(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119236057 A
(43)申请公布日 2025.01.03

(21)申请号 202411255674.6

(22)申请日 2022.05.06

(30)优先权数据
63/186,027 2021.05.07 US
63/239,899 2021.09.01 US
63/256,505 2021.10.15 US
63/278,072 2021.11.10 US
63/329,325 2022.04.08 US

(62)分案原申请数据
202280047313.5 2022.05.06

(71)申请人 高山免疫科学股份有限公司
地址 美国华盛顿州

(72)发明人 S·迪伦 J·杨 S·L·彭

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴

(51)Int.Cl.
A61K 38/17(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)
A61P 37/02(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 13/12(2006.01)
A61P 37/06(2006.01)
A61P 31/12(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)
C07K 14/705(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)

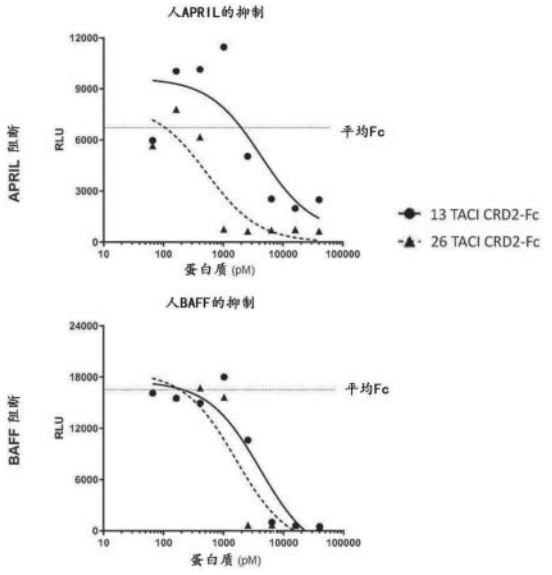
权利要求书1页 说明书125页
序列表（电子公布） 附图50页

(54)发明名称

使用TACI-Fc融合免疫调节蛋白的给药和治疗方法

(57)摘要

本发明涉及使用TACI-Fc融合免疫调节蛋白的给药和治疗方法。具体地,本文提供了涉及展现BAFF和APRIL(或BAFF/APRIL异三聚体)的中和活性的免疫调节TACI-Fc融合蛋白的治疗方法和用途。所提供的TACI-Fc蛋白可以包含跨膜激活剂和CAML相互作用因子(TACI)的变体结构域。所述方法和用途为多种免疫性疾病、障碍或病症如B细胞介导的疾病、障碍或病症提供治疗效用。



CN 119236057 A

1.一种治疗有需要的受试者的炎性或自身免疫性疾病或障碍的方法,所述方法包括向所述受试者施用TACI-Fc融合蛋白,所述TACI-Fc融合蛋白是式TACI-接头-Fc的两个多肽的同二聚体,其中TACI是包含SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列中的氨基酸取代K77E、F78Y和Y102D的变体TACI多肽,其中将所述TACI-Fc融合蛋白以从为或约2.4mg至为或约960mg的剂量每周施用一次直到每三个月施用一次。

2.根据权利要求1所述的方法,其中将所述TACI-Fc融合蛋白的剂量每三个月施用一次。

3.根据权利要求1所述的方法,其中将所述TACI-Fc融合蛋白的剂量每月施用一次(Q4W)。

4.根据权利要求1所述的方法,其中将所述TACI-Fc融合蛋白的剂量每隔一周施用一次(Q2W)。

5.根据权利要求1所述的方法,其中将所述TACI-Fc融合蛋白的剂量每周施用一次(Q1W)。

6.根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述TACI-Fc融合蛋白的剂量是从为或约8mg至960mg。

7.根据权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述TACI-Fc融合蛋白的剂量是从为或约80mg至960mg。

8.根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述TACI-Fc融合蛋白的剂量是从为或约80mg至为或约720mg、从为或约160mg至为或约560mg或从为或约240mg至为或约480mg。

9.根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述TACI-Fc融合蛋白的剂量是从为或约24mg至为或约480mg,任选地从为或约40mg至为或约480mg、从为或约80mg至为或约320mg或从为或约80mg至为或约120mg。

10.根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述TACI-Fc融合蛋白的剂量是从为或约240mg至为或约480mg或80mg至为或约120mg。

使用TACI-Fc融合免疫调节蛋白的给药和治疗方法

本申请是申请日为2022年5月6日、中国申请号为202280047313.5、发明名称为“使用TACI-Fc融合免疫调节蛋白的给药和治疗方法”的发明申请的分案申请。

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求以下专利申请的优先权:2021年5月7日提交的美国临时申请号63/186,027;2021年9月1日提交的美国临时申请号63/239,899;2021年10月15日提交的美国临时申请号63/256,505;2021年11月10日提交的美国临时申请号63/278,072;和2022年4月8日提交的美国临时申请号63/329,325,将所述专利申请的每一个的内容通过引用以其整体特此并入。

通过引用并入序列表

[0002] 本申请是与电子格式的序列表一起提交的。序列表以2022年5月4日创建的名为761612003940SeqList.TXT的文件提供,其大小为284,174字节。将在电子格式的序列表中的信息通过引用以其全文并入。

技术领域

[0003] 本公开文本提供了涉及展现BAFF和APRIL(或BAFF/APRIL异三聚体)的中和活性的免疫调节TACI-Fc融合蛋白的治疗方法和用途。所提供的TACI-Fc融合蛋白可以包含跨膜激活剂和CAML相互作用因子(TACI)的变体结构域。所述方法和用途为多种免疫性疾病、障碍或病症如B细胞介导的疾病、障碍或病症提供治疗效用。

背景技术

[0004] 通过在涉及可溶性配体与其受体之间的相互作用的过程中进行干预来调节免疫应答越来越引起医学方面的兴趣。目前,用于增强或抑制免疫应答的生物制品通常限于抗体(例如,抗PD-1抗体)或针对单一细胞表面分子的可溶性受体(例如,CTLA-4-Fc)。需要改进的治疗剂,所述治疗剂可以调节免疫应答、特别是B细胞免疫应答。提供了满足这种需要的实施方案。

发明内容

[0005] 本文提供了通过向有需要的受试者施用如本文所述的任何所提供的TACI-Fc融合蛋白治疗所述受试者的炎性或自身免疫性疾病或障碍的方法,其中所述TACI-Fc融合蛋白是式TACI-接头-Fc的两个多肽的同二聚体,其中TACI是如本文所述的变体TACI多肽,并且其中将所述TACI-Fc融合蛋白以从为或约2.4mg至为或约960mg的剂量每周施用一次直到每三个月施用一次。

[0006] 本文还提供了用途,所述用途包括含有如本文所述的任何所提供的TACI-Fc融合蛋白的药物组合物的用途,其中所述TACI-Fc融合蛋白是式TACI-接头-Fc的两个多肽的同二聚体,其中TACI是如本文所述的变体TACI多肽;以及在制备药剂以执行用于治疗炎性或自身免疫性疾病或障碍的此类治疗方法中的用途。在一些实施方案中,本文还提供了药物

组合物,所述药物组合物用于治疗受试者的炎性或自身免疫性疾病或障碍,其中所述药物组合物含有如本文所述的任何所提供的TACI-Fc融合蛋白,其中所述TACI-Fc融合蛋白是式TACI-接头-Fc的两个多肽的同二聚体,其中TACI是如本文所述的变体TACI多肽。在一些实施方案中,所述用途或用于所述用途的药物组合物用于以从为或约2.4mg至为或约960mg的剂量向受试者每周一次直到每三个月一次施用所述TACI-Fc融合蛋白。

[0007] 在一些实施方案中,所述TACI-Fc融合蛋白的剂量是从为或约8mg至960mg。在一些实施方案中,所述TACI-Fc融合蛋白的剂量是从为或约80mg至960mg。

[0008] 在一些实施方案中,所述TACI-Fc融合物的变体TACI多肽是由SEQ ID NO:13中所示的CRD2 TNF受体结构域组成的细胞外结构域的一部分,其中存在氨基酸取代K77E、F78Y和Y102D。在一些实施方案中,所述变体TACI示于SEQ ID NO:26中。在任何所述TACI-Fc融合蛋白的实施方案中,所述变体TACI经由所述接头与所述Fc结构域连接。

[0009] 本文提供了通过向有需要的受试者施用TACI-Fc融合蛋白治疗所述受试者的炎性或自身免疫性疾病或障碍的方法,所述TACI-Fc融合蛋白是式TACI-接头-Fc的两个多肽的同二聚体,其中TACI是包含SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列中的氨基酸取代K77E、F78Y和Y102D的变体TACI多肽,其中将所述TACI-Fc融合蛋白以从为或约2.4mg至为或约960mg的剂量每周施用一次直到每三个月施用一次。

[0010] 本文还提供了用途,所述用途包括含有如本文所述的任何所提供的TACI-Fc融合蛋白的药物组合物的用途,其中所述TACI-Fc融合蛋白是作为式TACI-接头-Fc的两个多肽的同二聚体的TACI-Fc融合蛋白,其中TACI是包含SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列中的氨基酸取代K77E、F78Y和Y102D的变体TACI多肽;以及在制备药剂以执行用于治疗炎性或自身免疫性疾病或障碍的此类治疗方法中的用途。在一些实施方案中,本文还提供了药物组合物,所述药物组合物用于治疗受试者的炎性或自身免疫性疾病或障碍,其中所述药物组合物含有TACI-Fc融合蛋白,所述TACI-Fc融合蛋白是式TACI-接头-Fc的两个多肽的同二聚体,其中TACI是包含SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列中的氨基酸取代K77E、F78Y和Y102D的变体TACI多肽。在一些实施方案中,所述用途或用于所述用途的药物组合物用于以从为或约2.4mg至为或约960mg的剂量向受试者每周一次直到每三个月一次施用所述TACI-Fc融合蛋白。

[0011] 在一些实施方案中,所述TACI-Fc融合蛋白的剂量是从为或约8mg至960mg。在一些实施方案中,所述TACI-Fc融合蛋白的剂量是从为或约80mg至960mg。本文提供了通过向有需要的受试者施用TACI-Fc融合蛋白治疗所述受试者的炎性或自身免疫性疾病或障碍的方法,所述TACI-Fc融合蛋白是式TACI-接头-Fc的两个多肽的同二聚体,其中将所述TACI融合蛋白以从为或约2.4mg至为或约960mg的剂量每周施用一次直到每三个月施用一次。在一些实施方案中,所述TACI是本文所述的任何一种TACI多肽,如本文所述的任何一种变体TACI多肽,所述接头是如本文所述的任何接头,并且所述Fc是本文所述的任何Fc区。

[0012] 本文提供了通过向有需要的受试者施用TACI-Fc融合蛋白治疗所述受试者的炎性或自身免疫性疾病或障碍的方法,所述TACI-Fc融合蛋白是式TACI-接头-Fc的两个多肽的同二聚体,其中将所述TACI融合蛋白以从为或约8mg至为或约960mg的剂量每周施用一次直到每三个月施用一次。在一些实施方案中,所述TACI是本文所述的任何一种TACI多肽,如本文所述的任何一种变体TACI多肽,所述接头是如本文所述的任何接头,并且所述Fc是本文

所述的任何Fc区。

[0013] 在一个方面,本文提供了一种治疗有需要的受试者的炎性或自身免疫性疾病或障碍的方法,所述方法包括向所述受试者施用TACI-Fc融合蛋白,所述TACI-Fc融合蛋白是式TACI-接头-Fc的两个多肽的同二聚体,其中TACI是包含SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列中的氨基酸取代K77E、F78Y和Y102D的变体TACI多肽,其中将所述TACI-Fc融合蛋白以从为或约8mg至为或约960mg的剂量每周施用一次直到每三个月施用一次。

[0014] 本文还提供了如所述的任何所提供的TACI-Fc融合蛋白的用途。用途包括用于任何此类所提供的方法中的包含所述TACI-Fc融合蛋白的药物组合物,以及在制备药剂以执行任何此类所提供的方法中的用途。

[0015] 在任何所提供的方法或用途的实施方案中,将所述TACI-Fc融合蛋白的剂量每三个月施用一次。在任何所提供的方法或用途的实施方案中,将所述TACI-Fc融合蛋白的剂量每月施用一次(Q4W)。在任何所提供的方法或用途的实施方案中,将所述TACI-Fc融合蛋白的剂量每隔一周施用一次(Q2W)。在任何所提供的方法或用途的实施方案中,将所述TACI-Fc融合蛋白的剂量每周施用一次(Q1W)。

[0016] 在任何所提供的方法或用途的实施方案中,将所述TACI-Fc融合蛋白以从为或约80mg至为或约720mg、从为或约160mg至为或约560mg或从为或约240mg至为或约480mg的剂量施用。在任何所提供的方法或用途的实施方案中,将所述TACI-Fc融合蛋白以从为或约40mg至为或约480mg、从为或约80mg至为或约320mg或从为或约80mg至为或约120mg的剂量施用。

[0017] 在一些实施方案中,所述TACI-Fc融合蛋白的剂量是从为或约80mg至为或约720mg。在一些实施方案中,所述TACI-Fc融合蛋白的剂量是从为或约160mg至为或约560mg。在一些实施方案中,所述TACI-Fc融合蛋白的剂量是从为或约240mg至为或约480mg。

[0018] 在一些实施方案中,所述TACI-Fc融合蛋白的剂量是从为或约24mg至为或约480mg。

[0019] 在一些实施方案中,所述TACI-Fc融合蛋白的剂量是从为或约40mg至为或约480mg。在一些实施方案中,所述TACI-Fc融合蛋白的剂量是从为或约80mg至为或约320mg。在一些实施方案中,所述TACI-Fc融合蛋白的剂量是从为或约80mg至为或约120mg。

[0020] 在任何所提供的方法或用途的实施方案中,将所述TACI-Fc融合蛋白以从为或约240mg至为或约480mg一次的剂量施用。在任何所提供的方法或用途的实施方案中,将所述TACI-Fc融合物以从为或约80mg至为或约120mg的剂量施用。

[0021] 在任何所提供的方法或用途的实施方案中,所述施用是经由静脉内施用。

[0022] 在一些实施方案中,用于静脉内施用的所述TACI-Fc融合蛋白的剂量是为或约2.4mg。在一些实施方案中,用于静脉内施用的所述TACI-Fc融合蛋白的剂量是为或约8mg。在一些实施方案中,用于静脉内施用的所述TACI-Fc融合蛋白的剂量是为或约24mg。在一些实施方案中,用于静脉内施用的所述TACI-Fc融合蛋白的剂量是为或约80mg。在一些实施方案中,用于静脉内施用的所述TACI-Fc融合蛋白的剂量是为或约240mg。在一些实施方案中,用于静脉内施用的所述TACI-Fc融合蛋白的剂量是为或约480mg。在一些实施方案中,用于静脉内施用的所述TACI-Fc融合蛋白的剂量是为或约960mg。

[0023] 在任何所提供的方法或用途的实施方案中,所述施用是经由皮下施用。

[0024] 在一些实施方案中,用于皮下施用的所述TACI-Fc融合蛋白的剂量是为或约80mg。在一些实施方案中,用于皮下施用的所述TACI-Fc融合蛋白的剂量是为或约240mg。在一些实施方案中,用于皮下施用的所述TACI-Fc融合蛋白的剂量是为或约480mg。在一些实施方案中,用于皮下施用的所述TACI-Fc融合蛋白的剂量是为或约960mg。

[0025] 在任何所提供的方法或用途的实施方案中,所述TACI-Fc融合蛋白中的变体TACI多肽示于SEQ ID NO:26中。

[0026] 在任何所提供的方法或用途的实施方案中,所述TACI-Fc融合蛋白中的接头选自GSGGS(SEQ ID NO:76)、GGGGS(G4S;SEQ ID NO:77)、GSGGGGS(SEQ ID NO:74)、GGGGSGGGGS(2xGGGGS;SEQ ID NO:78)、GGGGSGGGGSGGGGS(3xGGGGS;SEQ ID NO:79)、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(4xGGGGS;SEQ ID NO:84)、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(5XGGGGS;SEQ ID NO:91)、GGGGSSA(SEQ ID NO:80)、或GSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:194)或其组合。在任何所提供的方法或用途的实施方案中,所述接头示于SEQ ID NO:74中。

[0027] 在任何所提供的方法或用途的实施方案中,所述TACI-Fc融合蛋白中的Fc是IgG1Fc结构域。在任何所提供的方法或用途的实施方案中,所述Fc是变体IgG1 Fc,与野生型IgG1 Fc结构域相比,其展现对Fc受体的降低的结合亲和力和/或降低的效应子功能。在一些实施方案中,所述变体IgG1 Fc结构域包含选自以下的一个或多个氨基酸取代:L234A、L234V、L235A、L235E、G237A、S267K、R292C、N297G和V302C,根据EU编号。在一些实施方案中,所述变体IgG1 Fc包含氨基酸取代L234A、L235E和G237A,根据EU编号。

[0028] 在任何所提供的方法或用途的实施方案中,所述Fc包含氨基酸取代C220S,其中所述残基根据Kabat的EU索引编号。在任何所提供的方法或用途的实施方案中,所述Fc缺乏铰链序列EPKSS或EPKSC。所述Fc区包含K447del,其中所述残基根据Kabat的EU索引编号。

[0029] 在任何所提供的方法或用途的实施方案中,所述Fc包含SEQ ID NO:73中所示的氨基酸序列。在一些任何所提供的方法或用途中,所述TACI-Fc融合蛋白示于SEQ ID NO:167中。

[0030] 在任何所提供的方法或用途的实施方案中,所述Fc包含SEQ ID NO:81中所示的氨基酸序列。在任何所提供的方法或用途的实施方案中,所述TACI-Fc融合蛋白示于SEQ ID NO:168中。

[0031] 在任何所提供的方法或用途的实施方案中,所述施用是经由静脉内施用。在任何所提供的方法或用途的实施方案中,所述施用是经由皮下施用。

[0032] 在任何所提供的方法或用途的实施方案中,所述受试者中的B细胞免疫应答或活性降低。在任何所提供的方法或用途的实施方案中,所述受试者中的成熟B细胞和总循环B细胞的数量减少。在任何所提供的方法或用途的实施方案中,所述受试者中的循环血清免疫球蛋白(IgG)减少。在任何所提供的方法或用途的实施方案中,B细胞成熟、分化和/或增殖中的一种或多种被减少或抑制。在任何所提供的方法或用途的实施方案中,所述受试者中的APRIL或BAFF蛋白的循环水平降低,任选地其中所述APRIL或BAFF蛋白是APRIL同三聚体、BAFF同三聚体、APRIL/BAFF异三聚体或BAFF 60聚体。

[0033] 在任何所提供的方法或用途的实施方案中,所述疾病或障碍是B细胞介导的疾病或障碍。在任何所提供的方法或用途的实施方案中,所述疾病或障碍是自身免疫性疾病和炎性病症、B细胞癌、抗体介导的病理、肾病、移植物排斥、移植物抗宿主病或病毒感染。

[0034] 在任何所提供的方法或用途的实施方案中,所述疾病或障碍选自系统性红斑狼疮(SLE)、狼疮性肾炎、皮肤红斑狼疮、舍格伦综合征、硬皮病(系统性硬化)、多发性硬化、糖尿病(例如I型糖尿病)、多发性肌炎、原发性胆汁性肝硬化、IgG4相关疾病、IgA肾病、IgA血管炎、ANCA血管炎(显微镜下多血管炎、肉芽肿病伴多血管炎[韦格纳肉芽肿病]、嗜酸性肉芽肿病伴多血管炎[查格-施特劳斯])、冷球蛋白血症、冷凝集素或温凝集素疾病、免疫性血小板减少性紫癜、视神经炎、淀粉样变性、抗磷脂抗体综合征(APS)、自身免疫性多内分泌腺综合征II型(APS II)、自身免疫性甲状腺疾病(AITD)、格雷夫斯病、自身免疫性肾上腺炎、寻常型天疱疮、大疱性类天疱疮、重症肌无力、移植物抗宿主病(GVHD)、移植、类风湿性关节炎、急性狼疮性肾炎、肌萎缩侧索硬化、视神经脊髓炎、横贯性脊髓炎、拉斯穆森脑炎、CNS自身免疫、格林-巴利综合征、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病、神经囊尾蚴病(neurocystercercosis)、结节病、抗磷脂抗体综合征、IgG4相关疾病、桥本甲状腺炎、免疫性血小板减少症、艾迪生病和皮肌炎。

[0035] 在任何所提供的方法或用途的实施方案中,所述疾病或障碍是自身抗体相关肾小球疾病。在一些实施方案中,所述自身抗体相关肾小球疾病是免疫球蛋白(Ig)A肾病(IgAN)、狼疮性肾炎(LN)、原发性膜性肾病(pMN)或肾抗嗜中性粒细胞胞质抗体(ANCA)相关血管炎(AAV)。在一些实施方案中,所述疾病或障碍是自身抗体相关肾小球疾病,所述自身抗体相关肾小球疾病是免疫球蛋白(Ig)A肾病(IgAN)。在一些实施方案中,所述疾病或障碍是狼疮性肾炎(LN)。在一些实施方案中,所述疾病或障碍是原发性膜性肾病(pMN)。在一些实施方案中,所述疾病或障碍是肾抗嗜中性粒细胞胞质抗体(ANCA)相关血管炎(AAV)。

[0036] 在任何所提供的方法或用途的实施方案中,所述疾病或障碍是B细胞癌。在一些实施方案中,所述B细胞癌是骨髓瘤、B细胞慢性淋巴细胞白血病、华氏巨球蛋白血症或非霍奇金淋巴瘤。在一些任何实施方案中,骨髓瘤的类型包括多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、多发性孤立性浆细胞瘤和/或髓外骨髓瘤。在一些任何实施方案中,骨髓瘤的类型包括轻链骨髓瘤、非分泌性骨髓瘤和/或IgD或IgE骨髓瘤。

[0037] 在任何所提供的方法或用途的实施方案中,所述受试者是人。

[0038] 在任何所提供的方法或用途的实施方案中,所述TACI-Fc融合蛋白提供于配制品中,所述配制品包含pH从约4.0至约6.0的乙酸缓冲液、浓度从为或约1%至约10%的脯氨酸和浓度从约0.005%至约0.05%(w/v)的表面活性剂。在一些任何实施方案中,所述配制品的pH为约5.2。在一些任何实施方案中,所述乙酸缓冲液包含浓度从为或约5mM至为或约15mM的乙酸盐。在一些任何实施方案中,所述乙酸缓冲液包含浓度为或约10mM的乙酸盐。在一些任何实施方案中,所述脯氨酸的浓度是约2%至约5%。在一些任何实施方案中,所述脯氨酸的浓度是为或约3%。在一些任何实施方案中,所述表面活性剂的浓度是为或约0.015%(w/v)。在一些实施方案中,所述表面活性剂是聚山梨醇酯80。

[0039] 在一些任何实施方案中,所述配制品中TACI-Fc融合蛋白的量是从约50mg至约100mg。在一些任何实施方案中,所述配制品中TACI-Fc融合蛋白的量是为或约80mg。在一些任何实施方案中,所述TACI-Fc融合蛋白的浓度在约50mg/mL与约200mg/mL之间。在一些任何实施方案中,所述TACI-Fc融合蛋白的浓度是为或约100mg/mL。

[0040] 本文提供了一种配制品,所述配制品包含TACI-Fc融合蛋白、pH从约4.0至约6.0的乙酸缓冲液、浓度从为或约1%至约10%的脯氨酸和浓度从约0.005%至约0.05%(w/v)的

