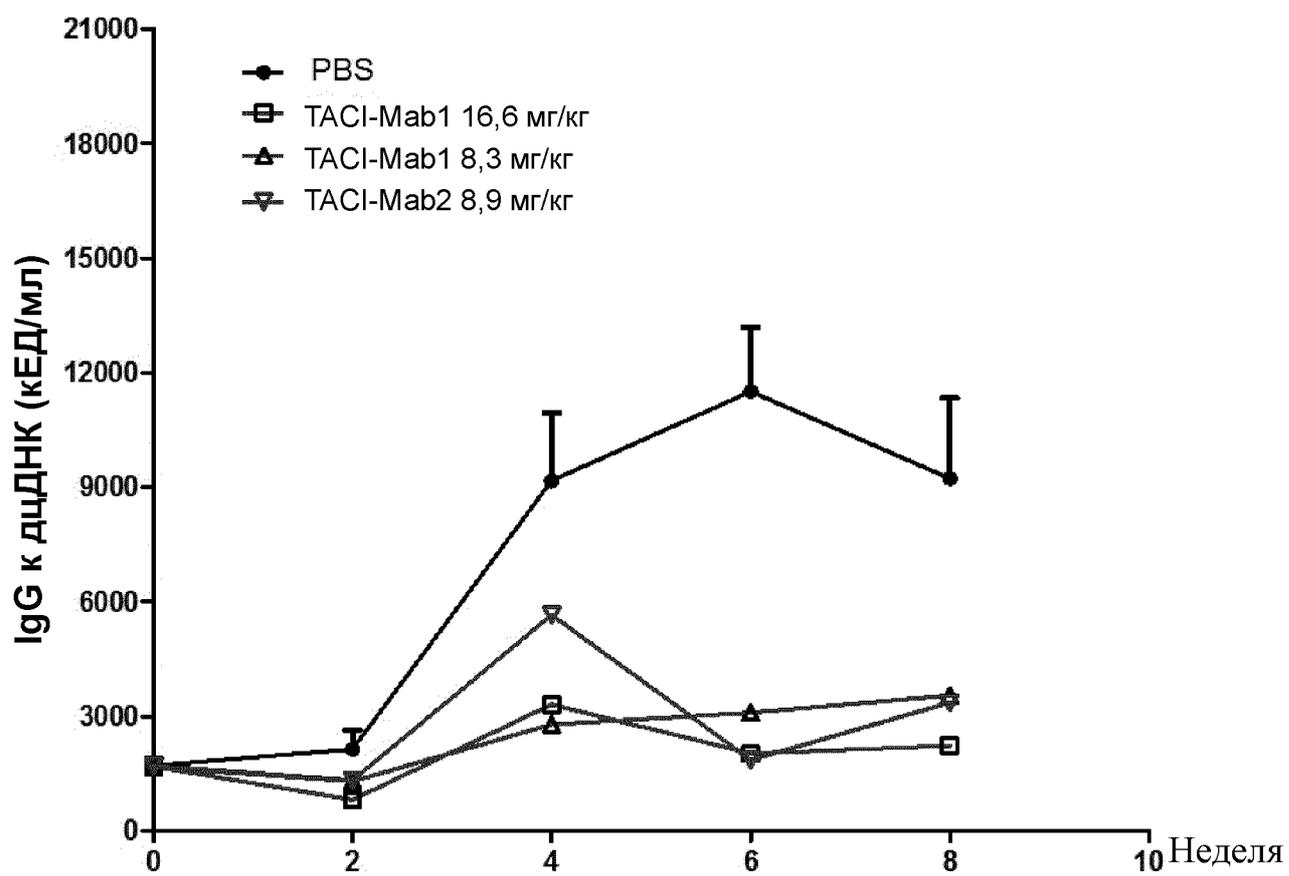
ФИГ. 10



ФИГ. 11



ФИГ. 12



ФИГ. 13