表面活性剂,其中所述TACI-Fc融合蛋白是式TACI-接头-Fc的两个多肽的同二聚体,其中TACI是包含SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列中的氨基酸取代K77E、F78Y和Y102D的变体TACI多肽。

[0041] 在一些任何实施方案中,所述配制品中TACI-Fc融合蛋白的变体TACI多肽示于SEQ ID NO:26中。在一些任何实施方案中,所述TACI-Fc融合蛋白的接头选自GSGGS(SEQ ID NO:76)、GGGGS(G4S;SEQ ID NO:77)、GSGGGGS(SEQ ID NO:74)、GGGGSGGGGS(2xGGGGS;SEQ ID NO:78)、GGGGSGGGGSGGGGS(3xGGGGS;SEQ ID NO:79)、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(4xGGGGS;SEQ ID NO:84)、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(5XGGGGS;SEQ ID NO:91)、GGGGSSA(SEQ ID NO:80)、或GSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:194)或其组合。在一些任何实施方案中,所述接头示于SEQ ID NO:74中。

[0042] 在一些任何实施方案中,所述配制品中TACI-Fc融合蛋白的Fc是IgG1 Fc结构域。在一些任何实施方案中,所述Fc是变体IgG1 Fc,与野生型IgG1 Fc结构域相比,其展现对Fc受体的降低的结合亲和力和/或降低的效应子功能。在一些任何实施方案中,所述变体IgG1 Fc结构域包含选自以下的一个或多个氨基酸取代:L234A、L234V、L235A、L235E、G237A、S267K、R292C、N297G和V302C,根据EU编号。在一些任何实施方案中,所述变体IgG1 Fc包含氨基酸取代L234A、L235E和G237A,根据EU编号。

[0043] 在一些任何实施方案中,所述Fc包含氨基酸取代C220S,其中所述残基根据Kabat的EU索引编号。在一些任何实施方案中,所述Fc缺乏铰链序列EPKSS或EPKSC。在一些任何实施方案中,所述Fc区包含K447del,其中所述残基根据Kabat的EU索引编号。

[0044] 在一些任何实施方案中,所述配制品中TACI-Fc融合蛋白的Fc包含SEQ ID NO:73中所示的氨基酸序列。在一些任何实施方案中,所述配制品中的TACI-Fc融合蛋白具有SEQ ID NO:167中所示的序列。在一些任何实施方案中,所述配制品中TACI-Fc融合蛋白的Fc包含SEQ ID NO:81中所示的氨基酸序列。在一些任何实施方案中,所述配制品中的TACI-Fc融合蛋白具有SEQ ID NO:168中所示的序列。

[0045] 在一些任何实施方案中,所述配制品的pH为约5.2。在一些任何实施方案中,所述乙酸缓冲液包含浓度从为或约5mM至为或约15mM的乙酸盐。在一些任何实施方案中,所述乙酸缓冲液包含浓度为或约10mM的乙酸盐。在一些任何实施方案中,所述脯氨酸的浓度是约2%至约5%。在一些任何实施方案中,脯氨酸的浓度是为或约3%。在一些任何实施方案中,所述表面活性剂的浓度是从约0.01至约0.025%(w/v)。在一些任何实施方案中,所述表面活性剂的浓度是为或约0.015%(w/v)。在一些实施方案中,所述表面活性剂是聚山梨醇酯80。

[0046] 在一些任何实施方案中,所述配制品中TACI-Fc融合蛋白的量是从约50mg至约100mg。在一些任何实施方案中,所述配制品中TACI-Fc融合蛋白的量是为或约80mg。在一些任何实施方案中,所述TACI-Fc融合蛋白的浓度在约50mg/mL与约200mg/mL之间。在一些任何实施方案中,所述TACI-Fc融合蛋白的浓度是为或约100mg/mL。

[0047] 在一些任何实施方案中,所述配制品是液体。在一些任何实施方案中,所述配制品的体积是0.5mL至2.0mL。在一些任何实施方案中,所述配制品的体积是为或约0.8mL。

[0048] 还提供了一种容器,所述容器包含任何所提供的配制品,如具有任何上述特征的配制品。在一些任何实施方案中,所述容器是小瓶或预填充注射筒。在一些任何实施方案

中,所述容器是玻璃小瓶。在一些任何实施方案中,所述容器容纳多达为或约5mL的体积。在一些任何实施方案中,所述容器容纳多达为或约2mL的体积。在一些实施方案中,所述容器是2mL玻璃小瓶。

[0049] 在一些任何实施方案中,提供了一种降低受试者的免疫应答的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的所述配制品。

[0050] 在一些任何实施方案中,所述受试者中的B细胞免疫应答降低,由此B细胞成熟、分化和/或增殖被降低或抑制。在一些任何实施方案中,所述受试者中的APRIL、BAFF或APRIL/BAFF异三聚体的循环水平降低。在一些任何实施方案中,降低所述免疫应答治疗所述受试者的疾病、障碍或病症。在一些任何实施方案中,提供了一种降低受试者中APRIL、BAFF或APRIL/BAFF异三聚体的循环水平的方法,所述方法包括施用治疗有效量的所述配制品。

[0051] 还提供了一种治疗受试者的疾病、障碍或病症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的任何所提供的配制品,包括具有上述特征的任何配制品。在一些任何实施方案中,所述疾病、障碍或病症是自身免疫性疾病、和炎性病症、B细胞癌、抗体介导的病状、肾病、移植物排斥、移植物抗宿主病或病毒感染。在一些任何实施方案中,所述疾病、障碍或病症选自:系统性红斑狼疮(SLE);舍格伦综合征、硬皮病、多发性硬化、糖尿病、多发性肌炎、原发性胆汁性肝硬化、IgA肾病、IgA血管炎、视神经炎、淀粉样变性、抗磷脂抗体综合征(APS)、自身免疫性多内分泌腺综合征II型(APS II)、自身免疫性甲状腺疾病(AITD)、格雷夫斯病、自身免疫性肾上腺炎和寻常型天疱疮。

[0052] 在任何所提供的方法或用途的实施方案中,所述疾病或障碍是自身抗体相关肾小球疾病。在一些实施方案中,所述自身抗体相关肾小球疾病是免疫球蛋白(Ig)A肾病(IgAN)、狼疮性肾炎(LN)、原发性膜性肾病(pMN)或肾抗嗜中性粒细胞胞质抗体(ANCA)相关血管炎(AAV)。在一些实施方案中,所述疾病或障碍是自身抗体相关肾小球疾病,所述自身抗体相关肾小球疾病是免疫球蛋白(Ig)A肾病(IgAN)。在一些实施方案中,所述疾病或障碍是狼疮性肾炎(LN)。在一些实施方案中,所述疾病或障碍是原发性膜性肾病(pMN)。在一些实施方案中,所述疾病或障碍是肾抗嗜中性粒细胞胞质抗体(ANCA)相关血管炎(AAV)。

[0053] 在一些任何实施方案中,所述疾病、障碍或病症是B细胞癌并且所述癌症是骨髓瘤。

附图说明

[0054] 图1显示通过TACI进行的涉及重组APRIL和BAFF的功能抑制测定的示意性代表图。在所述测定中,Jurkat细胞用基于萤光素酶的NF-κB报告物转导并且用于基于细胞表面表达来稳定表达小鼠或人TACI。在通过重组APRIL或BAFF激活后,内源NF-KB转录因子与控制萤火虫萤光素酶基因的转录的DNA应答元件结合。可以监测萤光素酶表达,如通过用Bio-Glo™试剂检测和使用Cytation 3读取器测量。

[0055] 图2显示用于阻断人APRIL(上图)和BAFF(下图)介导的信号传导的示例性人TACI TD Fc融合分子。将TACI TD Fc融合物与APRIL或BAFF一起孵育20min(室温和振荡),然后将其添加至含有150,000个Jurkat/TACI/NFκB-萤光素酶细胞的孔中持续5小时。

[0056] 图3A显示示例性TACI TD Fc融合分子用于阻断APRIL(该图的上图)或BAFF(该图的下图)的功能。

[0057] 图3B显示用于阻断小鼠APRIL(左图)和BAFF(右图)介导的信号传导的人TACI TD Fc融合分子。

[0058] 图4显示相对于TACI 13-118-Fc、TACI 30-110-Fc和贝利木单抗,用于阻断人APRIL(上图)和BAFF(下图)介导的信号传导的人TACI TD Fc融合分子。

[0059] 图5A-图5C显示相对于贝利木单抗、BION-1301和WT TACI-Fc分子,包括WT TACI 30-110(阿塞西普)和WT TACI 13-118-Fc(泰它西普),用于阻断BAFF(图5A)、APRIL(图5B)和组合BAFF+APRIL(图5C)介导的信号传导的示例性人TACI TD Fc融合分子26TACI CRD2-Fc。

[0060] 图6A-图6J显示在人SLE的NZB/NZW鼠模型中评估的参数的分析。在20周龄开始评估蛋白尿得分(图6A)、体重的平均变化百分比(图6B)和存活率百分比(图6C)。针对抗双链DNA IgG滴度(图6D)和血尿素氮(BUN)(图6E)分析血清(****相比于Fc,通过Student's t检验,对于抗dsDNA IgG,$p<0.0001$;***相比于Fc,通过Student'st检验,对于BUN-4,$p=0.0008$)。对肾脏进行处理并在重复过碘酸希夫(PAS)染色切片中通过组织学加以分析,且单独的组分和总组织学得分描绘于图6F中。还将冷冻的肾脏切片并染色用于小鼠IgG和补体C3肾小球沉积的免疫组织化学分析,分别如图6G和图6H中所示。图6I显示组织学得分±SEM。如通过下颌下腺组织学得分测量的涎腺炎示于图6J中。

[0061] 图7显示TACI突变(K77E/F78Y/Y102D)抑制APRIL(左图)和BAFF(右图)介导的信号传导的能力,通过Jurkat/NF-κB/TACI细胞中的萤光素酶产生来定量。

[0062] 图8A和图8B描绘示例性TACI-Fc融合蛋白的示意性代表图。图8A描绘含有两个富半胱氨酸假重复序列(CRD)的示例性TACI-Fc融合蛋白。图8B描绘含有一个富半胱氨酸假重复序列(CRD,例如CRD2)的示例性TACI-Fc融合蛋白。

[0063] 图9描绘用于鉴定与参考序列相比序列中的相应残基的示例性序列比对。两个比对的氨基酸之间的符号“*”指示比对的氨基酸是相同的。符号“-”指示比对中的空位。用于本文所述的氨基酸取代的示例性非限制性位置用粗体文本指示。基于具有共有的相同残基的两个类似序列的比对,技术人员可以通过使用保守且相同的氨基酸残基作为指导与参考序列相比较来鉴定序列中的“相应”位置。图9提供SEQ ID NO:122中所示的参考TACI细胞外结构域序列(含有具有CRD1和CRD2以及起始甲硫氨酸残基的完整细胞外结构域)与SEQ ID NO:13中所示的TACI细胞外结构域序列(仅含有单一CRD,即CRD2)的示例性比对;比对相同残基显示,例如,SEQ ID NO:13中的氨基酸残基E7对应于SEQ ID NO:122中的残基E74,SEQ ID NO:13中的氨基酸残基K10对应于SEQ ID NO:122中的残基K77,SEQ ID NO:13中的氨基酸残基Y12对应于SEQ ID NO:122中的Y79,SEQ ID NO:13中的氨基酸残基L15对应于SEQ ID NO:122中的L82,SEQ ID NO:13中的氨基酸残基R17对应于SEQ ID NO:122中的R84;并且SEQ ID NO:13中的氨基酸残基D16对应于SEQ ID NO:122中的D85。技术人员可以熟练地在两个类似蛋白质序列之间进行类似比对以鉴定对应残基,包括基于本文的例示和描述来进行。

[0064] 图10A-图10D显示鼠钥孔戚血蓝蛋白(KLH)模型中评估的参数的分析。将血清-KLH IgM OD水平评估为初次应答(图10A)和再次应答(图10B)。类似地,将血清抗KLH IgG1 OD水平评估为初次应答(图10C)和再次应答(图10D)二者。

[0065] 图11A-图11B显示从鼠钥孔戚血蓝蛋白(KLH)免疫模型评估的收获的脾脏的分析。对脾脏进行处理并通过重量(图11A)以及总细胞数量(图11B)加以分析。

[0066] 图12描绘从鼠钥孔戚血蓝蛋白(KLH)模型针对细胞亚型群体组成评估的脾脏的分析,并且显示相对于组平均值的B细胞子集数量的结果。

[0067] 图13描绘从鼠钥孔戚血蓝蛋白(KLH)模型针对细胞亚型表型组成评估的脾脏的分析,并且显示生发中心B细胞和浆细胞的数量的结果(图13)。

[0068] 图14A-图14D描绘鼠钥孔戚血蓝蛋白(KLH)模型中的T细胞数量。脾CD3+、CD8+、CD4+和滤泡辅助T细胞分别描绘于图14A、图14B、图14C和图14D中。

[0069] 图15描绘鼠钥孔戚血蓝蛋白(KLH)模型中的Tcm和Tem细胞群体。

[0070] 图16A-图16B和图17A-图17B描绘在用所测试分子治疗后,在易患糖尿病的小鼠中涎腺炎(图16A-图16B)和胰岛炎(图17A-图17B)的总体发病率和程度。

[0071] 图18和图19描绘在药代动力学/药效学研究中在雄性Sprague Dawley大鼠中单次静脉内输注后示例性测试分子的血清免疫球蛋白(IgM、IgA和IgG)浓度。

[0072] 图20A和图20B描绘在PK/PD模型中施用至食蟹猴的示例性测试分子的单独动物血清浓度与时间曲线。图20B中描绘的对于阿塞西普的结果是基于公布的数据(Carbonatto等人(2008)Toxicol Sci 105:200-210)。

[0073] 图21描绘在食蟹猴PK/PD模型中接受示例性测试分子的动物中的血清IgM、IgA和IgG的水平。

[0074] 图22描绘在食蟹猴PK/PD模型中接受示例性测试分子的动物的绝对细胞计数。

[0075] 图23描绘在食蟹猴PK/PD模型中接受示例性测试分子的动物的相比于基线的细胞%。

[0076] 图24描绘在食蟹猴PK/PD模型中接受示例性测试分子的动物的增殖性T细胞的绝对计数或相对百分比。

[0077] 图25A-图25B描绘在两室PK模型中每四周(图25A)或每两周(图25B)重复IV给药后预测的人PK特征。

[0078] 图25C描绘在施用示例性TACI CRD2-Fc的人队列中血清IgA、IgG、IgM水平以及它们相比于基线的相应变化。

[0079] 图26A-图26E描绘类别转换记忆B细胞(图26A)、浆细胞(图26B)和免疫球蛋白分泌(图26C-图26E)的抑制。

[0080] 图27A-图27C描绘在接受测试分子的CIA小鼠模型中的骨髓(图27A)、脾脏(图27B)和淋巴结(图27C)中浆细胞的水平。

[0081] 图28描绘接受示例性TACI-Fc融合蛋白的食蟹猴的骨髓涂片中的浆细胞数量。

[0082] 图29A-图29B描绘在食蟹猴1个月GLP毒理学研究中接受示例性TACI-Fc融合蛋白的动物的剂量依赖性血清浓度与时间曲线(图29A)和相比于基线的细胞%(图29B)。

[0083] 图30描绘在食蟹猴1个月GLP毒理学研究中接受示例性TACI-Fc融合物的动物中血清IgA、IgG和IgM的水平。

[0084] 图31对来自鼠慢性移植物抗宿主病(cGVHD)模型的所评估的收获脾脏的分析。处理脾脏并依据重量以及总细胞数量进行分析。

[0085] 图32描绘对来自鼠慢性移植物抗宿主病模型的针对细胞群体组成评估的脾脏的分析,并且显示$CD45^+$细胞和$B220^+$B细胞数量的结果。

[0086] 图33描绘针对细胞亚型群体组成评估的脾脏的分析,并且显示$CD4^+$和$CD8^+$T细胞子

集数量的结果。

[0087] 图34描绘cGVHD模型中的$CD4^+$T细胞子集数量。

[0088] 图35A描绘cGVHD模型中$B220^+$B细胞和$CD1d^{高}CD5^+$B-1细胞数量。图35B描绘cGVHD模型中的过渡-1(T1)和过渡-2(T2)B细胞数量。

[0089] 图36A-图36B描绘cGVHD模型中的滤泡和边缘区(MZ)B细胞(图36A)、生发中心(GC)B细胞和浆细胞(图36B)数量。

[0090] 图37描绘cGVHD模型中的早期浆细胞、浆母细胞和长寿命浆细胞(LL-PC)数量。

[0091] 图38描绘如通过用对小鼠IgG具有特异性的荧光标记的抗体进行免疫组织化学染色所测量的在肾脏中的肾IgG免疫复合物沉积。

[0092] 图39显示在第8周和第13周抗dsDNA自身抗体血清滴度的分析。

[0093] 图40显示在自身抗体相关肾小球肾炎的$H\text{-}2^{bm12}$小鼠模型中抗dsDNA自身抗体血清滴度的分析。

[0094] 图41描绘如通过用对小鼠IgG具有特异性的荧光标记的抗体进行免疫组织化学染色所测量的在肾脏中的肾IgG免疫复合物沉积。

[0095] 图42在自身抗体相关肾小球肾炎的小鼠模型中接受示例性TACI-Fc融合物的动物中血清IgA、IgM和IgG(IgG1、IgG2b和IgG3)的水平。

具体实施方式

[0096] 本文提供免疫调节蛋白,所述免疫调节蛋白与一种或多种配体(例如作为可溶性因子产生的)接合,以抑制或降低B细胞应答或活性。所提供的免疫调节蛋白包括与BAFF或APRIL配体结合以中和其活性并阻断或拮抗B细胞刺激性受体(如TACI或BCMA)的活性的蛋白质。所提供免疫调节蛋白可以是TACI细胞外结构域或其结合部分(下文的TACI ECD)与多聚化结构域的融合蛋白,如免疫球蛋白Fc。例如,本文提供TACI-Fc融合蛋白。在一些实施方案中,本文提供的免疫调节蛋白可以用于治疗与失调的免疫应答相关,如与炎性或自身免疫性症状相关的疾病、障碍或病症,包括炎性疾病或自身免疫性疾病。

[0097] 免疫系统依赖于免疫检查点来预防自身免疫(即,自身耐受)并防止组织在免疫应答期间(例如在针对病原体感染的攻击期间)受到过度损伤。然而,在一些情形中,免疫系统可能变得失调并且可能针对正常身体部分或组织发动异常免疫应答,从而导致自身免疫性疾病或病症或自身免疫性症状。在其他情形中,可能对外来组织如移植物发动不期望的免疫应答,从而导致移植排斥。

[0098] 在一些方面,改变免疫细胞活性(如B细胞活性)的免疫疗法可以治疗免疫应答失调的某些疾病、障碍和病症。特定地,免疫应答(如B细胞应答)的抑制或减弱对于减少或预防不期望的炎症、自身免疫性症状和/或移植排斥可能是合意的。然而,追求调节配体与其受体之间的介导免疫应答的相互作用的治疗方法并不完全令人满意。在一些情形中,用于干预和改变免疫细胞(例如或B细胞)激活的免疫调节作用的疗法受制于空间定向要求以及免疫突触界限所施加的大小限制。在一些方面,现有的治疗药物(包括抗体药物)可能无法同时与调节这些相互作用中所涉及的多种靶蛋白相互作用。例如,可溶性受体和抗体通常竞争性结合(例如,一次结合不超过一个靶种类),并因此缺少同时结合多个靶标的能力。另外,独立地靶向这些受体中的一种的药物之间的药代动力学差异可能在整个治疗过程中在

适当维持靶向两个不同靶标的药物组合的所需血液浓度方面造成困难。

[0099] BAFF和APRIL是结合B细胞上的TACI和BCMA受体两者的TNF超家族成员;BAFF还结合第三受体即BAFF受体(BAFF-R)。BAFF和APRIL两者均可以结合并激活BCMA和TACI;BAFF还结合并激活BAFF-R(Xu等人2020Cancers(Basel)12(4):1045)。BAFF和APRIL共同支持B细胞的发育、分化和存活,特别是支持浆母细胞和浆细胞,并且在B细胞相关自身免疫性疾病的发病机制中起作用。BAFF和APRIL最初以跨膜蛋白的形式表达,主要在基质细胞和骨髓来源的细胞上表达(Smulski等人Front.Immunol.2018 9:2285),并且可以被切割以释放可溶性细胞因子。BAFF以同三聚体、60聚体或含有2个APRIL和1个BAFF或2个BAFF和1个APRIL原体的异三聚体的形式循环。APRIL以同三聚体或异三聚体的形式循环,并且可以通过与硫酸乙酰肝素蛋白聚糖的相互作用定位于细胞内基质或细胞表面。

[0100] 在促炎性条件下,BAFF和APRIL的表达增加(Smulski等人2018),并且这些细胞因子的升高的血清水平与患有包括系统性红斑狼疮(SLE)在内的B细胞相关自身免疫性疾病的患者的疾病严重程度相关(Samy等人Int.Rev.Immunol.2017 36:3-19)。BAFF/APRIL与其受体的结合触发B细胞和浆细胞发育、分化和激活的事件。例如,BAFF-R的激活促成过渡和幼稚B细胞的存活和成熟,而TACI参与对某些抗原的T细胞非依赖性B细胞应答、B细胞调节和免疫球蛋白(Ig)类别转换重组。在激活的B细胞中上调的BCMA对于浆细胞的长期存活是重要的。

[0101] 已经在临床试验中研究BAFF和/或APRIL的抑制剂用于治疗多种自身免疫性疾病或其他B细胞相关疾病。BAFF的抑制剂贝利木单抗(Benlysta®)已被批准用于治疗SLE(Benlysta Product Information,2020),并且APRIL的单途径抑制剂(例如,BION1301和VIS649)目前正在2期研究[NCT04684745;NCT04287985]中进行评价。

[0102] BAFF和APRIL的共中和明显降低B细胞功能,包括抗体产生,而对单独的BAFF或APRIL的抑制介导相对不大的效应。TACI的野生型(WT)细胞外结构域和IgG1的Fc结构域(例如阿塞西普和泰它西普)的Fc融合物正在临床开发中,并且靶向BAFF和APRIL两者。这些双重BAFF/APRIL拮抗剂已显示出抑制未成熟和成熟B细胞和浆细胞的存活,同时保留B细胞祖细胞和记忆B细胞(Cogollo等人2015Drug Des Devel Ther.9:1331-9;Samy等人2017;Zhao等人2016J Clin Pharmacol.56:948-959)。这两者降低血清IgG、IgM和IgA的水平以及成熟和总循环B细胞的数量(Coggollo等人2015;Chen等人2014Clin Pharmacokinet.53:1033-44;Chen等人2016Br J Clin Pharmacol.82:41-52;Zhao等人2016)。当直接与非临床研究中单独抑制BAFF或APRIL相比,双重抑制剂已显示出更明显的药效学(PD)作用和对疾病模型的更大修饰(Ramanujam等人2006J Clin Invest.116:724-34;Benson等人2008J Immunol.180:3655-3659;Haselmeyer等人2017ur J.Immunol.47:1075-1085;Samy等人2017)。阿塞西普和泰它西普已在某些自身免疫性疾病(例如系统性红斑狼疮(SLE)和IgA肾病)中显示出有希望的临床潜力,但尚未清楚地展现长期和/或完全的疾病缓解。尽管B细胞靶向疗法已经显示有前景的治疗潜力,但它们并不完全令人满意。例如,可溶性重组TACI(例如阿塞西普或泰它西普)显示作为治疗药的很大前景,但它的有用性似乎受到对APRIL的低至中亲和力妨碍。

[0103] 所提供的实施方案包括提供改进的中和活性以及对B细胞应答的抑制或降低的那些。在一些实施方案中,所述改进的活性由所提供的免疫调节蛋白(例如TACI-Fc融合蛋白)

与BAFF和/或APRIL的增加的或改进的结合或相互作用介导。所提供的免疫调节蛋白阻断或拮抗BAFF或APRIL(如BAFF或APRIL的同三聚体、BAFF/APRIL的异三聚体或BAFF 60聚体)与同源B细胞刺激性受体的相互作用,从而中和BAFF和/或APRIL配体的活性。在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白降低一种或多种B细胞应答或活性,包括B细胞产生免疫球蛋白的能力。在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白(例如TACI-Fc融合蛋白)在施用至受试者时减少循环血清免疫球蛋白。在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白降低B细胞成熟、分化和增殖中的一种或多种。在所提供的方面,这样的活性相比于通过WT TACI-Fc融合蛋白(例如泰它西普或阿塞西普)实现的活性是改进的或更优的。在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白(TACI-Fc融合蛋白)是用于多种自身免疫性和炎性疾病、特别是B细胞相关疾病(如SLE、SjS和其他结缔组织病)的治疗的候选治疗药。

[0104] 所提供的实施方案包括同时抑制BAFF和APRIL细胞因子的TACI变体TNF受体结构域(TD,即CRD2)的特定Fc融合蛋白的方法和用途。所提供的实施方案涉及变体TACI多肽的鉴定,所述变体TACI多肽在TACI的第二富半胱氨酸结构域(CRD2)(跨越残基68-110)的随机诱变和定向进化后被工程化以具有对APRIL和/或BAFF的改进的亲和力。如本文所示,亲和力成熟包括在APRIL与BAFF之间交替的五次选择,其中选择试剂浓度并行降低以维持选择压力。结果显示,如与野生型TACI相比,变体TACI多肽展现显著增强的对BAFF和APRIL的亲和力。例如,本文提供含有一个或多个氨基酸取代(替代或突变)的变体TACI多肽,所述取代赋予所述蛋白质对BAFF和/或APRIL改进的结合亲和力。特定地,所提供的实施方案包括提供改进的组合BAFF和APRIL抑制的那些。因此,所提供的免疫调节蛋白在自身免疫性或炎性疾病(包括严重的B细胞相关自身免疫性疾病,如SLE)的治疗中提供有效且持久的疾病抑制。

[0105] 例如,所提供的实施方案是基于如下发现:通过对TACI的胞外域的TNFR结构域(TD)的亲和力修饰进行的定向进化有利于对APRIL和/或BAFF具有改进的亲和力的分子的开发。因此,所述亲和力修饰产生含有变体TNFR结构域(vTD)的变体TACI。这样的分子与免疫球蛋白Fc的融合得到抑制B细胞活性和应答的免疫调节蛋白。例如,再格式化为可溶性Fc融合蛋白,亲和力成熟的TACI变体输出展现对APRIL和BAFF的抑制,如本文在TACI依赖性报告物测定中所示,并且其IC_{50}值低于野生型TACI-Fc和贝利木单抗比较物。此外,所评价的动物模型中的结果显示快速且显著减少的关键淋巴细胞子集,包括浆细胞、生发中心B细胞和滤泡T辅助细胞。此外,所测试的变体分子在小鼠模型中展现改进的活性,包括自发SjS模型中显著减少的自身抗体和涎腺炎、bm12诱导的狼疮模型中受抑制的肾小球IgG沉积以及NZB/W狼疮模型中有效抑制的抗dsDNA自身Ab、血尿素氮水平、蛋白尿、涎腺炎、肾脏病变和肾免疫复合物沉积。此外,如与野生型TACI-Fc相比,所测试的TACI-Fc融合物在小鼠中展现显著且持续降低的血清IgM、IgG和IgA抗体滴度。本文的发现证实,这些免疫调节蛋白在体外和体内始终展现强效免疫抑制活性和功效,表现得优于现有的和/或批准的免疫调节剂,如贝利木单抗、阿巴西普、阿塞西普或泰它西普。这样的生物制品因此可以是用于治疗严重自身免疫性和/或炎性疾病(包括B细胞相关疾病,如SLE、舍格伦综合征和其他结缔组织疾病)的有吸引力的开发候选物。

[0106] 此外,本文的观察证明,当施用至小鼠和食蟹猴时,TACI-Fc融合蛋白展现高血清暴露。通过所提供的TACI-Fc融合蛋白实现的有利和更高的血清暴露以及更有效的免疫抑

制活性支持它们以比现有WT TACI-Fc治疗剂更低的临床剂量和/或降低的给药频率(或更长的给药间隔)使用。例如,现有的WT TACI-Fc治疗剂(如泰它西普和阿塞西普)必须每周施用至少一次。降低给药频率可以为治疗的受试者提供更好的症状控制,改善对给药方案的依从性,提高患者生活质量或患者满意度和/或总体上降低接受治疗的成本。此外,减少剂量,甚至以更规律的频率,如每周一次,也可以减轻某些不利影响。

[0107] 本申请中提及的所有出版物(包括专利文献、科学文章和数据库)出于所有目的通过引用以其整体并入,在程度上如同每个单独的出版物通过引用单独并入。如果本文所述的定义与通过引用并入本文的专利、申请、公开申请和其他出版物中阐述的定义相反或在其他方面不一致,则本文所述的定义优先于通过引用并入本文的定义。

[0108] 本文使用的章节标题仅用于组织目的,而不应解释为限制所描述的主题。

I.定义

[0109] 除非另外定义,否则本文使用的所有领域术语、符号和其他技术和科学术语或命名旨在具有与所要求保护的主题所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。在一些情况下,为了清楚和/或为了便于参考而在本文中定义具有通常理解的含义的术语,并且本文中包含的此类定义不应被解释为表示与本领域通常理解的实质性差异。

[0110] 除非上下文另有明确规定,否则如说明书和所附权利要求中所用,单数形式“一个/一种(a)”、“一个/一种(an)”和“所述(the)”包括复数指代物。

[0111] 如本文所用的术语“约”是指本技术领域的技术人员容易知道的相应值的通常误差范围。本文对“约”某一值或参数的提及包括(并描述)针对所述值或参数本身的实施方案。例如,关于“约X”的描述包括“X”的描述。

[0112] 如在蛋白质的结构域的情况下使用的术语“亲和力修饰的”意指如下哺乳动物蛋白,其在细胞外结构域或其特异性结合部分中具有改变的氨基酸序列(相对于相应野生型亲代或未修饰的结构域),使得与亲代野生型或未修饰的(即,非亲和力修饰的结构域)蛋白质相比,其具有增加的或降低的与其结合配偶体(可替代地“反结构”)中的至少一种的结合活性(如结合亲和力)。在一些实施方案中,亲和力修饰的结构域可以含有野生型或未修饰的结构域中的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或更多个氨基酸差异(如氨基酸取代)。结合活性(例如结合亲和力)的增加或降低可以使用熟知的结合测定(包括流式细胞术)来确定。Larsen等人,American Journal of Transplantation,第5卷:443-453(2005)。还参见Linsley等人,Immunity,1:7930801(1994)。蛋白质与其一种或多种结合配偶体的结合活性(例如亲和力)的增加是增加至如下值:比野生型对照大至少10%,并且在一些实施方案中,比野生型对照值大至少20%、30%、40%、50%、100%、200%、300%、500%、1000%、5000%或10000%。蛋白质与其结合配偶体中的至少一种的结合活性(例如亲和力)的降低是降低至如下值:不大于对照的90%但不小于野生型对照值的10%,并且在一些实施方案中,不大于野生型对照值的80%、70%、60%、50%、40%、30%或20%但不小于10%。亲和力修饰的蛋白质在细胞外结构域或其特异性结合部分的一级氨基酸序列中通过氨基酸残基的取代、添加或缺失发生改变。术语“亲和力修饰的”不被视为对借之产生亲和力修饰的蛋白质的任何特定的起始组合物或方法强加任何条件。因此,亲和力修饰的蛋白质不限于随后通过任何特定的亲和力修饰过程转化为亲和力修饰的结构域的野生型蛋白质结构域。亲和力修饰的结构域多肽可以例如

从野生型哺乳动物结构域序列信息开始生成,然后在电脑中针对与其结合配偶体的结合进行建模,最后进行重组或化学合成以产生物质的亲和力修饰的结构域组合物。在仅一个替代性例子中,亲和力修饰的结构域可以通过野生型结构域的定点诱变来产生。因此,亲和力修饰的TD结构域表示产物,并且不一定是通过任何给定方法产生的产物。可采用多种技术,包括重组方法、化学合成或其组合。

[0113] 术语“亲和力修饰的TD结构域”是指肿瘤坏死受体超家族(TNFRSF)蛋白的成员或其TNF配体的亲和力修饰的结构域,其分别在其中具有TNFR结构域或TNF结构域的改变的氨基酸序列。例如,TNFRSF蛋白的亲和力修饰的TD结构域具有TNFR结构域的改变的氨基酸序列,所述改变的氨基酸序列由TNFRSF蛋白的细胞外结构域或其特异性结合部分内的至少一个富半胱氨酸结构域(CRD)构成(相对于相应野生型亲代或未修饰的结构域),使得与含有非亲和力修饰的或未修饰的TD结构域的亲代野生型或未修饰的蛋白质相比,其具有增加的或降低的与其结合配偶体(可替代地“反结构”)中的至少一种的结合活性(如结合亲和力)。

[0114] “亲和力修饰的TACI”(也称为变体TACI)是指拮抗或阻断B细胞刺激性受体的活性的TACI蛋白分子。例如,TACI与APRIL和/或BAFF(其为B细胞刺激性受体的配体)结合,所述B细胞刺激性受体即B细胞成熟抗原(BCMA)、B细胞激活因子受体(BAFF-R)以及跨膜激活物和钙调节物和亲环蛋白配体相互作用物(TACI)。在特定实施方案中,BIM包括TACI的细胞外结构域,或者TACI的细胞外结构域的与同源配体APRIL和/或BAFF以及APRIL和BAFF的异三聚体结合的含有TNF受体家族结构域(例如TD,例如CRD)的部分。TACI的细胞外结构域或其部分的亲和力修饰的变体可以包括TD中的一个或多个氨基酸修饰(例如氨基酸取代),所述氨基酸修饰增加对同源配体(例如APRIL和/或BAFF,以及APRIL和BAFF的异三聚体)的结合亲和力。

[0115] 如本文所用,“B细胞刺激性受体”是指以下中的一种或多种:B细胞成熟抗原(BCMA)、B细胞激活因子受体(BAFF-R),以及跨膜激活物和钙调节物和亲环蛋白配体相互作用物(TACI),它们是在B细胞上表达的相关的肿瘤坏死因子(TNFR)超家族受体。这些相关受体与其同源配体BAFF和/或APRIL或者APRIL和BAFF的异三聚体的接合或连接调节B细胞稳态,包括B细胞存活、B细胞成熟和分化以及免疫球蛋白类别转换。B细胞刺激性受体通常含有细胞外部分、跨膜结构域和胞质区,其中所述胞质区含有一个或多个TNF受体相关因子(TRAF)结合位点。将各种TRAF分子募集至胞质结构域可以激活各种转录因子,如NF-κB(例如NF-κB1或NF-κB2),介导调节B细胞稳态的B细胞信号传导途径。

[0116] 如本文所用,“结合(bind)”、“结合(bound)”或其语法变型是指分子参与和另一种分子的任何有吸引力的相互作用,导致稳定缔合,其中这两种分子彼此非常靠近。结合包括但不限于非共价键、共价键(如可逆和不可逆共价键),并且包括分子之间的相互作用,所述分子如但不限于蛋白质、核酸、碳水化合物、脂质和小分子,如包括药物在内的化学化合物。

[0117] 如本文所用,结合活性是指分子(例如多肽)的与其是否以及如何结合一种或多种结合配偶体相关的特征。结合活性可以包括一种分子对结合配偶体的结合的任何量度。结合活性包括结合一种或多种结合配偶体的能力、其与结合配偶体结合的亲和力(例如高亲和力)、其与结合配偶体结合的亲合力、与结合配偶体的键合的强度和/或与结合配偶体结合的特异性或选择性。

[0118] 如本文所用术语“结合亲和力”意指在特异性结合条件下蛋白质对其结合配偶体

(即,其反结构)的特异性结合亲和力。结合亲和力是指两种或更多种分子(如结合配偶体)之间的相互作用的强度,通常为两种结合配偶体之间的非共价相互作用的强度。亲和力修饰的结构域或含有亲和力修饰的结构域的免疫调节蛋白与结合配偶体的结合亲和力的增加或减弱是相对于未修饰的结构域(例如,天然或野生型TD结构域)的结合亲和力确定的。用于确定结合亲和力或相对结合亲和力的方法是本领域中已知的,固相ELISA免疫测定、ForteBio Octet、Biacore测量或流式细胞术。参见例如,Larsen等人,American Journal of Transplantation,第5卷:443-453(2005);Linsley等人,Immunity,第1卷(9):793-801(1994)。在一些实施方案中,结合亲和力可以通过流式细胞术来测量,如在流动结合测定中基于平均荧光强度(MFI)来测量。

[0119] 如本文所用术语“结合亲合力”意指在特异性结合条件下蛋白质对其结合配偶体(即,其反结构)的特异性结合亲合力。在生化动力学中,亲合力是指单独非共价结合相互作用(如在蛋白质与其结合配偶体(即,其反结构)之间)的多重亲和力的累积强度。因此,亲合力与描述单一相互作用的强度的亲和力不同。

[0120] 术语“生物半衰期”是指物质(如免疫调节蛋白)丧失其药理学或生理学活性或浓度的一半所花费的时间长度。生物半衰期可能受以下影响:物质的消除、排泄、降解(例如,酶促降解/消化),或者在身体某些器官或组织中的吸收和浓缩。在一些实施方案中,生物半衰期可以通过确定物质的血浆浓度达到其稳态水平的一半所花费的时间(“血浆半衰期”)来评估。可以用于衍生并增加蛋白质的生物半衰期的缀合物是本领域中已知的,并且包括但不限于多聚化结构域(例如Fc免疫球蛋白结构域)、聚乙二醇(PEG)、羟乙基淀粉(HES)、XTEN(延长的重组肽;参见WO 2013130683)、人血清白蛋白(HSA)、牛血清白蛋白(BSA)、脂质(酰化),以及聚-Pro-Ala-Ser(PAS)、聚谷氨酸(谷氨酰化)。

[0121] 如本文所用术语“细胞表面反结构”(可替代地“细胞表面结合配偶体”)是在哺乳动物细胞上表达的反结构(可替代地是结合配偶体)。通常,所述细胞表面结合配偶体是跨膜蛋白。在一些实施方案中,所述细胞表面结合配偶体是受体。

[0122] 关于蛋白质(如受体、可溶性配体)或关于其细胞外结构域或部分或其亲和力修饰的变体的术语“结合配偶体”或“反结构”是指参考蛋白质在特异性结合条件下特异性结合的至少一种分子(通常为天然哺乳动物蛋白)。在一些方面,亲和力修饰的结构域或含有亲和力修饰的结构域的免疫调节蛋白与天然或野生型蛋白质的相应结构域的结合配偶体特异性结合,但是亲和力有所增加或减弱。“细胞表面结合配偶体”是在哺乳动物细胞上表达的结合配偶体。通常,所述细胞表面结合配偶体是跨膜蛋白。在一些实施方案中,所述细胞表面结合配偶体是在形成免疫突触的细胞(如哺乳动物细胞,例如免疫细胞)上表达或由所述细胞表达的受体或受体的配体。

[0123] 关于与细胞表面分子结合的术语“顺式”是指与两种或更多种不同的细胞表面分子结合,其中每种存在于相同细胞的表面上。在一些实施方案中,顺式意指,所述两种或更多种细胞表面分子仅存在于形成IS的两种哺乳动物细胞中的一种上或者仅存在于另一种(但并非两种)上。

[0124] 如本文所用的术语“保守氨基酸取代”意指如下氨基酸取代,其中氨基酸残基被另一氨基酸残基取代,所述另一氨基酸残基具有化学特性(例如,电荷或疏水性)相似的侧链R基。具有化学性质相似的侧链的氨基酸基团的例子包括1)脂肪族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬

氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;2)脂肪族-羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;3)含酰胺的侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;4)芳香族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;5)碱性侧链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;6)酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸;以及7)含硫侧链:半胱氨酸和甲硫氨酸。保守氨基酸取代基团为:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸盐-天冬氨酸盐和天冬酰胺-谷氨酰胺。

[0125] 关于蛋白质位置的术语“对应于”,如核苷酸或氨基酸位置“对应于”所公开序列中的核苷酸或氨基酸位置的叙述,如序列表中所述,是指在基于结构序列比对或使用标准比对算法(如GAP算法)与所公开序列比对后鉴定的核苷酸或氨基酸位置。通过比对序列,本领域技术人员可例如使用保守和相同的氨基酸残基作为指导来鉴定相应残基。图9例示通过比对两个序列来鉴定对应残基。

[0126] 如本文所用,“结构域”(通常是三个或更多个,一般5或7个或更多氨基酸,例如10至200个氨基酸残基)是指分子(例如蛋白质或编码核酸)的一部分,其在结构上和/或功能上与所述分子的其他部分不同,并且是可鉴定的。例如,结构域包括多肽链的那些部分,所述部分可在由一个或多个结构基序构成的蛋白质内形成独立折叠的结构和/或借助功能活性(例如结合活性)而被识别。蛋白质可以具有一个或多于一个独特结构域。例如,结构域可依据一级序列或结构与相关家族成员的同源性(例如与基序的同源性)来鉴别、定义或区分。在另一个例子中,结构域可以通过其功能来区分,例如与生物分子(例如同源结合配偶体)相互作用的能力。结构域可独立地展现生物学功能或活性,使得结构域可独立地或与另一份子融合后发挥活性,例如结合。结构域可以是线性氨基酸序列或非线性氨基酸序列。多种多肽含有多个结构域。这样的结构域是已知的,并且可由本领域技术人员来鉴定。对于本文中的示例,提供定义,但应理解,通过名称识别特定结构域在本领域技术范围内。如果需要,可采用适当软件来鉴别结构域。应理解,提及氨基酸,包括提及用于描述结构域组织(例如TD结构域的结构域组织)的示为SEQ ID NO的具体序列,是出于说明性目的,并不欲限制所提供的实施方案的范围。应理解,多肽和对其结构域的描述在理论上是基于与相似分子的同源性分析和比对而导出的。同样,在一些情形中,给定结构域(例如TD)的相邻N和/或C末端氨基酸也可以包括在序列中,例如以确保所述结构域在表达时的适当折叠。因此,确切基因座可变,并且对于每种蛋白质不一定相同。例如,特定TD结构域(如特定CRD结构域)可能长或短几个氨基酸(1-10,如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸)。

[0127] 在本文中可互换使用的术语“胞外域”、“细胞外结构域”或“ECD”是指在从细胞表达全长形式的膜蛋白(如跨膜蛋白)时,所述膜蛋白的位于液泡膜外部(例如,细胞外部的空间)的区域。出于本文的目的,应理解,提及ECD时是指构成该区域的序列和结构域,且不要求含有ECD的蛋白质是膜蛋白或所述结构域存在于细胞外部。例如,可溶性免疫调节蛋白可以含有与另一部分(如多聚化结构域,例如Fc区)融合的膜蛋白的ECD序列。胞外域通常与特异性配体或特异性细胞表面受体相互作用,例如通过特异性地结合至配体或细胞表面受体的结合结构域来相互作用。结合结构域的例子包括富半胱氨酸结构域(CRD)。TNFR超家族成员的胞外域含有TD结构域(例如CRD结构域)。因此,本文中提及ECD时包括膜蛋白的ECD的全长序列,以及其与配体或同源结合配偶体结合的含有CRD的特异性结合片段。

[0128] 术语“有效量”或“治疗有效量”是指治疗组合物(如含有免疫调节蛋白或Fc融合蛋白)在单独地(即,作为单一疗法)或与另外的治疗剂组合地离体(通过与来自患者的细胞接

触)或体内(通过施用至患者体内)施用时,对疾病进展产生统计学显著的抑制(如例如通过改善或消除疾病的症状和/或病因)的量和/或浓度。用于治疗疾病、病症或障碍(如免疫系统疾病、病症或障碍)的有效量可以是减轻、减少或缓解与所述疾病、病症或障碍相关的至少一种症状或生物反应或效应、预防所述疾病、病症或障碍的进展或者改进患者的身体机能的量。在细胞疗法的情形中,有效量是施用至患者的细胞的有效剂量或数量。在一些实施方案中,患者是人患者。

[0129] 如本文所用,融合蛋白是指由含有两种或更多种蛋白质(在一些情形中,2、3、4、5或更多种蛋白质)的编码序列的核酸序列编码的多肽,其中所述编码序列位于同一阅读框中,使得当在宿主细胞中转录并翻译融合构建体时,产生含有所述两种或更多种蛋白质的蛋白质。所述两种或更多种蛋白质中的每一种可以与构建体中的另一种蛋白质相邻,或者被接头多肽隔开,所述接头多肽含有1、2、3或更多个氨基酸,但通常少于20、15、10、9、8、7或6个氨基酸。由融合构建体编码的蛋白质产物被称为融合多肽。根据所提供的实施方案的融合蛋白的例子是Fc融合蛋白,其含有与免疫球蛋白Fc结构域连接的亲和力修饰的结构域(例如TACI细胞外结构域或其含有CRD的部分的变体)。

[0130] 术语“半衰期延长部分”是指多肽融合物或化学缀合物的部分,与未与所述部分如此缀合的蛋白质的半衰期相比,所述部分延长蛋白质在哺乳动物血清中循环的半衰期。在一些实施方案中,半衰期被延长大于或约1.2倍、约1.5倍、约2.0倍、约3.0倍、约4.0倍、约5.0倍或约6.0倍。在一些实施方案中,与没有半衰期延长部分的蛋白质相比,在体内施用后,半衰期被延长超过6小时、超过12小时、超过24小时、超过48小时、超过72小时、超过96小时或超过1周。半衰期是指蛋白质丧失其浓度、量或活性的一半所耗时间长度。半衰期可例如通过使用ELISA测定或活性测定来确定。示例性半衰期延长部分包括Fc结构域、多聚化结构域、聚乙二醇(PEG)、羟乙基淀粉(HES)、XTEN(延伸的重组肽;参见,WO 2013130683)、人血清白蛋白(HSA)、牛血清白蛋白(BSA)、脂质(酰化)、和聚-Pro-Ala-Ser(PAS)以及聚谷氨酸(谷氨酰胺化)。

[0131] 免疫球蛋白分子的Fc(可结晶片段)区或结构域(也称为Fc多肽)主要对应于免疫球蛋白重链的恒定区,并且其在一些情形中负责多种功能,包括抗体的一种或多种效应子功能。Fc结构域含有免疫球蛋白分子的部分或全部铰链结构域加上CH2和CH3结构域。在用于包括在所提供的融合蛋白中的一些情形中,Fc铰链序列的全部或一部分可能缺失。Fc结构域可以形成通过一个或多个二硫键接合的两条多肽链的二聚体。在一些实施方案中,Fc是变体Fc,其展现降低(例如降低大于约30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多)的活性以促进效应子功能。在一些实施方案中,除非参考特定的SEQ ID NO进行描述,否则提及Fc区域中的氨基酸取代是通过EU编号系统。EU编号是已知的,并且按照最新更新的IMGT Scientific Chart(IMGT®,国际ImMunoGeneTics信息系统®,http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html(创建:2001年5月17日,最后更新:2013年1月10日)和如Kabat,E.A.等人Sequences of Proteins of Immunological interest.第5版USDepartment of Health and Human Services,NIH公开号91-3242(1991)中报告的EU索引。

[0132] 免疫球蛋白Fc融合物(“Fc融合物”)(如免疫调节Fc融合蛋白)是包含与免疫球蛋白的Fc区可操作地连接的一种或多种多肽的分子。Fc融合物可以包含例如与TACI细胞外结

构域或其含有CRD的部分(包括其任何所提供的亲和力修饰的变体)可操作地连接的Fc区。免疫球蛋白Fc区可以与一种或多种多肽间接或直接连接。各种接头是本领域已知的,并且可任选地用于将Fc与融合配偶体连接以产生Fc融合物。相同种类的Fc融合物可以二聚化以形成Fc融合物同二聚体。不同种类的Fc融合物(例如杵臼结构工程化)可以用于形成Fc融合物异二聚体。在一些实施方案中,Fc是哺乳动物Fc,如鼠或人Fc。

[0133] 术语“宿主细胞”是指可用于表达由重组表达载体编码的蛋白质的任何细胞。宿主细胞可以是原核生物,例如大肠杆菌(E.coli),或其可以是真核生物,例如,单细胞真核生物(例如,酵母或其他真菌)、植物细胞(例如,烟草或番茄植物细胞)、动物细胞(例如,人细胞、猴细胞、仓鼠细胞、大鼠细胞、小鼠细胞或昆虫细胞)或杂交瘤。宿主细胞的例子包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或其衍生物,例如在无血清培养基中生长的Veggie CHO和相关细胞系,或缺乏DHFR的CHO株系DX-B11。

[0134] 如本文所用术语“免疫突触(immunological synapse)”或“免疫突触(immune synapse)”(缩写为“IS”)意指表达MHC I(主要组织相容性复合物)或MHC II的哺乳动物细胞(例如抗原呈递细胞或肿瘤细胞)与哺乳动物淋巴细胞(例如效应T细胞或天然杀伤(NK)细胞之间的界面。

[0135] 如本文所用术语“免疫球蛋白”(缩写为“Ig”)与术语“抗体”(缩写为“Ab”)同义,并且是指哺乳动物免疫球蛋白,包括五个人类类别中的任一类别:IgA(其包括子类IgA1和IgA2)、IgD、IgE、IgG(其包括子类IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)和IgM。所述术语还包括小于全长的免疫球蛋白,不论是完全或部分合成的(例如,重组或化学合成)还是自然产生的,包括其含有所述免疫球蛋白分子的可变重(VH)链和/或可变轻(VL)链区的至少一部分的任何片段,所述片段足以形成抗原结合位点并且在组装时足以特异性结合抗原。抗体还可以包括恒定区的全部或一部分。这样的片段包括抗原结合片段(Fab)、含有VH和VL的可变片段(Fv)、含有连接在一条链中的VH和VL的单链可变片段(scFv)以及其他抗体V区片段,如Fab’、F(ab)2、F(ab’)2、dsFv双抗体、Fc和Fd多肽片段。因此,应理解,本文中提及抗体时包括全长抗体和抗原结合片段。术语抗体还包括具有多表位特异性的抗体组合物、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、双抗体和单链分子。同双特异性和异双特异性的双特异性抗体包括在所述术语的含义内。抗体包括多克隆抗体或单克隆抗体。抗体还包括合成抗体或重组产生的抗体。对于不同抗体类别的结构和特性,参见例如,Basic and Clinical Immunology,第8版,Daniel P.Sties,Abba I.Terr和Tristram G.Parsolw(编辑),Appleton&Lange,Norwalk,CT,1994,第71页和第6章。

[0136] 术语“全长抗体”、“完整抗体”或“全抗体”可互换使用,指代呈其基本上完整形式的抗体,与抗体片段相反。全长抗体是典型地具有两个全长重链(例如,VH-CH1-CH2-CH3或VH-CH1-CH2-CH3-CH4)和两个全长轻链(VL-CL)以及铰链区的抗体,如通过分泌B细胞的抗体从哺乳动物物种(例如人、小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物等)产生的抗体和合成产生的具有相同结构域的抗体。具体地,全抗体包括具有重链和轻链(包括Fc区的)的那些。恒定结构域可以是天然序列恒定结构域(例如,人天然序列恒定结构域)或其氨基酸序列变体。在一些情况下,完整抗体可具有一种或多种效应子功能。

[0137] “抗体片段”包含完整抗体的一部分、所述完整抗体的抗原结合区和/或可变区。抗体片段包括但不限于Fab片段、Fab’片段、$F(ab')_2$片段、Fv片段、二硫键连接的Fv(dsFv)、Fd

片段、Fd'片段;双抗体;线性抗体(参见美国专利号5,641,870,实施例2;Zapata等人,Protein Eng.8(10):1057-1062[1995]);单链抗体分子,包括单链Fv(scFv)或单链Fab(scFab);任何上述项的抗原结合片段和来自抗体片段的多特异性抗体。

[0138] "Fv"由通过非共价缔合连接的一个重链可变区结构域和一个轻链可变区结构域构成。从这两个结构域的折叠发散出六个互补决定区(CDR)(重链和轻链各有3个),它们贡献用于抗原结合的氨基酸残基并赋予抗体抗原结合特异性。然而,即使单一可变结构域(或仅包含三个对抗原具有特异性的CDR的Fv的一半)具有识别并结合抗原的能力,但是在一些情形中,其亲和力低于整个结合位点。

[0139] "dsFv"是指具有稳定V_H-V_L对的工程化的分子间二硫键的Fv。

[0140] "Fd片段"是含有抗体重链的可变结构域(V_H)和一个恒定区结构域(C_H1)的抗体片段。

[0141] "Fab片段"是通过用木瓜蛋白酶消化全长免疫球蛋白得到的抗体片段,或者具有合成(例如,通过重组方法)产生的相同结构的片段。Fab片段含有轻链(含有V_L和C_L)以及含有重链可变结构域(V_H)和重链的一个恒定区结构域(C_H1)的另一条链。

[0142] "F(ab')$_2$片段"是通过在pH 4.0-4.5下用胃蛋白酶消化免疫球蛋白得到的抗体片段,或者具有合成(例如,通过重组方法)产生的相同结构的片段。F(ab')$_2$片段基本上含有两个Fab片段,其中每个重链部分含有另外几个氨基酸,包括形成接合两个片段的二硫键的半胱氨酸残基。

[0143] "Fab'片段"是含有F(ab')$_2$片段的一半(一条重链和一条轻链)的片段。

[0144] "Fd'片段"是含有F(ab')$_2$片段的一个重链部分的抗体片段。

[0145] "Fv'片段"是仅含抗体分子的V_H和V_L结构域的片段。

[0146] "scFv片段"是指含有通过多肽接头以任何顺序共价连接的可变轻链(V_L)和可变重链(V_H)的抗体片段。所述接头的长度使得两个可变结构域在不被严重干扰的情况下桥接。示例性接头是(Gly-Ser)$_n$残基,其中一些Glu或Lys残基遍布各处以增加溶解性。

[0147] "双抗体"是二聚scFv;双抗体通常具有短于scFv的肽接头,并且优先发生二聚化。

[0148] 如本文所用术语"免疫活性"是指免疫细胞(如T细胞或B细胞)的一种或多种活性,包括例如激活、细胞存活、细胞增殖、细胞因子产生(例如干扰素-γ)、细胞毒性活性或者激活NF-κB途径或导致激活免疫细胞中的转录因子的其他信号传导级联的能力。可以将用于评估免疫调节蛋白的免疫活性的测定与具有抑制活性的对照蛋白相比较。

[0149] "免疫调节蛋白"或"免疫调节多肽"是调节免疫活性的蛋白质。"调节(modulation)"或"调节(modulating)"免疫反应意指被增强或抑制的免疫活性。这样的调节包括对免疫细胞(如B细胞或T细胞)的免疫活性的任何诱导、或者程度或范围的改变、或者抑制。例如,本文中的可溶性Fc融合蛋白可以抑制B细胞的免疫活性。免疫调节蛋白可以是单一多肽链或通过例如链间二硫键相互共价键结的至少两条多肽链的多聚体(二聚体或更高级多聚体)。因此,单体、二聚和更高级多聚蛋白在所定义术语的范围内。多聚蛋白可以是同多聚(具有相同多肽链)或异多聚(具有不同多肽链)。

[0150] 如本文所用,修饰是关于对多肽的氨基酸序列或核酸分子中的核苷酸序列的修饰,并且分别包括序列的氨基酸或核苷酸的变化。氨基酸修饰或变化可以分别是氨基酸或核苷酸缺失、插入或替代(取代)。修饰多肽的方法对于本领域技术人员是常规的,如通过使

用重组DNA方法。

[0151] 术语“多聚化结构域”是指促进两种或更多种多肽的多聚体形成的氨基酸序列。多聚化结构域包括促进多肽分子与一种或多种另外的多肽分子的稳定相互作用的序列,每种另外的多肽分子含有互补多聚化结构域(例如第一多聚化结构域和第二多聚化结构域),所述互补多聚化结构域可以是相同或不同的多聚化结构域。互补多聚化结构域之间的相互作用(例如,第一多聚化结构域与第二多聚化结构域之间的相互作用)形成稳定的蛋白质-蛋白质相互作用,以产生多肽分子与另外的多肽分子的多聚体。在一些情况下,多聚化结构域是相同的并且与自身相互作用,以在两条多肽链之间形成稳定的蛋白质-蛋白质相互作用。通常,多肽直接或间接地与多聚化结构域接合。示例性的多聚化结构域包括免疫球蛋白序列或其部分、亮氨酸拉链、疏水区、亲水区和相容的蛋白质间相互作用结构域。例如,多聚化结构域可以是免疫球蛋白恒定区或结构域,如例如来自IgG(包括IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型)、IgA、IgE、IgD和IgM及其修饰形式的Fc结构域或其部分。

[0152] 术语“核酸”与“多核苷酸”可互换使用,是指呈单链或双链形式的核酸残基(例如,脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸)的聚合物。除非明确限制,否则所述术语涵盖含有天然核苷酸的已知类似物的核酸,并且所述类似物具有与天然核苷酸类似的结合特性,并且以与天然存在的核苷酸类似的方式代谢。除非另有指示,否则特定核酸序列还暗示涵盖其保守修饰的变体(例如,简并密码子取代)和互补核苷酸序列以及明确指示的序列。具体地,简并密码子取代可通过生成其中一个或多个所选(或所有)密码子的第三位置经混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来实现。术语核酸或多核苷酸涵盖基因编码的cDNA或mRNA。

[0153] 如本文所用术语“呈可操作的组合”、“按可操作的顺序”和“可操作地连接的”是指核酸序列的连接方式或定向使得区段的排列使它们协同作用于其既定目的。在一些实施方案中,所述术语是指核酸连接以产生能够引导给定基因的转录的核酸分子,和/或产生具有功能性的所需蛋白质分子。例如,DNA序列的区段(例如编码序列和一个或多个调节序列)以这样的方式连接以允许在适当分子(例如转录激活蛋白)与调节序列结合时进行基因表达。

[0154] 术语“药物组合物”是指适合于哺乳动物受试者(通常是人)的医药用途的组合物。药物组合物通常包含有效量的活性剂(例如,免疫调节蛋白)以及载体、赋形剂或稀释剂。载体、赋形剂或稀释剂通常分别是药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。

[0155] 术语“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用并且是指通过肽键连接的两个或更多个氨基酸的分子链。所述术语并非是指特定长度的产物。因此,“肽”和“寡肽”包括于多肽的定义内。该术语包括多肽的翻译后修饰,例如糖基化、乙酰化、磷酸化等。所述术语还包括其中包括一个或多个氨基酸类似物或非经典或非天然氨基酸的分子,如可合成或使用已知的蛋白质工程化技术重组表达的。另外,蛋白质可通过熟知的有机化学技术如本文所述来衍生。

[0156] 如应用于核酸(如编码免疫调节蛋白或蛋白质(例如免疫调节蛋白)的核酸)的术语“纯化的”通常表示如通过本领域熟知的分析技术所确定基本上不含其他组分的核酸或多肽(例如,纯化的多肽或多核苷酸在电泳凝胶、色谱洗脱液和/或经历密度梯度离心的介质中形成离散谱带)。例如,在电泳凝胶中产生基本上一个谱带的核酸或多肽是“纯化的”。经纯化核酸或蛋白质是至少约50%纯的,通常至少约75%、80%、85%、90%、95%、96%、99%或更高纯度(例如,重量百分比或基于摩尔的百分比)。

[0157] 术语“重组”表明,材料(例如,核酸或多肽)已通过人为干预发生人工(即非天然)改变。可以对在其自然环境或状态内的材料进行改变或从其自然环境或状态取出的材料进行改变。例如,“重组核酸”通过例如在克隆、亲和力修饰、DNA改组或其他公知的分子生物学过程中重组核酸来制备。“重组DNA分子”是由借助此类分子生物学技术接合在一起的DNA区段构成。如本文所用术语“重组蛋白”或“重组多肽”是指使用重组DNA分子表达的蛋白质分子(例如,免疫调节蛋白)。“重组宿主细胞”是含有和/或表达重组核酸或以其他方式通过遗传工程化改变的细胞,例如通过向细胞中引入编码重组蛋白(例如本文所提供的免疫调节蛋白)的核酸分子来改变。真核生物中的转录控制信号包括“启动子”和“增强子”元件。启动子和增强子由DNA序列的短阵列组成,所述序列与参与转录的细胞蛋白特异性相互作用。已经从多种真核来源分离出启动子和增强子元件,所述来源包括酵母、昆虫和哺乳动物细胞以及病毒中的基因(在原核生物中也发现了类似的控制元件,即启动子)。特定启动子和增强子的选择取决于用于表达所关注蛋白质的细胞类型。

[0158] 如本文所用术语“重组表达载体”是指含有所需编码序列(例如,编码免疫调节蛋白)和在特定细胞中表达可操作连接的编码序列所需的适当核酸序列的DNA分子。在原核生物中表达所需的核酸序列包括启动子、任选地操纵子序列、核糖体结合位点和可能的其他序列。已知真核细胞利用启动子、增强子以及终止和多腺苷酸化信号。分泌信号肽序列还可以任选地由重组表达载体编码,所述重组表达载体与编码序列可操作地连接使得所表达的蛋白质可以由重组宿主细胞分泌,如用于其作为可分泌蛋白质的表达或者用于更容易地从细胞分离或纯化免疫调节蛋白(如果需要的话)。所述术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及掺入已引入其的宿主细胞基因组中的载体。在该载体中有病毒载体,如慢病毒载体。

[0159] 如本文所用术语“序列同一性”是指基因或蛋白质之间分别在核苷酸或氨基酸水平上的序列同一性。“序列同一性”是在氨基酸水平上的蛋白质之间的同一性的量度和在核苷酸水平上的核酸之间的同一性的量度。蛋白质序列同一性可通过比较在比对序列时每个序列中给定位置的氨基酸序列来确定。类似地,核酸序列同一性可通过比较在比对序列时每个序列中给定位置的核苷酸序列来确定。用于比对序列以供比较的方法是本领域中熟知的,这样的方法包括GAP、BESTFIT、BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件、FASTA和TFASTA。BLAST算法计算序列同一性百分比并对两个序列之间的相似性进行统计学分析。用于进行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)网站公开获得。在一些情形中,可以将序列同一性百分比确定为在比对序列并引入空位(如果需要)以实现最大序列同一性百分比之后,候选序列中与参考序列中的氨基酸残基(或核苷酸残基)相同的氨基酸残基(或核苷酸残基)的百分比。提及序列同一性时包括横跨所比较的每个序列的全长的序列同一性。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适当参数,包括在所比较序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0160] 如本文关于蛋白质使用的术语“可溶性的”意指,所述蛋白质并非膜蛋白或者未锚定于细胞膜中。可以通过仅包括细胞外结构域或其部分且不具有跨膜结构域将蛋白质构建为可溶性蛋白质。在一些情形中,可以通过直接或经由接头间接连接或附接至Fc结构域或其他半衰期延长分子来改进蛋白质的溶解性,所述Fc结构域或其他半衰期延长分子在一些情形中也可以改进所述蛋白质的稳定性和/或半衰期。在一些方面,可溶性蛋白质是Fc融合

蛋白。

[0161] 如本文所用的术语“特异性结合”意指蛋白质在特异性结合条件下与靶蛋白结合，使得其亲和力或亲合力是相同蛋白质与足够统计量的随机肽或多肽集合的平均亲和力或亲合力的至少10倍，但是任选地50、100、250或500倍，或甚至至少1000倍的能力。特异性结合蛋白无需仅与单一靶标分子结合，而是可以与超过一种靶标分子特异性结合。在一些情形中，特异性结合蛋白可以与结构构象与靶蛋白类似的蛋白质(例如，旁系同源物或直系同源物)结合。技术人员将认识到，特异性结合至在不同物种的动物中具有相同功能的分子(即，直系同源物)或与靶分子具有基本上类似的表位的分子(例如，旁系同源物)是可能的，并且不会减弱相对于独特非靶标(例如，随机多肽)的统计学上有效的集合来确定的结合特异性。因此，本发明的免疫调节蛋白可以由于交叉反应性而与超过一个不同种类的靶分子特异性结合。固相ELISA免疫测定、ForteBio Octet或Biacore测量可以用于确定两种蛋白质之间的特异性结合。通常，两种结合蛋白之间的相互作用的解离常数(Kd)小于约$1x10^{-5}$M，并且通常低至约$1x10^{-12}$M。在本公开文本的某些方面，两种结合蛋白之间的相互作用的解离常数小于约$1x10^{-6}$M、$1x10^{-7}$M、$1x10^{-8}$M、$1x10^{-9}$M、$1x10^{-10}$M或$1x10^{-11}$M或更小。

[0162] 如本文关于蛋白质使用的术语“特异性结合片段”或“片段”意指如下多肽，其短于全长蛋白或其特定结构域或区域，并且在体外和/或体内与所述全长蛋白或特定结构域或区域的结合配偶体特异性结合。特异性结合片段是关于多肽或多肽的结合结构域的全长细胞外结构域的片段，但是仍与所述结合结构域的结合配偶体结合。例如，特异性结合片段是关于全长TNFR家族成员或其全长TNFR结构域(TD)(例如CRD)的细胞外结构域的片段，但是仍与所述TNFR家族成员或TNFR家族成员的CRD的结合配偶体结合。在一些实施方案中，所述特异性结合片段具有细胞外结构域或者细胞外结构域的结构域或区域的全长序列的至少约20％、30％、40％、50％、60％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％序列长度。在一些实施方案中，特异性结合片段可具有至少50个氨基酸，例如至少60、70、80、90、100或110个氨基酸的氨基酸长度。在一些实施方案中，特异性结合片段包括CRD1和/或CRD2结构域。在一些实施方案中，特异性结合片段包括CRD2结构域。

[0163] 如本文所用，“受试者”是哺乳动物，如人或其他动物，并且通常是人。受试者可以是雄性或雌性，并且可以是任何合适的年龄，包括婴儿、幼年、青少年、成年和老年受试者。

[0164] 如本文所用，关于例如合成核酸分子或合成基因或合成肽的“合成的”是指通过重组方法和/或通过化学合成方法产生的核酸分子或多肽分子。

[0165] 如本文所用术语“TNF受体超家族”或“TNFRSF”意指细胞表面细胞因子受体的组，所述细胞因子受体都是I型(N末端细胞外)跨膜糖蛋白，在其细胞外结构域中含有一至六个富半胱氨酸结构域(CRD)。基于共有的结构特征将分子分类为该超家族的成员，所述结构特征包括存在于其N末端细胞外区域中的一个或多个富半胱氨酸结构域(CRD)，所述富半胱氨酸结构域通常在蛋白质与其同源结合配偶体或配体的结合中发挥作用。TNFRSF蛋白可以仅具有一个或几个CRD(例如CRD1、CRD2等)。通常，TNFRSF成员的ECD或胞外域含有1与6个之间的CRD假重复序列。例如，BAFF受体和BCMA各自含有一个CRD，而TACI含有两个CRD(CRD1和CRD2)。TNFRSF成员通常为三聚或多聚复合物，它们通过其半胱氨酸内二硫键来稳定。TNFRSF蛋白与其配体的结合促进细胞中的多种生物活性，如凋亡性细胞死亡或细胞存活和增殖的诱导。

[0166] 术语“TD”是指TNFRSF蛋白或TNF家族配体的一个或多个结构性结构域。例如，TNFRSF蛋白的TD是约40个氨基酸的富半胱氨酸结构域(CRD)模块，其含有六(6)个保守半胱氨酸。因此，提及CRD时也可以与关于TNFRSF蛋白的TD的术语TD互换使用。所述六个半胱氨酸参与链内二硫键的形成。TNFRSF成员的细胞外结构域(ECD)含有一个或多个CRD结构域；因此，术语TD也关于这样的蛋白质分子的ECD来使用。提及变体TD(vTD)时是指TD的变体或修饰的序列。

[0167] 关于与细胞表面分子的结合的术语“反式”是指与两种不同的细胞表面分子结合，其中每种存在于不同细胞的表面上。在一些实施方案中，反式意指，关于两种不同的细胞表面分子，第一种仅存在于形成IS的两种哺乳动物细胞中的一种上，并且第二种仅存在于形成IS的两种哺乳动物细胞中的另一种上。

[0168] 如本文所用的术语“跨膜蛋白”意指基本上或完全跨越脂质双层的膜蛋白，所述脂质双层如在生物膜(如哺乳动物细胞)中或在人工构建体(如脂质体)中发现的那些脂质双层。跨膜蛋白包含跨膜结构域(“跨膜结构域”)，所述跨膜蛋白通过所述跨膜结构域整合至脂质双层中，并且所述整合通过所述跨膜结构域在生理条件下是热力学稳定的。跨膜结构域通常可通过任何数目的市售生物信息学软件应用，基于其相对于与水性环境(例如胞质溶胶、细胞外液)相互作用的蛋白质区域提高的疏水性，从其氨基酸序列来预测。跨膜结构域通常为跨越膜的疏水性α螺旋。跨膜蛋白可一次或多次穿过脂质双层的两个层。

[0169] 如本文所用的术语疾病或障碍的“治疗(treating)”、“治疗(treatment)”或“疗法”意指减慢、停止或逆转疾病、病症或障碍的进展，如通过临床或诊断症状的减少、停止或消除所证实的，通过施用单独的或与如本文所述的另一种化合物组合的本发明的免疫调节蛋白或工程化细胞来实现。“治疗(treating)”、“治疗(treatment)”或“疗法”还意指急性或慢性疾病、病症或障碍的症状严重程度的降低，或如例如在复发型或缓解型自身免疫性疾病病程或炎性病症的情形中复发率的降低，或在自身免疫性疾病或炎性病症的炎症方面的情形中炎症的减少。如在本发明的情况下使用的对疾病、病症或障碍的“预防(preventing)”、“预防(prophylaxis)”或“预防(prevention)”是指施用单独的或与另一种化合物组合的本发明的免疫调节蛋白，以预防疾病、病症或障碍或者疾病、病症或障碍的一些或所有症状的发生或发作，或者减小疾病、病症或障碍发作的可能性。

[0170] 如关于变体蛋白或多肽使用的术语“变体”(也称为“修饰的”或“突变体”，它们可以互换使用)意指通过人为干预产生的蛋白质，如哺乳动物(例如，人或鼠)蛋白质。变体是相对于未修饰的或野生型蛋白质或者相对于其结构域，具有改变的或修饰的氨基酸序列的多肽，如通过一个或多个氨基酸取代、缺失、添加或其组合来改变或修饰。变体多肽可以含有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或更多个氨基酸差异(如氨基酸取代)。变体多肽通常展现与相应形式的野生型或未修饰的蛋白质(如其成熟序列(缺少信号序列)或其含有细胞外结构域或其结合结构域的部分)的至少约50％、60％、70％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更高序列同一性。非天然存在的氨基酸以及天然存在的氨基酸包括在可允许的取代或添加的范围内。变体蛋白不限于任何特定的制备方法，并且包括例如化学合成、重组DNA技术或其组合。本发明的变体蛋白与至少一种或多种结合配偶体特异性结合。在一些实施方案中，改变的氨基酸序列导致改变的(即，增加的或降低的)

与一种或多种结合配偶体的结合活性,如结合亲和力或亲合力。变体蛋白因此可以是如本文所述的“亲和力修饰的”蛋白质。

[0171] 如本文所用的可互换使用的术语“野生型”或“天然的(natural)”或“天然的(native)”是结合在自然界中发现且未通过人为干预修饰的生物材料(如核酸分子、蛋白质、宿主细胞等)来使用。

II.TACI免疫调节蛋白和变体TACI多肽

[0172] 本文提供TACI免疫调节蛋白,其含有TACI受体的细胞外结构域(ECD)或其变体的与至少一种TACI同源结合配偶体结合的部分。本文还提供变体TACI多肽,其展现改变的(例如增加的)对一种或多种TACI同源结合配偶体的结合活性或亲和力。在一些实施方案中,所述TACI同源结合配偶体是BAFF或APRIL中的一种或多种或者是BAFF/APRIL异三聚体。所提供的TACI免疫调节蛋白和多肽包括其可溶性融合蛋白,其中细胞外结构域或其部分的TACI部分与另一部分(如免疫球蛋白Fc或其他多聚化结构域或半衰期延长部分)连接。因此,在一些实施方案中,所述免疫调节蛋白是TACI-Fc融合蛋白。在一些实施方案中,提供TACI-Fc融合蛋白,其含有(1)TACI多肽,所述TACI多肽由TACI受体的细胞外结构域或其与至少一种TACI同源结合配偶体结合的部分或其变体TACI多肽构成,以及(2)Fc结构域。所述TACI多肽或变体TACI多肽可以与Fc结构域直接或间接(例如经由肽接头)连接。

[0173] TACI是肿瘤坏死因子受体家族成员,其特征为具有含有富半胱氨酸假重复序列结构域(CRD)的细胞外结构域(ECD)。TACI是膜结合受体,其具有含有两个富半胱氨酸假重复序列(CRD1和CRD2)的细胞外结构域、跨膜结构域和与CAML(钙调节物和亲环蛋白配体)相互作用的胞质结构域,CAML是位于细胞内囊泡处的整合膜蛋白,其在Jurkat细胞中过表达时是NF-AT激活的共诱导物。TACI与B细胞和T细胞的子集相关。TACI受体结合肿瘤坏死因子(TNF)配体家族的两个成员。一种配体命名为BAFF(TNF家族的B细胞激活因子),并且还以不同方式命名为ZTNF4、“中性因子-α(neutrokine-α)”、“BLyS”、“TALL-1”和“THANK”(Yu等人,国际公开号WO98/18921(1998);Moore等人,Science 285:269(1999);Mukhopadhyay等人,J.Biol.Chem.274:15978(1999);Schneider等人,J.Exp.Med.189:1747(1999);Shu等人,J.Leukoc.Biol.65:680(1999))。另一种配体已经被命名为APRIL,并且还以不同方式命名为“ZTNF2”和“TNRF死亡配体-1”(Hahne等人,J.Exp.Med.188:1185(1998);Kelly等人,Cancer Res.60:1021(2000))。两种配体还被B细胞成熟受体(BCMA)结合(Gross等人,Nature 404:995(2000))。TACI受体与其配体BAFF或APRIL的结合刺激B细胞应答,包括非T细胞依赖性B细胞抗体应答、同种型转换和B细胞稳态。

[0174] 全长TACI的氨基酸序列示于SEQ ID NO:88中。所述蛋白质是III型膜蛋白并且缺少信号肽;在真核细胞中表达后,N末端甲硫氨酸被去除。在一些实施方案中,成熟TACI蛋白不含如SEQ ID NO:88中所示的N末端甲硫氨酸。TACI的细胞外结构域(SEQ ID NO:88的氨基酸残基1-166;SEQ ID NO:122中所示的ECD)含有两个富半胱氨酸结构域(CRD,下文也称为肿瘤坏死家族受体结构域或TD),它们各自展现与BAFF和APRIL结合的亲和力。第一富半胱氨酸结构域(CRD1)含有SEQ ID NO:122中所示的序列的氨基酸残基34-66。第二富半胱氨酸结构域(CRD2)对应于SEQ ID NO:122中所示的序列的氨基酸71-104。TACI还在细胞外结构域含有在第二半胱氨酸重复序列后的约60个氨基酸的茎区,对应于SEQ ID NO:122中所示的序列的氨基酸残基105-165。

[0175] 在一些实施方案中,本文提供的变体TACI多肽含有参考TACI多肽(如含有CRD(下文也称为TD)的野生型或未修饰的TACI多肽)的细胞外结构域中的一个或多个氨基酸修饰,如一个或多个取代(可替代地“突变”或“替代”)、缺失或添加。因此,所提供的变体TACI多肽是或包含变体TD(“vTD”),其中所述一个或多个氨基酸修饰(例如取代)位于CRD中。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸修饰(如一个或多个取代(可替代地“突变”或“替代”)、缺失或添加)位于CRD1区中。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸修饰(如一个或多个取代(可替代地“突变”或“替代”)、缺失或添加)位于CRD2区中。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸修饰(如一个或多个取代(可替代地“突变”或“替代”)、缺失或添加)位于CRD1区和CRD2区二者内的氨基酸中。

[0176] 在一些实施方案中,参考(例如未修饰的)TACI序列是野生型TACI序列或者是其含有一个或两个CRD的部分。在一些实施方案中,参考(例如,未修饰的)TACI是或包含TACI的细胞外结构域(ECD)或其含有一个或两个CRD结构域的部分。在一些实施方案中,参考(例如,未修饰的)TACI多肽的细胞外结构域包含CRD1和CRD2。然而,变体TACI多肽无需包含CRD1和CRD2二者。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含CRD1或其特异性结合片段或基本上由其组成。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含CRD2或其特异性结合片段或基本上由其组成。在一些实施方案中,变体TACI是可溶性多肽并且缺少跨膜结构域。在一些实施方案中,变体TACI多肽还包含跨膜结构域,并且在一些情形中也包含胞质结构域。

[0177] 在一些实施方案中,参考(例如,未修饰的)TACI序列是哺乳动物TACI序列。在一些实施方案中,参考(例如,未修饰的)TACI序列可以是哺乳动物TACI,其包括但不限于人、小鼠、食蟹猴或大鼠TACI。在一些实施方案中,参考(例如,未修饰的)TACI序列是人的。示例性人TACI序列的细胞外结构域示于SEQ ID NO: 122中。

[0178] 在一些实施方案中,参考(例如,未修饰的)TACI序列具有 (i) SEQ ID NO: 122中所示的氨基酸序列或其缺少N末端甲硫氨酸的序列,(ii) 展现与SEQ ID NO: 122的至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性并且与APRIL、BAFF或APRIL/BAFF异三聚体结合的氨基酸序列,或者(iii)是(i)或(ii)的含有CRD1和/或CRD2的片段或部分,其中所述部分与APRIL、BAFF或APRIL/BAFF异三聚体结合。在一些实施方案中,参考(例如,未修饰的)TACI序列缺少如SEQ ID NO: 122中所示的N末端甲硫氨酸。

TACI细胞外结构域(ECD):SEQ ID NO: 122

MSGLGRSRRGGRSRVDQEERFPQGLWTGVAMRSCPEEQYWDPLLGTCMSCKTICNHQSQRTCAAFCRSLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPVNLPPELRRQRSGEVENNSDNSGRYQGLEHRGSEASPALPGLKLSADQVALVYST

[0179] 在一些实施方案中,参考(例如未修饰的)TACI序列是TACI的细胞外结构域序列,其为ECD的相对于SEQ ID NO: 122中所示的氨基酸序列含有N末端缺失的部分。在一些实施方案中,所述N末端缺失是N末端氨基酸残基1-28的缺失,所述残基对应于SEQ ID NO:122中所示的残基。在一些实施方案中,所述N末端缺失是N末端氨基酸残基1-29的缺失,所述残基对应于SEQ ID NO: 122中所示的残基。在一些实施方案中,所述N末端缺失是N末端氨基酸残基1-30的缺失,所述残基对应于SEQ ID NO: 122中所示的残基。在一些实施方案中,所述N末端缺失是N末端氨基酸残基1-31的缺失,所述残基对应于SEQ ID NO: 122中所示的残

基。在一些实施方案中,所述N末端缺失是N末端氨基酸残基1-32的缺失,所述残基对应于SEQ ID NO: 122中所示的残基。在一些实施方案中,所述N末端缺失是N末端氨基酸残基1-33的缺失,所述残基对应于SEQ ID NO: 122中所示的残基。

[0180] 在任何所提供的实施方案的实施方案中,参考(例如未修饰的)TACI序列是含有TACI细胞外结构域的茎部分的一个或多个残基的缺失的ECD部分。在一些实施方案中,参考(例如未修饰的)TACI序列是缺少一个或多个连续C末端氨基酸残基的ECD部分,所述连续C末端氨基酸残基在残基105处开始并且直至或包括氨基酸残基166,所述残基对应于SEQ ID NO: 122中所示的ECD序列的残基。在一些实施方案中,ECD序列中的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61或62缺失。

[0181] 在一些实施方案中,参考(例如未修饰的)TACI序列含有具有连续氨基酸序列的ECD部分,所述连续氨基酸序列包括CRD1和/或CRD2(例如CRD1和CRD2或仅CRD2)以及茎序列的仅区段或部分。合适的茎区段包括SEQ ID NO: 122的氨基酸残基105至154的一个或多个氨基酸。例如,茎区段可以关于SEQ ID NO: 122由以下组成:氨基酸残基105、氨基酸残基105至106、氨基酸残基105至107、氨基酸残基105至108、氨基酸残基105至109、氨基酸残基105至110、氨基酸残基105至111、氨基酸残基105至112、氨基酸残基105至113、氨基酸残基105至114、氨基酸残基105至115、氨基酸残基105至116、氨基酸残基105至117、氨基酸残基105至118、氨基酸残基105至119、氨基酸残基105至120、氨基酸残基105至121、氨基酸残基105至122、氨基酸残基105至123、氨基酸残基105至124、氨基酸残基105至125、氨基酸残基105至126、氨基酸残基105至127、氨基酸残基105至128、氨基酸残基105至129、氨基酸残基105至130、氨基酸残基105至131、氨基酸残基105至132、氨基酸残基105至133、氨基酸残基105至134、氨基酸残基105至135、氨基酸残基105至136、氨基酸残基105至137、氨基酸残基105至138、氨基酸残基105至139、氨基酸残基105至140、氨基酸残基105至141、氨基酸残基105至142、氨基酸残基105至143、氨基酸残基105至144、氨基酸残基105至145、氨基酸残基105至146、氨基酸残基105至147、氨基酸残基105至148、氨基酸残基105至149、氨基酸残基105至150、氨基酸残基105至151、氨基酸残基105至152、氨基酸残基105至153以及氨基酸残基105至154。

[0182] 在一些实施方案中,参考(例如未修饰的)TACI序列缺少一个或多个潜在弗林蛋白酶切割位点或在其中发生突变。在一些情形中,参考(例如未修饰的)TACI序列是ECD或部分,其中在位置119处的精氨酸残基发生突变,例如R119G。在一些情形中,参考(例如未修饰的)TACI序列是ECD或部分,其中在位置121处的谷氨酰胺残基发生突变,例如Q121P。在一些情形中,参考(例如未修饰的)TACI序列是ECD或部分,其中在位置122处的精氨酸残基发生突变,例如R122Q。

[0183] 在一些实施方案中,参考TACI序列是如国际PCT公开号WO 2000/067034、WO 2002/094852或WO 2008/154814中所示的TACI ECD序列。

[0184] 在一些实施方案中,参考TACI序列是TACI ECD序列,其具有SEQ ID NO:131中所示的序列或由其组成。

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

SRVDQEER FPQGLWTGVA MRSCPEEQYW DPLLGTCMSCKTICNHQSQRTCAAFCRSLS CRKEQGKFYD HLLRDCISCA SICGQHPKQCAYFCENKLRSPVNLPPEL

[0185] 在一些实施方案中,参考TACI序列是TACI ECD序列,其具有SEQ ID NO:130中所示的序列或由其组成。

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

AMRSCPEEQYWDPLLGTCMSCKTICNHQSQRTCAAFCRSLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPK QCAYFCENKLRS

[0186] 在一些实施方案中,参考TACI序列是TACI ECD序列,其具有SEQ ID NO:1中所示的序列(由SEQ ID NO:36中所示的核苷酸序列编码)或由其组成。

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

[0187] 在一些实施方案中,参考TACI序列是TACI的细胞外结构域区域,其基本上由仅CRD2序列组成并且缺失或缺少整个CRD1序列以及基本上全部茎区。尽管先前研究已经显示,茎区中的残基可能含有蛋白水解酶切割位点,但是据信TACI的足够的表达和/或对其同源配体的结合活性需要至少CRD1和CRD2。例如,国际PCT公开号WO 2002/094852证实,含有CRD1和CRD2,但是其中整个氨基末端区域和部分茎区序列缺失的TACI分子在表达时展现降低的蛋白质降解。其他研究显示,在CRD1之前的N末端区域的至少一部分是TACI对其同源配体的足够结合活性所需的,参见例如国际公开号WO 2008/154814,其中确定TACI细胞外区域的残基13-118或13-108是生物活性所需的同时将TACI在表达期间的降解降至最低。令人惊讶地,本文(例如实施例3)中发现,与含有CRD1和CRD2二者的更长的TACI分子相比,基本上仅由具有小部分茎区的CRD2组成的TACI细胞外区域展现显著改进的同源结合活性。

[0188] 本文提供一种免疫调节蛋白(例如TACI-Fc融合蛋白),所述免疫调节蛋白含有TACI多肽,所述TACI多肽是TACI细胞外结构域(ECD)区域的含有CRD2的部分,且缺失N末端区域和CRD1并且确实TACI细胞外结构域的茎部分的一个或多个残基,例如相对于SEQ ID NO:122中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,TACI细胞外结构域的含有CRD2的部分包括氨基酸残基71-104,所述残基对应于SEQ ID NO:122中所示的残基。在所提供的实施方案中,免疫调节蛋白的TACI多肽含有对应于SEQ ID NO:122中所示的残基的N末端氨基酸残基1-66的缺失。在所提供的实施方案中,免疫调节蛋白的TACI多肽含有对应于SEQ ID NO:122中所示的残基的N末端氨基酸残基1-67的缺失。在所提供的实施方案中,免疫调节蛋白的TACI多肽含有对应于SEQ ID NO:122中所示的残基的N末端氨基酸残基1-68的缺失。在所提供的实施方案中,免疫调节蛋白的TACI多肽含有对应于SEQ ID NO:122中所示的残基的N末端氨基酸残基1-69的缺失。在所提供的实施方案中,免疫调节蛋白的TACI多肽含有对应于SEQ ID NO:122中所示的残基的N末端氨基酸残基1-70的缺失。在任何这样的实施方案的实施方案中,免疫调节蛋白的TACI多肽缺少一个或多个连续C末端氨基酸残基,所述连续C末端氨基酸残基在残基105处开始并且直至或包括氨基酸残基166,所述残基对应于SEQ ID NO:122中所示的ECD序列的残基。在一些实施方案中,ECD序列中的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61或62缺失。

[0189] 在一些实施方案中,本文提供的免疫调节蛋白(例如TACI-Fc融合蛋白)具有TACI多肽,所述TACI多肽具有含有ECD部分的序列,所述ECD部分具有TACI ECD的包括CRD2的连续氨基酸序列(例如关于SEQ ID NO:122的残基71-104),但是缺失N末端区域和CRD1并且确实TACI细胞外结构域的茎部分的一个或多个残基,例如相对于SEQ ID NO:122中所示的氨基酸序列。例如,TACI ECD部分可以关于SEQ ID NO:122中所示的氨基酸残基由以下组成:氨基酸残基67至118、氨基酸残基67至117、氨基酸残基67至116、氨基酸残基67至115、氨基酸残基67至114、氨基酸残基67至113、氨基酸残基67至112、氨基酸残基67至111、氨基酸残基67至110、氨基酸残基67至109、氨基酸残基67至108、氨基酸残基67至107、氨基酸残基67至106、氨基酸残基67至105或者氨基酸残基67至104。在一些例子中,TACI ECD部分可以关于SEQ ID NO:122中所示的残基由以下组成:氨基酸残基68至118、氨基酸残基68至117、氨基酸残基68至116、氨基酸残基68至115、氨基酸残基68至114、氨基酸残基68至113、氨基酸残基68至112、氨基酸残基68至111、氨基酸残基68至110、氨基酸残基68至109、氨基酸残基68至108、氨基酸残基68至107、氨基酸残基68至106、氨基酸残基68至105或者氨基酸残基68至104。在一些例子中,TACI ECD部分可以关于SEQ ID NO:122中所示的残基由以下组成:氨基酸残基69至118、氨基酸残基69至117、氨基酸残基69至116、氨基酸残基69至115、氨基酸残基69至114、氨基酸残基69至113、氨基酸残基69至112、氨基酸残基69至111、氨基酸残基69至110、氨基酸残基69至109、氨基酸残基69至108、氨基酸残基69至107、氨基酸残基69至106、氨基酸残基69至105或者氨基酸残基69至104。在一些例子中,TACI ECD部分可以关于SEQ ID NO:122中所示的残基由以下组成:氨基酸残基70至118、氨基酸残基70至117、氨基酸残基70至116、氨基酸残基70至115、氨基酸残基70至114、氨基酸残基70至113、氨基酸残基70至112、氨基酸残基70至111、氨基酸残基70至110、氨基酸残基70至109、氨基酸残基70至108、氨基酸残基70至107、氨基酸残基70至106、氨基酸残基70至105或者氨基酸残基70至104。在一些例子中,TACI ECD部分可以关于SEQ ID NO:122中所示的残基由以下组成:氨基酸残基71至118、氨基酸残基71至117、氨基酸残基71至116、氨基酸残基71至115、氨基酸残基71至114、氨基酸残基71至113、氨基酸残基71至112、氨基酸残基71至111、氨基酸残基71至110、氨基酸残基71至109、氨基酸残基71至108、氨基酸残基71至107、氨基酸残基71至106、氨基酸残基71至105或者氨基酸残基71至104。任何上文TACI ECD序列还可以是根据本文提供的免疫调节蛋白的TACI参考序列,其中这样的免疫调节蛋白含有与这样的TACI参考序列相比,通过如本文所述的一个或多个氨基酸修饰(例如取代)来修饰的变体TACI多肽。

[0190] 特定地,本文提供的TACI多肽包括TACI ECD序列,所述TACI ECD序列具有SEQ ID NO:13中所示的序列(由SEQ ID NO:48中所示的核苷酸序列编码)或由其组成。在一些实施方案中,参考TACI序列具有SEQ ID NO:13中所示的序列或由其组成,其中与这样的参考TACI序列相比,所提供的变体TACI多肽通过如本文所述的一个或多个氨基酸修饰(例如取代)来修饰。

TACI ECD序列(CRD2):SEQ ID NO:13

SLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRS

[0191] 所提供的TACI多肽包括变体TACI多肽。还提供免疫调节蛋白,如TACI-Fc融合蛋白,其含有所提供的变体TACI多肽。在任何所提供的实施方案的实施方案中,变体TACI序列具有参考(例如未修饰的)TACI序列(如上文所述的任一种)的序列,但是另外含有一个或多

个氨基酸修饰,如一个或多个氨基酸取代。特定地,本文提供变体TACI多肽,其含有至少一个亲和力修饰的TD结构域(例如,CRD1和/或CRD2)或其特异性结合片段,所述结构域或其特异性结合片段含有参考(例如,未修饰的或野生型)TACI多肽的TD结构域中的一个或多个氨基酸取代,使得与参考(例如,未修饰的或野生型)TACI多肽相比,所述变体TACI多肽展现改变的(例如增加的)对APRIL或BAFF中的一种或两种的结合活性或亲和力。在一些实施方案中,变体TACI多肽对APRIL和/或BAFF的结合亲和力与参考(例如,未修饰的或野生型)TACI多肽对照序列不同,如通过例如固相ELISA免疫测定、流式细胞术或Biacore测定所确定。对每种同源结合配偶体的结合亲和力是独立的;也就是说,在一些实施方案中,相对于参考(例如,未修饰的或野生型)TACI多肽,变体TACI多肽具有增加的对APRIL和BAFF中的一种或两种的结合亲和力,以及降低的或不变的对APRIL或BAFF中另一种的结合亲和力。

[0192] 在一些实施方案中,相对于参考(未修饰的或野生型)TACI多肽,变体TACI多肽具有增加的对BAFF的结合亲和力。在一些实施方案中,相对于参考(未修饰的或野生型)TACI多肽,变体TACI多肽具有增加的对APRIL的结合亲和力。在一些实施方案中,相对于参考(未修饰的或野生型)TACI多肽,变体TACI多肽具有增加的对APRIL和BAFF的结合亲和力。同源配体BAFF和/或APRIL可以是哺乳动物蛋白,如人蛋白或鼠蛋白。在特定实施方案中,同源配体BAFF和/或APRIL是人的。在一些实施方案中,相对于参考(例如,未修饰的或野生型)TACI多肽对照,具有增加的或更大的对APRIL和/或BAFF的结合亲和力的变体TACI多肽将具有至少约5%(如至少约10%、15%、20%、25%、35%或50%)的结合亲和力的增加。在一些实施方案中,相对于参考(例如,未修饰的野生型)TACI多肽,结合亲和力的增加超过约1.2倍、约1.5倍、约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约6倍、约7倍、约8倍、约9倍、约10倍、约20倍、约30倍、约40倍或约50倍。在任何例子中,参考(例如,未修饰的或野生型)TACI多肽具有与变体TACI多肽相同的序列,但是它不含一个或多个氨基酸修饰(例如,取代)。

[0193] 在一些实施方案中,前述实施方案中任一项与BAFF的平衡解离常数(K_d)可以是小于$1x10^{-5}$M、$1x10^{-6}$M、$1x10^{-7}$M、$1x10^{-8}$M、$1x10^{-9}$M、$1x10^{-10}$M或$1x10^{-11}$M或$1x10^{-12}$ M。在一些实施方案中,前述实施方案中任一项与BAFF的K_d小于或小于约$1x10^{-9}$M、$1x10^{-10}$M或$1x10^{-11}$M或$1x10^{-12}$M。在一些实施方案中,前述实施方案中任一项与BAFF的K_d在$1x10^{-9}$M与为或约$1x10^{-12}$M之间。在一些实施方案中,前述实施方案中任一项与BAFF的K_d是为或约$1x10^{-9}$M、为或约$2x10^{-9}$M、为或约$4x10^{-9}$M、为或约$6x10^{-9}$M、为或约$8x10^{-9}$M、为或约$1x10^{-10}$M、为或约$2x10^{-10}$M、为或约$4x10^{-10}$M、为或约$6x10^{-10}$M、为或约$8x10^{-10}$M、为或约$1x10^{-11}$M、为或约$2x10^{-11}$M、为或约$4x10^{-11}$M、为或约$6x10^{-11}$M、为或约$8x10^{-11}$M或者为或约$1x10^{-12}$M,或任何前述项之间的任何值。在一些实施方案中,所提供的实施方案包括如上所述的变体TACI多肽,并且与BAFF的K_d减小(更高结合亲和力)大于或大于约1.5倍,如大于或约2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多。

[0194] 在一些实施方案中,前述实施方案中任一项与APRIL的平衡解离常数(K_d)可以是小于$1x10^{-5}$M、$1x10^{-6}$M、$1x10^{-7}$M、$1x10^{-8}$M、$1x10^{-9}$M、$1x10^{-10}$M或$1x10^{-11}$M或$1x10^{-12}$M。在一些实施方案中,前述实施方案中任一项与APRIL的K_d小于或小于约$1x10^{-9}$M、$1x10^{-10}$M或$1x10^{-11}$M或$1x10^{-12}$M。在一些实施方案中,前述实施方案中任一项与APRIL的K_d在$1x10^{-9}$M与为或约$1x10^{-12}$M之间。在一些实施方案中,前述实施方案中任一项与APRIL的K_d是为或约$1x10^{-9}$M、为或约$2x10^{-9}$M、为或约$4x10^{-9}$M、为或约$6x10^{-9}$M、为或约$8x10^{-9}$M、为或约$1x10^{-10}$M、为或约$2x10^{-10}$M、为

或约$4x10^{-10}$M、为或约$6x10^{-10}$M、为或约$8x10^{-10}$M、为或约$1x10^{-11}$M、为或约$2x10^{-11}$M、为或约$4x10^{-11}$M、为或约$6x10^{-11}$M、为或约$8x10^{-11}$M或者为或约$1x10^{-12}$M,或任何前述项之间的任何值。在一些实施方案中,所提供的实施方案包括如上所述的变体TACI多肽,并且与APRIL的K_d减小(更高结合亲和力)大于或大于约1.5倍,如大于或约2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多。

[0195] 参考(例如,未修饰的或野生型)TACI序列不一定必须用作起始组合物以生成本文所述的变体TACI多肽。因此,术语“修饰”(如“取代”)的使用并不意味着本发明实施方案限于制备变体TACI多肽或含有变体TACI多肽的免疫调节蛋白的特定方法。变体TACI多肽可例如通过从头肽合成来制备,因此在改变密码子以编码修饰(例如取代)的意义上,不一定需要修饰,例如“取代”。这个原则也扩展到术语氨基酸残基的“添加”和“缺失”,其同样不暗示特定制备方法。设计或产生变体TACI多肽的方法不限于任何特定方法。在一些实施方案中,然而,参考(例如,未修饰的或野生型)TACI编码核酸是从参考(例如,未修饰的或野生型)TACI遗传物质诱变的,并且针对所需特异性结合亲和力或其他功能活性进行筛选。在一些实施方案中,使用可在任何数量的公共可获得的数据库中获得的蛋白质或核酸序列从头合成变体TACI多肽,然后进行筛选。国家生物技术信息中心提供这种信息,并且其网站可通过互联网公开访问,如前所述的UniProtKB数据库也是如此。

[0196] 除非另外陈述,否则如本公开文本通篇所指示,变体TACI多肽中的一个或多个氨基酸修饰是按照对应于SEQ ID NO:122中所示的参考ECD序列的位置编号的氨基酸位置编号来命名。技术人员可以熟练地鉴定修饰(例如氨基酸取代)在TACI多肽(包括其含有TD(例如CRD1和/或CRD2)的部分)中的相应位置,如通过比对参考序列(例如SEQ ID NO:1或13)与SEQ ID NO:122。鉴定对应残基的比对例示于图9中。在本公开文本通篇的修饰列表中,氨基酸位置在中间指示,相应的参考(例如未修饰的野生型)的氨基酸列示于编号之前,并且所鉴定的变体氨基酸取代列示于编号之后。如果修饰是位置的缺失,那么指示“del”,并且如果修饰是位置的插入,那么指示“ins”。在一些情况下,插入与在中间指示的氨基酸位置一起列示,且相应的参考氨基酸列示于编号之前和之后,并且所鉴定的变体氨基酸插入列示于未修饰的(例如,野生型)氨基酸之后。

[0197] 在一些实施方案中,变体TACI多肽具有参考(例如,未修饰的或野生型)TACI序列中的一个或多个氨基酸修饰(例如取代),例如如所述的任一个。一个或多个氨基酸修饰(例如取代)可以位于参考(例如,未修饰的或野生型)TACI序列的胞外域(细胞外结构域)中。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸修饰(例如取代)位于CRD1结构域或其特异性结合片段中。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸修饰(例如取代)位于CRD2结构域或其特异性结合片段中。在变体TACI多肽的一些实施方案中,一个或多个氨基酸修饰(例如取代)中的一些位于CRD1结构域或其特异性结合片段中,并且一个或多个氨基酸修饰(例如取代)中的一些位于CRD2结构域或其特异性结合片段中。

[0198] 在一些实施方案中,变体TACI多肽具有参考TACI序列中的多达1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸修饰(例如取代)。所述修饰(例如取代)可以位于CRD1结构域或CRD2结构域中。在一些实施方案中,变体TACI多肽具有参考TACI序列的CRD1结构域或其特异性结合片段中的多达1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸取代。在一些实施方案中,变体TACI多肽具有参考TACI序列的

CRD2结构域或其特异性结合片段中的多达1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸取代。

[0199] 在一些实施方案中,如所述的一个或多个氨基酸修饰(例如氨基酸取代)的变体TACI多肽具有与SEQ ID NO:122中所示的参考(例如,未修饰的或野生型)TACI多肽或其含有CRD1和/或CRD2结构域的特异性结合片段的至少约85%、86%、86%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。在一些实施方案中,所述特异性结合片段含有CRD1结构域,例如所述特异性结合片段含有示为SEQ ID NO:122的氨基酸34-66的序列。在一些情形中,CRD1结构域是所述特异性结合片段中的唯一完整CRD结构域。在一些实施方案中,所述特异性结合片段是或含有CRD2结构域,例如所述特异性结合片段含有示为SEQ ID NO:122的氨基酸71-104的序列。在一些情形中,CRD2结构域是所述特异性结合片段中的唯一完整CRD结构域。在一些实施方案中,所述特异性结合片段是或含有CRD1结构域和CRD2结构域,例如所述特异性结合片段含有SEQ ID NO:122的氨基酸34-104。在一些实施方案中,所述特异性结合片段含有茎结构域的连续部分,例如所述特异性结合片段含有SEQ ID NO:122的氨基酸105-165的连续部分。在任何实施方案的实施方案中,SEQ ID NO:122的特异性结合片段小于SEQ ID NO:122中所示的全长ECD。在一些实施方案中,所述特异性结合片段示于SEQ ID NO:1中。在一些实施方案中,所述特异性结合片段示于SEQ ID NO:13中。在一些实施方案中,所述特异性结合片段示于SEQ ID NO:130中。在一些实施方案中,所述特异性结合片段示于SEQ ID NO:131中。

[0200] 在一些实施方案中,含有如所述的一个或多个氨基酸修饰(例如氨基酸取代)的变体TACI多肽具有与参考(例如,未修饰的或野生型)TACI多肽或其特异性结合片段(如与SEQ ID NO:1、13或122的氨基酸序列)的至少约85%、86%、86%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。

[0201] 在一些实施方案中,含有如所述的一个或多个氨基酸修饰(例如氨基酸取代)的变体TACI多肽具有与SEQ ID NO:122的氨基酸序列的至少约85%、86%、86%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。

[0202] 在一些实施方案中,含有如所述的一个或多个氨基酸修饰(例如氨基酸取代)的变体TACI多肽具有与SEQ ID NO:1的氨基酸序列的至少约85%、86%、86%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。

[0203] 在一些实施方案中,含有如所述的一个或多个氨基酸修饰(例如氨基酸取代)的变体TACI多肽具有与SEQ ID NO:13的氨基酸序列的至少约85%、86%、86%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。

[0204] 在一些实施方案中,含有如所述的一个或多个氨基酸修饰(例如氨基酸取代)的变体TACI多肽具有与SEQ ID NO:130的氨基酸序列的至少约85%、86%、86%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。

[0205] 在一些实施方案中,含有如所述的一个或多个氨基酸修饰(例如氨基酸取代)的变体TACI多肽具有与SEQ ID NO:131的氨基酸序列的至少约85%、86%、86%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。

[0206] 在一些实施方案中,变体TACI多肽具有参考TACI多肽或其特异性结合片段中的一个或多个氨基酸修饰(例如取代),所述氨基酸修饰关于SEQ ID NO:122的编号对应于一个

或多个位置40、59、60、61、74、75、76、77、78、79、82、83、84、85、86、87、88、92、95、97、98、99、101、102和103。在一些实施方案中,变体TACI多肽具有选自以下的一个或多个氨基酸修饰(例如取代):W40R、Q59R、R60G、T61P、E74V、Q75E、Q75R、G76S、K77E、F78Y、Y79F、L82H、L82P、L83S、R84G、R84L、R84Q、D85E、D85V、C86Y、I87L、I87M、S88N、I92V、Q95R、P97S、K98T、Q99E、A101D、Y102D、F103S、F103V、F103Y或其保守氨基酸取代。在一些实施方案中,参考TACI多肽包含CRD1结构域或CRD2结构域,例如参考TACI多肽示于SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:122中。

[0207] 在一些实施方案中,氨基酸取代仅位于CRD2结构域中。在一些实施方案中,变体TACI多肽具有参考TACI多肽或其特异性结合片段中的一个或多个氨基酸修饰(例如取代),所述氨基酸修饰关于SEQ ID NO:122的编号对应于一个或多个位置74、75、76、77、78、79、82、83、84、85、86、87、88、92、95、97、98、99、101、102和103。在一些实施方案中,变体TACI多肽具有选自以下的一个或多个氨基酸修饰(例如取代):E74V、Q75E、Q75R、G76S、K77E、F78Y、Y79F、L82H、L82P、L83S、R84G、R84L、R84Q、D85E、D85V、C86Y、I87L、I87M、S88N、I92V、Q95R、P97S、K98T、Q99E、A101D、Y102D、F103S、F103V、F103Y或其保守氨基酸取代。在一些实施方案中,在CRD结构域中,参考TACI多肽仅包括CRD2结构域但缺少CRD1结构域,例如参考TACI多肽示于SEQ ID NO:13中。因此,在一些实施方案中,变体TACI多肽包含TACI多肽的ECD序列的含有CRD2结构域但缺少CRD1结构域的部分。

[0208] 保守氨基酸修饰(例如取代)是落入与取代的氨基酸具有相同的氨基酸类别中的除参考(例如,未修饰的)或野生型氨基酸之外的任何氨基酸。氨基酸的类别是脂肪族(甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸)、羟基或含硫(丝氨酸、半胱氨酸、苏氨酸和蛋氨酸)、环状(脯氨酸)、芳香族(苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸)、碱性(组氨酸、赖氨酸和精氨酸)和酸性/酰胺(天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺)。

[0209] 在一些实施方案中,变体TACI多肽包含关于SEQ ID NO:122的编号在位置75处的至少一个氨基酸取代。在一些实施方案中,与不含所述氨基酸取代的参考(例如野生型或未修饰的)TACI多肽相比,在位置75处的氨基酸取代赋予增加的与BAFF或APRIL的结合。在一些实施方案中,与参考(例如野生型或未修饰的)TACI多肽相比,取代的氨基酸是酸性氨基酸或酰胺,如取代为不同的酸性氨基酸或酰胺。在一些实施方案中,在位置75处的取代的氨基酸是谷氨酸(Glu,E)。在一些实施方案中,在位置75处的取代的氨基酸是天冬氨酸(Asp,D)。在一些实施方案中,在位置75处的取代的氨基酸是天冬酰胺(Asn,N)。在一些实施方案中,在位置75处的取代的氨基酸是谷氨酰胺(Gln,Q)。

[0210] 在一些实施方案中,变体TACI多肽包含关于SEQ ID NO:122的编号在位置77处的至少一个氨基酸取代。在一些实施方案中,与不含所述氨基酸取代的参考(例如野生型或未修饰的)TACI多肽相比,在位置77处的氨基酸取代赋予增加的与BAFF或APRIL的结合。在一些实施方案中,在位置77处的取代的氨基酸是酸性氨基酸或酰胺。在一些实施方案中,在位置77处的取代的氨基酸是谷氨酸(Glu,E)。在一些实施方案中,在位置77处的取代的氨基酸是天冬氨酸(Asp,D)。在一些实施方案中,在位置77处的取代的氨基酸是天冬酰胺(Asn,N)。在一些实施方案中,在位置77处的取代的氨基酸是谷氨酰胺(Gln,Q)。

[0211] 在一些实施方案中,变体TACI多肽包含关于SEQ ID NO:122的编号在位置78处的至少一个氨基酸取代。在一些实施方案中,与不含所述氨基酸取代的参考(例如野生型或未修饰的)TACI多肽相比,在位置78处的氨基酸取代赋予增加的与BAFF或APRIL的结合。在一

些实施方案中,与参考(例如野生型或未修饰的)TACI多肽相比,在位置78处的取代的氨基酸是芳香族氨基酸,如取代为不同的芳香族氨基酸。在一些实施方案中,在位置78处的取代的氨基酸是苯丙氨酸(Phe,F)。在一些实施方案中,在位置78处的取代的氨基酸是酪氨酸(Tyr,Y)。在一些实施方案中,在位置78处的取代的氨基酸是色氨酸(Trp,W)。

[0212] 在一些实施方案中,变体TACI多肽包含关于SEQ ID NO:122的编号在位置84处的至少一个氨基酸取代。在一些实施方案中,与不含所述氨基酸取代的参考(例如野生型或未修饰的)TACI多肽相比,在位置84处的氨基酸取代赋予增加的与BAFF或APRIL的结合。在一些实施方案中,在位置84处的取代的氨基酸是酸性氨基酸或酰胺。在一些实施方案中,在位置84处的取代的氨基酸是谷氨酸(Glu,E)。在一些实施方案中,在位置84处的取代的氨基酸是天冬氨酸(Asp,D)。在一些实施方案中,在位置84处的取代的氨基酸是天冬酰胺(Asn,N)。在一些实施方案中,在位置84处的取代的氨基酸是谷氨酰胺(Gln,Q)。

[0213] 在一些实施方案中,变体TACI多肽包含关于SEQ ID NO:122的编号在位置101处的至少一个氨基酸取代。在一些实施方案中,与不含所述氨基酸取代的参考(例如野生型或未修饰的)TACI多肽相比,在位置101处的氨基酸取代赋予增加的与BAFF或APRIL的结合。在一些实施方案中,在位置101处的取代的氨基酸是酸性氨基酸或酰胺。在一些实施方案中,在位置101处的取代的氨基酸是谷氨酸(Glu,E)。在一些实施方案中,在位置101处的取代的氨基酸是天冬氨酸(Asp,D)。在一些实施方案中,在位置101处的取代的氨基酸是天冬酰胺(Asn,N)。在一些实施方案中,在位置101处的取代的氨基酸是谷氨酰胺(Gln,Q)。

[0214] 在一些实施方案中,变体TACI多肽包含关于SEQ ID NO:122的编号在位置102处的至少一个氨基酸取代。在一些实施方案中,与不含所述氨基酸取代的参考(例如野生型或未修饰的)TACI多肽相比,在位置102处的氨基酸取代赋予增加的与BAFF或APRIL的结合。在一些实施方案中,在位置102处的取代的氨基酸是酸性氨基酸或酰胺。在一些实施方案中,在位置102处的取代的氨基酸是谷氨酸(Glu,E)。在一些实施方案中,在位置102处的取代的氨基酸是天冬氨酸(Asp,D)。在一些实施方案中,在位置102处的取代的氨基酸是天冬酰胺(Asn,N)。在一些实施方案中,在位置102处的取代的氨基酸是谷氨酰胺(Gln,Q)。

[0215] 在一些实施方案中,变体TACI多肽包含至少一个氨基酸取代E74V。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含至少一个氨基酸取代Q75E。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含至少一个氨基酸取代K77E。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含至少一个氨基酸取代F78Y。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含至少一个氨基酸取代Y79F。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含至少一个氨基酸取代L82H。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含至少一个氨基酸取代L82P。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含至少一个氨基酸取代R84G。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含至少一个氨基酸取代R84L。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含至少一个氨基酸取代R84Q。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含至少一个氨基酸取代D85V。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含至少一个氨基酸取代C86Y。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含至少一个氨基酸取代A101D。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含至少一个氨基酸取代Y102D。在一些实施方案中,变体TACI多肽含有前述任两个或更多个中的两个或更多个氨基酸取代。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含一个或多个氨基酸取代,所述氨基酸取代是前述任一个的保守氨基酸取代。在所提供的实施方案中,变体TACI多肽包含如所述的任何参考TACI多肽序列中的至少一个氨基酸取代。在一些实施方

案中,所述至少一个氨基酸取代位于SEQ ID NO:1中所示的参考TACI序列中。在一些实施方案中,所述至少一个氨基酸取代位于SEQ ID NO:13中所示的参考TACI序列中。在一些实施方案中,所述至少一个氨基酸取代位于SEQ ID NO:130中所示的参考TACI序列中。在一些实施方案中,所述至少一个氨基酸取代位于SEQ ID NO:131中所示的参考TACI序列中。

[0216] 在一些实施方案中,变体TACI多肽包含氨基酸取代E74V。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含氨基酸取代Q75E。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含氨基酸取代K77E。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含氨基酸取代F78Y。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含氨基酸取代Y79F。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含氨基酸取代L82H。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含氨基酸取代L82P。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含氨基酸取代R84G。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含氨基酸取代R84L。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含氨基酸取代R84Q。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含氨基酸取代D85V。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含氨基酸取代C86Y。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含氨基酸取代A102D。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含氨基酸取代Y102D。在一些实施方案中,变体TACI多肽含有前述任两个或更多个中的两个或更多个氨基酸取代。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含一个或多个氨基酸取代,所述氨基酸取代是前述任一个的保守氨基酸取代。在所提供的实施方案中,变体TACI多肽包含如所述的任何参考TACI多肽序列中的氨基酸取代。在一些实施方案中,所述氨基酸取代位于SEQ ID NO:1中所示的参考TACI序列中。在一些实施方案中,所述氨基酸取代位于SEQ ID NO:13中所示的参考TACI序列中。在一些实施方案中,所述氨基酸取代位于SEQ ID NO:130中所示的参考TACI序列中。在一些实施方案中,所述氨基酸取代位于SEQ ID NO:131中所示的参考TACI序列中。

[0217] 在一些实施方案中,所述氨基酸取代是D85E/K98T。在一些实施方案中,所述氨基酸取代是I87L/K98T。在一些实施方案中,所述氨基酸取代是R60G/Q75E/L82P。在一些实施方案中,所述氨基酸取代是R60G/C86Y。在一些实施方案中,所述氨基酸取代是W40R/L82P/F103Y。在一些实施方案中,所述氨基酸取代是W40R/Q59R/T61P/K98T。在一些实施方案中,所述氨基酸取代是L82P/I87L。在一些实施方案中,所述氨基酸取代是G76S/P97S。在一些实施方案中,所述氨基酸取代是K77E/R84L/F103Y。在一些实施方案中,所述氨基酸取代是Y79F/Q99E。在一些实施方案中,所述氨基酸取代是L83S/F103S。在一些实施方案中,所述氨基酸取代是K77E/R84Q。在一些实施方案中,所述氨基酸取代是K77E/A101D。在一些实施方案中,所述氨基酸取代是K77E/F78Y/Y102D。在一些实施方案中,所述氨基酸取代是Q75E/R84Q。在一些实施方案中,所述氨基酸取代是Q75R/R84G/I92V。在一些实施方案中,所述氨基酸取代是K77E/A101D/Y102D。在一些实施方案中,所述氨基酸取代是R84Q/S88N/A101D。在一些实施方案中,所述氨基酸取代是R84Q/F103V。在一些实施方案中,所述氨基酸取代是K77E/Q95R/A101D。在一些实施方案中,所述氨基酸取代是I87M/A101D。在所提供的实施方案中,变体TACI多肽包含如所述的任何参考TACI多肽序列中的氨基酸取代。在一些实施方案中,所述氨基酸取代位于SEQ ID NO:1中所示的参考TACI序列中。在一些实施方案中,所述氨基酸取代位于SEQ ID NO:13中所示的参考TACI序列中。在一些实施方案中,所述氨基酸取代位于SEQ ID NO:130中所示的参考TACI序列中。在一些实施方案中,所述氨基酸取代位于SEQ ID NO:131中所示的参考TACI序列中。

[0218] 在任何实施方案的实施方案中,变体TACI多肽包含来自Q75E、K77E、F78Y、R84G、

R84Q、A101D或Y102D或其任何组合的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含上文氨基酸取代中的任何1、2、3、4、5或6个。在一些实施方案中,变体TACI多肽含有上文氨基酸取代中的一个。在一些实施方案中,变体TACI多肽含有上文氨基酸取代中的两个。在一些实施方案中,变体TACI多肽含有上文氨基酸取代中的三个。在一些实施方案中,变体TACI多肽含有上文氨基酸取代中的四个。在一些实施方案中,变体TACI多肽含有上文氨基酸取代中的五个。在一些实施方案中,变体TACI多肽含有上文氨基酸取代中的六个。

[0219] 在任何实施方案的实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代包括Q75E/R84Q。在任何实施方案的实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代包括Q75E/K77E。在任何实施方案的实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代包括Q75E/F78Y。在任何实施方案的实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代包括Q75E/A101D。在任何实施方案的实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代包括Q75E/Y102D。在任何实施方案的实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代包括F77E/F78Y。在任何实施方案的实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代包括K77E/R84Q。在任何实施方案的实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代包括K77E/A101D。在任何实施方案的实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代包括K77E/Y102D。在任何实施方案的实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代包括F78Y/R84Q。在任何实施方案的实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代包括F78Y/A101D。在任何实施方案的实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代包括F78Y/Y102D。在任何实施方案的实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代包括R84Q/A101D。在任何实施方案的实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代包括R84Q/Y102D。在任何实施方案的实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代包括A101D/Y102D。在所提供的实施方案中,变体TACI多肽包含如所述的任何参考TACI多肽序列(如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:130或SEQ ID NO:131中所示的序列)中的氨基酸取代。

[0220] 在一些实施方案中,变体TACI多肽包含一个或多个氨基酸取代R84G、A101D、K77E/R84Q、K77E/A101D、K77E/F78Y、K77E/F78Y/Y102D、Q75E/R84Q、K77E/A101D/Y102D、R84Q、K77E、A101D、Q75E、K77E/F78Y/R84Q、F78Y、F78Y/R84Q、F78Y/A101D、F78Y/Y102D或K77E/Y102D。在所提供的实施方案中,变体TACI多肽包含如所述的任何参考TACI多肽序列(如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:130或SEQ ID NO:131中所示的序列)中的氨基酸取代。

[0221] 在一些实施方案中,变体TACI多肽包含氨基酸取代K77E和F78Y(K77E/F78Y)。在所提供的实施方案中,变体TACI多肽包含如所述的任何参考TACI多肽序列中的氨基酸取代。在一些实施方案中,所述氨基酸取代位于SEQ ID NO:1中所示的参考TACI序列中。在一些实施方案中,所述氨基酸取代位于SEQ ID NO:13中所示的参考TACI序列中。在一些实施方案中,所述氨基酸取代位于SEQ ID NO:130中所示的参考TACI序列中。在一些实施方案中,所述氨基酸取代位于SEQ ID NO:131中所示的参考TACI序列中。

[0222] 在一些实施方案中,变体TACI多肽包含氨基酸取代K77E和Y102D(K77E/Y102D)。在所提供的实施方案中,变体TACI多肽包含如所述的任何参考TACI多肽序列中的氨基酸取代。在一些实施方案中,所述氨基酸取代位于SEQ ID NO:1中所示的参考TACI序列中。在一些实施方案中,所述氨基酸取代位于SEQ ID NO:13中所示的参考TACI序列中。在一些实施方案中,所述氨基酸取代位于SEQ ID NO:130中所示的参考TACI序列中。在一些实施方案中,所述氨基酸取代位于SEQ ID NO:131中所示的参考TACI序列中。

[0223] 在一些实施方案中,变体TACI多肽含有氨基酸取代F78Y和Y102D(F78Y/Y012D)。在

所提供的实施方案中,变体TACI多肽包含如所述的任何参考TACI多肽序列中的氨基酸取代。在一些实施方案中,所述氨基酸取代位于SEQ ID NO:1中所示的参考TACI序列中。在一些实施方案中,所述氨基酸取代位于SEQ ID NO:13中所示的参考TACI序列中。在一些实施方案中,所述氨基酸取代位于SEQ ID NO:130中所示的参考TACI序列中。在一些实施方案中,所述氨基酸取代位于SEQ ID NO:131中所示的参考TACI序列中。

[0224] 在一些实施方案中,变体TACI多肽含有氨基酸取代K77E、F78Y和Y102D(K77E/F78Y/Y102D)。在所提供的实施方案中,变体TACI多肽包含如所述的任何参考TACI多肽序列中的氨基酸取代。在一些实施方案中,所述氨基酸取代位于SEQ ID NO:1中所示的参考TACI序列中。在一些实施方案中,所述氨基酸取代位于SEQ ID NO:13中所示的参考TACI序列中。在一些实施方案中,所述氨基酸取代位于SEQ ID NO:130中所示的参考TACI序列中。在一些实施方案中,所述氨基酸取代位于SEQ ID NO:131中所示的参考TACI序列中。

[0225] 在一些实施方案中,变体TACI多肽含有氨基酸取代Q75E/R84Q。在所提供的实施方案中,变体TACI多肽包含如所述的任何参考TACI多肽序列中的氨基酸取代。在一些实施方案中,所述氨基酸取代位于SEQ ID NO:1中所示的参考TACI序列中。在一些实施方案中,所述氨基酸取代位于SEQ ID NO:13中所示的参考TACI序列中。在一些实施方案中,所述氨基酸取代位于SEQ ID NO:130中所示的参考TACI序列中。在一些实施方案中,所述氨基酸取代位于SEQ ID NO:131中所示的参考TACI序列中。

[0226] 在一些实施方案中,变体TACI多肽包含表1中列出的任何突变。表1还提供参照参考(例如,未修饰的)TACI多肽以及示例性变体TACI多肽的SEQ ID NO的示例性序列。如所指出的,对应于给定结构域的确切基因座或残基可以变化,如根据用于鉴定或分类结构域的方法变化。同样,在一些情形中,给定结构域(例如CRD)的相邻N和/或C末端氨基酸也可以包括于变体TACI多肽的序列中,例如以确保所述结构域在表达时的适当折叠。因此,应理解,表1中的SEQ ID NO的示例不应被视为具有限制性。例如,变体TACI多肽的特定结构域(如ECD结构域或其含有CRD1/CRD2或仅含CRD2的部分)可以比相应SEQ ID NO中所示的氨基酸序列长或短几个氨基酸,如长或短1-10个(例如,1、2、3、4、5、6或7个)氨基酸。

[0227] 在一些实施方案中,变体TACI多肽包含表1中列出的任何突变(氨基酸取代)。在一些例子中,所述突变(氨基酸取代)是在含有SEQ ID NO:122中所示的氨基酸序列的参考TACI中进行。在一些例子中,所述突变(氨基酸取代)是在含有TACI的CRD1和CRD2结构域的参考TACI(例如如SEQ ID NO:1中所示)中进行。在一些例子中,所述突变(氨基酸取代)是在通过缺失N末端和C末端氨基酸残基以保留CRD2来进一步截短的参考TACI(例如如SEQ ID NO:13中所示)中进行。

[0228] 术语“修饰”(如“取代”或“突变”)的使用并不意味着本发明实施方案限于制备免疫调节蛋白的特定方法。变体TACI多肽可以例如通过从头肽合成来制备,并且因此在改变密码子以编码修饰(例如取代)的意义上,不一定需要所述修饰(如“取代”)。这个原则也扩展到术语氨基酸残基的“添加”和“缺失”,其同样不暗示特定制备方法。用以设计或产生vTD的手段并不限于任何特定方法。然而,在一些实施方案中,野生型或未修饰的TD编码核酸是从野生型或未修饰的TD遗传物质诱变的,并且针对所需特异性结合活性(例如结合亲和力)和/或NF-κB调节或其他功能活性的改变进行筛选。在一些实施方案中,vTD是利用可在任何数量的公共可获得的数据库获得的蛋白质或核酸序列从头合成的,然后进行筛选。国家生

物技术信息中心提供此类信息,并且其网站可经由互联网公开访问,UniProtKB数据库也是如此。

[0229] 在一些实施方案中,变体TACI多肽包含含有CRD1和CRD2的细胞外结构域(ECD)序列,如SEQ ID NO:2-12、21、22、101-120中任一项中所示的变体TACI多肽。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含如下多肽序列,其展现与SEQ ID NO:2-12、21、22、101-120中任一项的至少约90%同一性、至少约91%同一性、至少约92%同一性、至少约93%同一性、至少约94%同一性、至少约95%同一性,如至少约96%同一性、97%同一性、98%同一性或99%同一性,并且在其中保留参考(例如,未修饰的或野生型)TACI中不存在的一个或多个氨基酸修饰(例如一个或多个取代)。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含SEQ ID NO:2-12、21、22、101-120中任一项的特异性结合片段,其中所述特异性结合片段结合BAFF、APRIL或BAFF/APRIL异三聚体并且在其中含有如下连续序列,所述连续序列在其中含有参考(例如,未修饰的或野生型)TACI中不存在的一个或多个氨基酸修饰(例如一个或多个取代)。

[0230] 在一些实施方案中,变体TACI多肽由SEQ ID NO:2-12、21、22、101-120中任一项中所示的变体TACI细胞外结构域(ECD)序列组成或基本上由其组成。在一些实施方案中,变体TACI多肽由如下多肽序列组成或基本上由其组成,所述多肽序列展现与SEQ ID NO:2-12、21、22、101-120中任一项的至少约90%同一性、至少约91%同一性、至少约92%同一性、至少约93%同一性、至少约94%同一性、至少约95%同一性,如至少约96%同一性、97%同一性、98%同一性或99%同一性,并且在其中保留参考(例如,未修饰的或野生型)TACI中不存在的一个或多个氨基酸修饰(例如一个或多个取代)。在一些实施方案中,变体TACI多肽由SEQ ID NO:2-12、21、22、101-120中任一项的特异性结合片段组成或基本上由其组成,其中所述特异性结合片段结合BAFF、APRIL或APRIL/BAFF异三聚体并且在其中含有如下连续序列,所述连续序列在其中含有参考(例如,未修饰的或野生型)TACI中不存在的一个或多个氨基酸修饰(例如一个或多个取代)。

[0231] 在一些实施方案中,变体TACI多肽包含参考TACI多肽的含有CRD2但缺少CRD1的细胞外结构域(ECD)序列,如SEQ ID NO:14-20、23-35、92-100、177-192中任一项中所示的变体TACI多肽。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含如下多肽序列,所述多肽序列展现与SEQ ID NO:14-20、23-35、92-100、177-192中任一项的至少约90%同一性、至少约91%同一性、至少约92%同一性、至少约93%同一性、至少约94%同一性、至少约95%同一性,如至少约96%同一性、97%同一性、98%同一性或99%同一性,并且在其中保留参考(例如,未修饰的或野生型)TACI中不存在的一个或多个氨基酸修饰(例如一个或多个取代)。在一些实施方案中,变体TACI多肽包含SEQ ID NO:14-20、23-35、92-100、177-192中任一项的特异性结合片段,其中所述特异性结合片段结合BAFF、APRIL或BAFF/APRIL异三聚体并且在其中含有如下连续序列,所述连续序列在其中含有参考(例如,未修饰的或野生型)TACI中不存在的一个或多个氨基酸修饰(例如一个或多个取代)。

[0232] 在一些实施方案中,变体TACI多肽由SEQ ID NO:14-20、23-35、92-100、177-192中任一项中所示的序列组成或基本上由其组成。在一些实施方案中,变体TACI多肽由如下多肽序列组成或基本上由其组成,所述多肽序列展现与SEQ ID NO:14-20、23-35、92-100、177-192中任一项的至少约90%同一性、至少约91%同一性、至少约92%同一性、至少约93%同一性、至少约94%同一性、至少约95%同一性,如至少约96%同一性、97%同一性、

98％同一性或99％同一性,并且在其中保留参考(例如,未修饰的或野生型)TACI中不存在的一个或多个氨基酸修饰(例如一个或多个取代)。在一些实施方案中,变体TACI多肽由SEQ ID NO:14-20、23-35、92-100、177-192中任一项的特异性结合片段组成或基本上由其组成,其中所述特异性结合片段结合BAFF、APRIL或BAFF/APRIL异三聚体并且在其中含有如下连续序列,所述连续序列在其中含有参考(例如,未修饰的或野生型)TACI中不存在的一个或多个氨基酸修饰(例如一个或多个取代)。

[0233] 在一些实施方案中,变体TACI多肽包含SEQ ID NO:20中所示的序列。在一些实施方案中,变体TACI多肽基本上由SEQ ID NO:20中所示的序列组成。在一些实施方案中,变体TACI多肽由SEQ ID NO:20中所示的序列组成。

[0234] 在一些实施方案中,变体TACI多肽包含SEQ ID NO:26中所示的序列。在一些实施方案中,变体TACI多肽基本上由SEQ ID NO:26中所示的序列组成。在一些实施方案中,变体TACI多肽由SEQ ID NO:26中所示的序列组成。

[0235] 在一些实施方案中,变体TACI多肽包含SEQ ID NO:27中所示的序列。在一些实施方案中,变体TACI多肽基本上由SEQ ID NO:27中所示的序列组成。在一些实施方案中,变体TACI多肽由SEQ ID NO:27中所示的序列组成。

[0236] 在一些实施方案中,变体TACI多肽包含SEQ ID NO:107中所示的序列。在一些实施方案中,变体TACI多肽基本上由SEQ ID NO:107中所示的序列组成。在一些实施方案中,变体TACI多肽由SEQ ID NO:107中所示的序列组成。

[0237] 在一些实施方案中,变体TACI多肽由SEQ ID NO:37-47、56或57中任一项中所示的核苷酸序列编码。在一些实施方案中,变体TACI多肽由如下核苷酸序列编码,所述核苷酸序列展现与SEQ ID NO:37-47、56或57中任一项的至少约90％同一性、至少约91％同一性、至少约92％同一性、至少约93％同一性、至少约94％同一性、至少约95％同一性,如至少约96％同一性、97％同一性、98％同一性或99％同一性,并且在其中保留参考(例如,未修饰的或野生型)TACI中不存在的一个或多个氨基酸修饰(例如一个或多个取代)。本文还提供了一种核酸,所述核酸含有SEQ ID NO:37-47、56或57中任一项中所示的序列或者展现与SEQ ID NO:37-47、56或57中任一项的至少90％同一性、至少91％同一性、至少92％同一性、至少93％同一性、至少94％同一性、至少95％同一性(如至少96％同一性、97％同一性、98％同一性或99％同一性)的序列。

[0238] 在一些实施方案中,变体TACI多肽由SEQ ID NO:49-55或58-70中任一项中所示的核苷酸序列编码。在一些实施方案中,变体TACI多肽由如下核苷酸序列编码,所述核苷酸序列展现与SEQ ID NO:49-55或58-70中任一项的至少约90％同一性、至少约91％同一性、至少约92％同一性、至少约93％同一性、至少约94％同一性、至少约95％同一性,如至少约96％同一性、97％同一性、98％同一性或99％同一性,并且在其中保留参考(例如,未修饰的或野生型)TACI中不存在的一个或多个氨基酸修饰(例如一个或多个取代)。本文还提供了一种核酸,所述核酸含有SEQ ID NO:49-55或58-70中任一项中所示的序列或者展现与SEQ ID NO:49-55或58-70中任一项的至少90％同一性、至少91％同一性、至少92％同一性、至少93％同一性、至少94％同一性、至少95％同一性(如至少96％同一性、97％同一性、98％同一性或99％同一性)的序列。

表1：示例性变体TACI

名称	突变（多个）	ECD（CRD1/CRD2）		ECD（CRD2）	
		AA SEQ ID NO	NT SEQ ID NO	AA SEQ ID NO	NT SEQ ID NO
1 (WT) TACI CRD1/CRD2 13 (WT) TACI CRD2	野生型	1	36	13	48
2 TACI CRD1/CRD2 92 TACI CRD2	L82P	2	37	92	
3 TACI CRD1/CRD2 93 TACI CRD2	D85E、K98T	3	38	93	
4 TACI CRD1/CRD2 94 TACI CRD2	I87L、K98T	4	39	94	
5 TACI CRD1/CRD2	R60G、Q75E、L82P	5	40		
6 TACI CRD1/CRD2	R60G、C86Y	6	41		
7 TACI CRD1/CRD2 95 TACI CRD2	A101D	7	42	95	
8 TACI CRD1/CRD2 96 TACI CRD2	C86Y	8	43	96	
9 TACI CRD1/CRD2	W40R、L82P、F103Y	9	44		
10 TACI CRD1/CRD2	W40R、Q59R、T61P、K98T	10	45		
11 TACI CRD1/CRD2 97 TACI CRD2	L82P、I87L	11	46	97	
12 TACI CRD1/CRD2 98 TACI CRD2	G76S、P97S	12	47	98	
101 TACI CRD1/CRD2 14 TACI CRD2	D85V	101		14	49
102 TACI CRD1/CRD2 15 TACI CRD2	E74V	102		15	50
103 TACI CRD1/CRD2 16 TACI CRD2	R84L	103		16	51
104 TACI CRD1/CRD2 17 TACI CRD2	K77E、R84L、F103Y	104		17	52
105 TACI CRD1/CRD2 18 TACI CRD2	Y79F、Q99E	105		18	53
106 TACI CRD1/CRD2 19TACI CRD2	Y79F	106		19	54
107 TACI CRD1/CRD2 20 TACI CRD2	R84G	107		20	55
21 TACI CRD1/CRD2 99 TACI CRD2	L83S、F103S	21	56	99	
22 TACI CRD1/CRD2 100 TACI CRD2	L82H	22	57	100	
108 TACI CRD1/CRD2 23 TACI CRD2	A101D	108		23	58
109 TACI CRD1/CRD2 24 TACI CRD2	K77E、R84Q	109		24	59

表1：示例性变体TACI					
名称	突变（多个）	ECD（CRD1/CRD2）		ECD（CRD2）	
		AA SEQ ID NO	NT SEQ ID NO	AA SEQ ID NO	NT SEQ ID NO
110 TACI CRD1/CRD2 25 TACI CRD2	K77E、A101D	110		25	60
111 TACI CRD1/CRD2 26 TACI CRD2	K77E、F78Y、Y102D	111		26	61
112 TACI CRD1/CRD2 27 TACI CRD2	Q75E、R84Q	112		27	62
113 TACI CRD1/CRD2 28 TACI CRD2	Q75R、R84G、I92V	113		28	63
114 TACI CRD1/CRD2 29 TACI CRD2	K77E、A101D、Y102D	114		29	64
115 TACI CRD1/CRD2 30 TACI CRD2	R84Q	115		30	65
116 TACI CRD1/CRD2 31 TACI CRD2	R84Q、S88N、A101D	116		31	66
117 TACI CRD1/CRD2 32 TACI CRD2	K77E	117		32	67
118 TACI CRD1/CRD2 33 TACI CRD2	R84Q、F103V	118		33	68
119 TACI CRD1/CRD2 34 TACI CRD2	K77E、Q95R、A101D	119		34	69
120 TACI CRD1/CRD2 35 TACI CRD2	I87M、A101D	120		35	70
177 TACI CRD2	Q75E			177	
178 TACI CRD2	Q75E、K77E			178	
179 TACI CRD2	Q75E、F78Y			179	
180 TACI CRD2	Q75E、A101D			180	
181 TACI CRD2	Q75E、Y102D			181	
182 TACI CRD2	K77E、F78Y、R84Q			182	
183 TACI CRD2	F78Y			183	
184 TACI CRD2	F78Y、R84Q			184	
185 TACI CRD2	F78Y、A101D			185	
186 TACI CRD2	F78Y、Y102D			186	
187 TACI CRD2	R84Q、A101D			187	
188 TACI CRD2	R84Q、Y102D			188	
189 TACI CRD2	A101D、Y102D			189	

表1：示例性变体TACI					
名称	突变（多个）	ECD（CRD1/CRD2）		ECD（CRD2）	
		AA SEQ ID NO	NT SEQ ID NO	AA SEQ ID NO	NT SEQ ID NO
190 TACI CRD2	Y102D			190	
191 TACI CRD2	K77E、F78Y			191	
192 TACI CRD2	K77E、Y102D			192	

[0239] 在一些实施方案中,本文还提供TACI ECD融合序列,其中上文TACI ECD序列中的任一个与多聚化结构域(如本文所述的任一个)连接或融合。

[0240] 免疫调节蛋白的两种或更多种多肽的相互作用可以通过其与任何部分或其他多肽的直接或间接连接来促进,所述部分或其他多肽本身能够相互作用以形成稳定结构。例如,单独编码的多肽链可以通过多聚化来接合,借此通过多聚化结构域介导多肽的多聚化。通常,多聚化结构域提供第一多肽与第二多肽之间的稳定蛋白质间相互作用的形成。

[0241] 在一些实施方案中,免疫调节蛋白的两种或更多种单独多肽可以通过多聚化来接合,如接合为二聚、三聚、四聚或五聚分子。在一些情形中,所述单独多肽是相同的。例如,三聚分子可以从三个拷贝的相同单独多肽形成。在其他例子中,四聚分子是从四个拷贝的相同单独多肽生成。在其他例子中,五聚分子是从五个拷贝的相同单独多肽生成。所述多聚化结构域可以是促进多肽链的二聚化、三聚化、四聚化或五聚化的结构域。

[0242] 在一些实施方案中,免疫调节蛋白形成多聚体,例如,二聚体。在一些实施方案中,二聚体是同二聚体,其中免疫调节蛋白的两个多肽是相同的。在一些实施方案中,二聚体是异二聚体,其中免疫调节蛋白的两个多肽是不同的。

[0243] 在一些实施方案中,多聚化结构域包括能够形成稳定的蛋白质-蛋白质相互作用的任何结构域。多聚化结构域可以通过以下来相互作用:免疫球蛋白序列(例如Fc结构域;参见例如,国际专利公开号WO 93/10151和WO 2005/063816 US;美国公开号2006/0024298;美国专利号5,457,035);亮氨酸拉链(例如,来自核转化蛋白fos和jun,或原癌基因c-myc,或来自一般氮控制(General Control of Nitrogen,GCN4))(参见例如,Busch和Sassone-Corsi(1990)Trends Genetics,6:36-40;Gentz等人,(1989)Science,243:1695-1699);疏水区;亲水区;或者在同多聚体或异多聚体的嵌合分子之间形成分子间二硫键的游离硫醇。此外,多聚化结构域可以包含构成突起的氨基酸序列,所述突起与构成臼的氨基酸序列互补,如例如以下文献中所述:美国专利号5,731,168;国际专利公开号WO 98/50431和WO 2005/063816;Ridgway等人(1996)Protein Engineering,9:617-621。这种多聚化区域可以被工程化使得空间相互作用不仅促进稳定相互作用,而且还促进从嵌合单体的混合物形成异二聚体超过同二聚体。通常,突起是通过用较大侧链(例如,酪氨酸或色氨酸)替代第一多肽的界面中的小氨基酸侧链来构建。任选地通过用较小侧链(例如,丙氨酸或苏氨酸)替代大氨基酸侧链在第二多肽的界面上产生突出部的相同或类似大小的补偿腔。示例性多聚化结构域描述于下文中。

[0244] TACI多肽序列(例如变体TACI多肽序列)可以在任何位置(但通常经由其N末端或C

末端)与多聚化结构域的N末端或C末端接合以形成嵌合多肽。连接可以是直接连接或经由接头的间接连接。同样,嵌合多肽可以是融合蛋白或者可以通过化学连接来形成,如通过共价或非共价相互作用来形成。例如,在制备含有多聚化结构域的嵌合多肽时,可以将编码TACI多肽序列的全部或部分(如任何所述的TACI ECD,包括变体TACI多肽序列)的核酸与编码所述多聚化结构域序列的核酸直接或间接或任选地经由接头结构域可操作地连接。在一些情形中,构建体编码嵌合蛋白,其中TACI多肽序列的C末端与多聚化结构域的N末端接合。在一些情况下,构建体可以编码嵌合蛋白,其中TACI多肽序列的N末端与多聚化结构域的N末端或C末端接合。

[0245] 多肽多聚体含有两个嵌合蛋白,所述嵌合蛋白是通过将两个相同或不同的TACI多肽序列(例如两个相同或不同的变体TACI多肽序列)直接或间接连接至多聚化结构域而产生的。在一些例子中,在多聚化结构域是多肽的情况下,将编码TACI多肽序列(例如变体TACI多肽序列)和多聚化结构域的基因融合物插入适当的表达载体中。所得嵌合或融合蛋白可以在用重组表达载体转化的宿主细胞中表达,并且允许组装为多聚体,其中多聚化结构域相互作用以形成多价多肽。多聚化结构域与TACI多肽(例如变体TACI多肽)的化学连接可以使用异双功能接头来实现。

[0246] 所得嵌合多肽(如融合蛋白)和由其形成的多聚体可以通过任何合适的方法来纯化,如例如通过亲和色谱在蛋白A或蛋白G柱上纯化。在将编码不同多肽的两种核酸分子转化至细胞中的情况下,将发生同二聚体和异二聚体的形成。可以调整表达条件,使得相对于同二聚体形成更偏好异二聚体形成。

[0247] 在一些实施方案中,多聚化结构域是免疫球蛋白的Fc区。

[0248] 在一些实施方案中,多聚化结构域是免疫球蛋白(例如IgG1)Fc区,其中融合蛋白是含有以下的TACI-Fc:(1)含有任何所提供的TACI ECD序列或由其组成的TACI序列;以及(2)免疫球蛋白Fc区。因此,所提供的实施方案包括含有以下的TACI-Fc融合蛋白:(1)含有上述TACI ECD多肽序列中的任一个(如变体TACI多肽)或由其组成的TACI序列;以及(2)免疫球蛋白Fc区。

[0249] 在一些实施方案中,本文提供一种TACI-Fc融合序列,其含有(1)包含SEQ ID NO:13中所示的序列的TACI ECD序列,以及(2)免疫球蛋白Fc区。在一些实施方案中,本文提供一种TACI-Fc融合序列,其含有(1)由SEQ ID NO:13中所示的序列组成或基本上由其组成的TACI ECD序列,以及(2)免疫球蛋白Fc区。

[0250] 在一些实施方案中,TACI-Fc融合物是变体TACI-Fc融合物,其含有上述变体TACI多肽中的任一个和免疫球蛋白Fc区或由其组成。

[0251] 在一些实施方案中,本文提供一种变体TACI-Fc融合序列,其含有(1)含有CRD1和CRD2的TACI ECD序列,例如含有SEQ ID NO:2-12、21、22、101-120中任一项中所示的序列的TACI序列,以及(2)免疫球蛋白Fc区。在一些实施方案中,本文提供一种变体TACI-Fc融合序列,其含有(1)含有CRD1和CRD2的TACI ECD序列,例如由SEQ ID NO:2-12、21、22、101-120中任一项中所示的序列组成或基本上由其组成的TACI序列,以及(2)免疫球蛋白Fc区。

[0252] 在一些实施方案中,本文提供一种变体TACI-Fc融合序列,其含有(1)含有CRD2但缺少CRD1结构域的TACI ECD序列,例如含有SEQ ID NO:14-20、23-35、92-100、177-192中任一项中所示的序列的TACI序列,以及(2)免疫球蛋白Fc区。在一些实施方案中,本文提供一

种变体TACI-Fc融合序列,其含有(1)含有CRD2结构域但缺少CRD1结构域的TACI ECD序列,例如由SEQ ID NO:14-20、23-35、92-100、177-192中任一项中所示的序列组成或基本上由其组成的TACI序列,以及(2)免疫球蛋白Fc区。

[0253] 在TACI-Fc的所提供实施方案中,免疫球蛋白Fc区可以是免疫球蛋白的野生型Fc,如IgG1 Fc。在一些情形中,Fc区可以是缺少效应子功能的变体Fc(也称为"无效应子Fc")。所提供的TACI-Fc融合蛋白中的示例性Fc区及其变体描述于下文中。

[0254] 在一些实施方案中,Fc是鼠或人Fc。在一些实施方案中,Fc是哺乳动物或人IgG1、lgG2、lgG3或lgG4 Fc区。

[0255] 在一些实施方案中,所述Fc区是或包含SEQ ID NO:71、73、75、81、82、83、134、135、136、137、138、139、140、173、174、175、176、193、218、219、220或221中任一项中所示的序列。在一些实施方案中,所述Fc区是或源自IgG1,如SEQ ID NO:71、73、75、81、82、83、134、135、136、137、139、140、173、174、175、176、193、218、220或221中任一项中所示。在一些实施方案中,所述Fc区是或源自IgG2,如SEQ ID NO:138或219中所示的任一种。在一些实施方案中,所述Fc区是或源自IgG4,如SEQ ID NO:139、140或220中所示的任一种。在一些实施方案中,本文提供的Fc融合蛋白中的Fc区还可以包括展现与上文Fc区中任一个的至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的Fc区。

[0256] 在一些实施方案中,Fc源自IgG1,如人IgG1。在一些实施方案中,Fc是SEQ ID NO:71中所示的IgG1 Fc,其具有含有按照EU编号在位置356和358处的残基Glu(E)和Met(M)的同种异型。在一些实施方案中,Fc包含SEQ ID NO:71所示的氨基酸序列或显示出与SEQ ID NO:71至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。在其他实施方案中,所述Fc是如下IgG1 Fc,其含有人G1m1同种异型的氨基酸,如含有在位置356和358处的Asp(D)和Leu(L)的残基,例如如SEQ ID NO:81中所示。因此,在一些情形中,本文提供的Fc可以含有氨基酸取代E356D和M358L以重构同种异型G1 m1的残基。在一些实施方案中,Fc包含SEQ ID NO:81所示的氨基酸序列或显示出与SEQ ID NO:81至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0257] 在一些实施方案中,所述Fc区具有SEQ ID NO:81中所示的氨基酸序列。

EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:81)

[0258] 在一些实施方案中,变体Fc包含SEQ ID NO:173中所示的序列。在一些实施方案中,变体Fc包含SEQ ID NO:174中所示的序列。在一些实施方案中,在本文提供的构建体中使用的Fc区可能进一步缺少C末端赖氨酸残基。

[0259] 在一些实施方案中,Fc来源于IgG2,如人IgG2。在一些实施方案中,Fc包含SEQ IDNO:138所示的氨基酸序列或显示出与SEQ ID NO:138至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述Fc区是具有SEQ ID NO:138中所示的序列的IgG2 Fc区。在一些实施方案中,所述Fc区是具有SEQ ID NO:219中所示的序列的IgG2 Fc区。

[0260] 在一些实施方案中,Fc源自IgG4,如人IgG4。在一些实施方案中,Fc包含SEQ ID NO:139所示的氨基酸序列或显示出与SEQ ID NO:139至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,IgG4 Fc是稳定的Fc,其中人IgG4的CH3结构域被人IgG1的CH3结构域取代,并且其展现被抑制的聚集体形成;抗体,其中人IgG4的CH3和CH2结构域分别被人IgG1的CH3和CH2结构域取代;或者抗体,其中在Kabat等人提出的EU索引中指示的人IgG4的位置409处的精氨酸被赖氨酸取代,并且其展现被抑制的聚集体形成(参见例如,美国专利号8,911,726)。在一些实施方案中,Fc是含有S228P突变的IgG4,其已经显示通过Fab-臂交换防止治疗性抗体与内源性IgG4之间的重组(参见,例如Labrijin等人(2009) Nat.Biotechnol.,27(8):767-71)。在一些实施方案中,Fc包含SEQ ID NO:140所示的氨基酸序列或显示出与SEQ ID NO:140至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fc区是SEQ ID NO:140中所示的IgG4 Fc区。在一些实施方案中,Fc区是SEQ IDNO:220中所示的IgG4 Fc区。

[0261] 在一些实施方案中,所述Fc区是变体Fc区,其中野生型Fc被一个或多个氨基酸取代修饰,以降低效应子活性或使Fc对Fc效应子功能呈惰性。示例性无效应子或惰性突变包括本文所述的那些。

[0262] 在一些实施方案中,所述Fc区含有一个或多个修饰,所述修饰改变(例如降低)其正常功能中的一种或多种。通常,除了作为免疫球蛋白的主要功能的抗原结合能力之外,Fc区还负责效应子功能,如补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。此外,Fc区中存在的FcRn序列通过与体内FcRn受体缀合增加体内半衰期而起到调节血清中IgG水平的作用。在一些实施方案中,可以在Fc中降低或改变此类功能以与提供的Fc融合蛋白一起使用。

[0263] 在一些实施方案中,可以将一个或多个氨基酸修饰引入Fc区中,从而生成Fc区变体。在一些实施方案中,Fc区变体具有降低的效应子功能。有许多可改变效应子功能的Fc序列的变化或突变的例子。例如,WO 00/42072、WO 2006019447、WO 2012125850、WO 2015/107026、US2016/0017041以及Shields等人J Biol.Chem.9(2):6591-6604(2001)描述了具有改善或减小的与FcR的结合的示例性Fc变体。这些出版物的内容通过引用特别地并入本文。

[0264] 在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白包含展现降低的效应子功能的Fc区,这使其成为某些应用的期望候选物,在所述应用中,免疫调节蛋白的体内半衰期是重要的,但是某些效应子功能(如CDC和ADCC)是不必要的或有害的。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定以确认CDC和/或ADCC活性的降低/耗尽。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定以确保,免疫调节蛋白缺少Fcγ R结合(因此可能缺少ADCC活性),但是保留FcRn结合能力。介导ADCC的原代细胞NK细胞仅表达Fcγ RIII,而单核细胞表达Fcγ RI、Fcγ RII和Fcγ RIII。造血细胞上的FcR表达总结于Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol.9:457-492(1991)第464页的表2中。用于评估目的分子的ADCC活性的体外测定的非限制性例子描述于以下文献中:美国专利号5,500,362(参见例如,Hellstrom,I.等人Proc.Nat'lAcad.Sci.USA 83:7059-7063(1986))以及Hellstrom,I等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 82:1499-1502(1985);美

国专利号5,821,337(参见Bruggemann,M.等人,J.Exp.Med.166:1351-1361(1987))。可替代地,可以使用非放射性测定方法(参见例如用于流式细胞术的ACTI™非放射性细胞毒性测定(CellTechnology公司,山景城,加利福尼亚州);和CytoTox 96™非放射性细胞毒性测定(Promega,麦迪逊,威斯康辛州))。用于此类测定的有用效应细胞包括外周血单个核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。可替代地或另外地,可以在体内(例如在动物模型中,如Clynes等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 95:652-656(1998)中披露的动物模型中)评估目的分子的ADCC活性。还可以进行C1q结合测定以确认,免疫调节蛋白n不能结合C1q,并因此缺少CDC活性。参见例如WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评估补体激活,可以进行CDC测定(参见例如,Gazzano-Santoro等人,J.Immunol.Methods 202:163(1996);Cragg,M.S.等人,Blood 101:1045-1052(2003);以及Cragg,M.S.和M.J.Glennie,Blood103:2738-2743(2004))。还可以使用本领域已知的方法进行FcRn结合和体内清除/半衰期测定(参见例如,Petkova,S.B.等人,Int'l.Immunol.18(12):1759-1769(2006))。

[0265] 具有降低的效应子功能的免疫调节蛋白包括按照EU编号具有以下Fc区残基中的一个或多个的取代的那些:238、265、269、270、297、327和329(美国专利号6,737,056)。此类Fc突变体包括根据EU编号的氨基酸位置265、269、270、297和327中的两个或更多个位置处具有取代的Fc突变体,包括残基265和297取代为丙氨酸的所谓的"DANA"Fc突变体(美国专利号7,332,581)。

[0266] 在一些实施方案中,免疫调节蛋白的Fc区具有如下Fc区,其中与天然Fc区相比,在位置234、235、236、237、238、239、270、297、298、325和329(通过EU编号指示)处的任何一个或多个氨基酸被不同的氨基酸取代。Fc区中这样的改变包括例如诸如Current Opinion in Biotechnology(2009)20(6),685-691中所述的去糖基化链(N297A和N297Q)、IgG1-N297G、IgG1-L234A/L235A、IgG1-L234A/L235E/G237A、IgG1-A325A/A330S/P331S、IgG1-C226S/C229S、IgG1-C226S/C229S/E233P/L234V/L235A、IgG1-E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、IgG1-L234F/L235E/P331S、IgG1-S267E/L328F、IgG2-V234A/G237A、IgG2-H268Q/V309L/A330S/A331S、IgG4-L235A/G237A/E318A和IgG4-L236E的改变;诸如WO 2008/092117中所述的G236R/L328R、L235G/G236R、N325A/L328R和N325LL328R的改变;在位置233、234、235和237(根据EU编号指示)的氨基酸插入;以及在WO 2000/042072中所述位点的改变。

[0267] 描述了具有改善的或减小的与FcR的结合的某些Fc变体。(参见例如,美国专利号6,737,056;WO 2004/056312、WO 2006019447以及Shields等人,J.Biol.Chem.9(2):6591-6604(2001)。)

[0268] 在一些实施方案中,提供一种免疫调节蛋白,其包含含有一个或多个氨基酸取代的变体Fc区,所述取代延长半衰期和/或改进与新生Fc受体(FcRn)的结合。具有延长的半衰期和改进的与FcRn的结合的抗体描述于US2005/0014934A1(Hinton等人)或WO 2015107026中。那些抗体包含其中具有一个或多个取代的Fc区,所述取代改善Fc区与FcRn的结合。这样的Fc变体包括按照EU编号在以下Fc区残基中的一个或多个处具有取代的那些:238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434,例如,Fc区残基434的取代(美国专利号7,371,826)。

[0269] 在一些实施方案中,免疫调节蛋白的Fc区包含按照EU编号的一个或多个氨基酸取

代C220S、C226S和/或C229S。在一些实施方案中,免疫调节蛋白的Fc区包含一个或多个氨基酸取代R292C和V302C。关于Fc区变体的其他例子还参见Duncan和Winter,Nature322:738-40(1988);美国专利号5,648,260;美国专利号5,624,821;以及WO 94/29351。

[0270] 在一些实施方案中,在Fc区域中进行改变,这导致C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)减弱,例如,如美国专利号6,194,551、WO 99/51642和Idusogie等人,J.Immunol.164:4178-4184(2000)中描述的。

[0271] 在一些实施方案中,包含一个或多个氨基酸修饰(例如氨基酸取代)的变体Fc区源自野生型IgG1,如野生型人IgG1。在一些实施方案中,野生型IgG1 Fc可以是SEQ ID NO:71中所示的Fc,其具有含有按照EU编号在位置356和358处的残基Glu(E)和Met(M)的同种异型。在一些实施方案中,变体Fc区源自SEQ ID NO:71中所示的氨基酸序列。在其他实施方案中,野生型IgG1 Fc含有人G1m1同种异型的氨基酸,如在位置356和358含有Asp(D)和Leu(L)的残基,例如,如SEQ ID NO:81中所示。因此,在一些情形中,变体Fc源自SEQ ID NO:81中所示的氨基酸序列。

[0272] 在一些实施方案中,Fc区缺少对应于SEQ ID NO:71或81中所示的野生型或未修饰的Fc的位置232的C末端赖氨酸(按照EU编号对应于K447del)。

[0273] 在一些实施方案中,按照SEQ ID NO:71的编号,变体Fc区包含野生型或未修饰的Fc区的C5S氨基酸修饰(按照EU编号对应于C220S)。

[0274] 在一些实施方案中,所述Fc区是含有至少一个氨基酸取代变体Fc,所述氨基酸取代按照SEQ ID NO:71的编号为N82G(按照EU编号对应于N297G)。在一些实施方案中,所述Fc还含有依据SEQ ID NO:71的编号的至少一个氨基酸取代,即R77C或V87C(对应于依据EU编号的R292C或V302C)。在一些实施方案中,变体Fc区还包含依据SEQ ID NO:71编号的C5S氨基酸修饰(对应于依据EU编号的C220S)。例如,在一些实施方案中,变体Fc区包含以下氨基酸修饰:按照EU编号,N297G和以下氨基酸修饰C220S、R292C或V302C中的一个或多个(关于SEQ ID NO:71,对应于N82G和以下氨基酸修饰C5S、R77C或V87C中的一个或多个),例如,Fc区包含SEQ ID NO:82中所示的序列。

[0275] 在一些实施方案中,按照EU编号,变体Fc含有氨基酸取代L234A/L235E/G237A。在一些实施方案中,按照EU编号,变体Fc含有氨基酸取代A330S/P331S。在一些实施方案中,变体Fc含有氨基酸取代L234A/L235E/G237A/A330S/P331S(Gross等人(2001)Immunity 15:289)。在一些实施方案中,变体Fc包含SEQ ID NO:175中所示的序列。在一些实施方案中,变体Fc包含SEQ ID NO:176中所示的序列。在一些实施方案中,在本文提供的构建体中使用的Fc区可能进一步缺少C末端赖氨酸残基。

[0276] 在一些实施方案中,Fc区是变体Fc,按照EU编号,其包括突变L234A、L235E和G237A。在一些实施方案中,通过去除一个或多个半胱氨酸残基,如通过按照EU编号在位置220处将半胱氨酸残基替代为丝氨酸残基(C220S),进一步修饰野生型Fc。具有降低的效应子功能的示例性惰性Fc区显示于SEQ ID NO:83和SEQ ID NO:75中,它们分别基于SEQ ID NO:71或SEQ ID NO:81中所示的同种异型。在一些实施方案中,Fc区可能进一步缺少C末端赖氨酸残基。在一些实施方案中,变体Fc区包含氨基酸修饰C220S、L234A、L235E或G237A中的一个或多个,例如Fc区包含SEQ ID NO:73、75、83或136中所示的序列。在一些实施方案中,变体Fc包含具有SEQ ID NO:73中所示的序列。在一些实施方案中,变体Fc包含具有SEQ

ID NO:75中所示的序列。在一些实施方案中,变体Fc包含具有SEQ ID NO:83中所示的序列。在一些实施方案中,变体Fc包含具有SEQ ID NO:136中所示的序列。

[0277] 在一些实施方案中,所述Fc区是具有SEQ ID NO:73中所示的序列的变体Fc。

EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:73)

[0278] 在一些实施方案中,所述Fc区是IgG1 Fc,但是不含铰链序列。在一些实施方案中,所述IgG1 Fc区不含铰链序列EPKSC(SEQ ID NO:239)。在一些实施方案中,所述IgG1Fc区不含铰链序列EPKSS(SEQ ID NO:238)。

[0279] 在一些实施方案中,Fc区是变体Fc,其具有SEQ ID NO:221中所示的序列。

DKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(SEQID NO:221)

[0280] 在一些实施方案中,所述Fc区是变体Fc区,其包含氨基酸修饰C220S、L235P、L234V、L235A、G236del或S267K中的一个或多个,例如Fc区包含SEQ ID NO:134中所示的序列。在一些实施方案中,所述Fc区缺少对应于SEQ ID NO:71中所示的野生型或未修饰的Fc的位置232的C末端赖氨酸(按照EU编号对应于K447del)。

[0281] 在一些实施方案中,所述Fc区是变体Fc区,其包含氨基酸修饰C220S、R292C、N297G、V302C中的一个或多个。在一些实施方案中,所述Fc区缺少对应于SEQ ID NO:71中所示的野生型或未修饰的Fc的位置232的C末端赖氨酸(按照EU编号对应于K447del)。示例性变体Fc区示于SEQ ID NO:135中。

[0282] 在一些实施方案中,变体Fc区包含氨基酸修饰C220S/E233P/L234V/L235A/G236del/S267K中的一个或多个。在一些实施方案中,所述Fc区缺少对应于SEQ ID NO:71中所示的野生型或未修饰的Fc的位置232的C末端赖氨酸(按照EU编号对应于K447del)。示例性变体Fc区示于SEQ ID NO:137中。

[0283] 用于包括于免疫调节多肽中的这样的Fc区的例子示于表2中。

表2:示例性IgG1 Fc区,野生型或变体(无效应子)

Fc突变(EU编号)	356E/358M同种异型 SEQ ID NO	356D/358L同种异型 SEQ ID NO
(野生型)	71	81(具有C220S、K447del)
C220S、R292C、N297G、V302C	82	
C220S、R292C、N297G、V302C、K447del	135	
C220S、L234A、L235E、G237A	83	75
C220S、L234A、L235E、G237A、K447del	136	73
L234A、L235E、G237A、K447del,缺失铰链		221
C220S、L235P、L234V、L235A、G236del、S267K	134	

C220S/E233P/L234V/L235A/G236del/S267K/K447del	137	
L234A、L235E、G237A、A330S、P331S		176
L234A、L235E、G237A、A330S、P331S，缺失铰链		175

[0284] 在一些实施方案中,Fc区是变体Fc区,其含有表2中的Fc突变的任何组合。在一些实施方案中,Fc区是变体Fc区,其具有表2中任一项SEQ ID NO中所示的序列。

[0285] 例如,变体Fc区可以是无效应子Fc,其展现与SEQ ID NO:71或SEQ ID NO:81中所示的野生型IgG1相比降低的效应子活性。在一些实施方案中,所述变体Fc包含SEQ ID NO:75、82、83、134、73、135、136或137中任一项中所示的氨基酸序列或者展现与SEQ ID NO:75、82、83、134、73、135、136或137中任一项的至少约85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更高序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述变体Fc具有SEQ ID NO:73中所示的序列。在实施方案中,在从细胞产生和表达时,所提供的免疫调节蛋白(例如TACI-Fc融合物)是含有两条相同多肽链的同二聚体。

[0286] 在一些实施方案中,免疫调节蛋白含有第一免疫调节Fc融合多肽和第二免疫调节Fc融合多肽,其中所述第一多肽和所述第二多肽是不同的。在一些实施方案中,第一Fc多肽融合物含有Fc区和一个或多个变体TACI多肽序列,并且第二多肽融合物含有Fc区和一个或多个TACI多肽序列。在这样的实施方案中,所述Fc区可以是促进或有利于异二聚体形成的区域。

[0287] 在一些实施方案中,第一和第二免疫调节Fc融合多肽中的一种或两种的Fc结构域包含修饰(例如取代),使得Fc分子的界面被修饰以有利于和/或促进异二聚化。促进Fc链异二聚化的方法包括诱变Fc区,如通过包含一组“杵臼结构”突变或包含突变以实现Fc的静电操纵以有利于不同多肽链之间的吸引相互作用。在一些实施方案中,异二聚分子的Fc区另外可以含有一个或多个其他Fc突变,如上文所述的任一种。在一些实施方案中,所述异二聚体分子含有具有降低效应子功能的突变的Fc区。在一些实施方案中,这样的Fc区按照EU编号含有突变C220S、L234A、L235E和/或G237A。在一些实施方案中,Fc骨架中的上文突变中的任一个可以在按照EU编号含有位置356和358处的残基Glu(E)和Met(M)的同种异型中进行。在其他实施方案中,Fc骨架中的上文突变中的任一个可以在按照EU编号含有位置356和358处的残基Asp(D)和Leu(L)的同种异型中进行。

[0288] 在一些实施方案中,修饰包括将突起(杵)引入第一Fc多肽中并将腔(臼)引入第二Fc多肽中,使得突起可位于腔中以促进第一和第二含Fc的多肽的复合。靶向用于替代和/或修饰以在多肽中产生突起或腔的氨基酸通常是与第二多肽的界面中的一个或多个氨基酸相互作用或接触的界面氨基酸。

[0289] 在一些实施方案中,被修饰以含有突起(杵)氨基酸的第一多肽包含用具有至少一个侧链的氨基酸替代天然或原始氨基酸,所述至少一个侧链从第一多肽的界面突出,因此可位于第二多肽的相邻界面中的补偿腔(臼)中。最常见的是,替代氨基酸是具有比原始氨基酸残基更大的侧链体积的氨基酸。本领域技术人员了解如何确定和/或评估氨基酸残基的特性以鉴定产生突起的理想替代氨基酸。在一些实施方案中,用于形成突起的替代残基是天然存在的氨基酸残基,并且包括例如精氨酸(R)、苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)或色氨酸(W)。在一些例子中,经鉴定用于替代的原始残基是具有小侧链的氨基酸残基,例如像丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸或缬氨酸。

[0290] 在一些实施方案中,被修饰以含有腔(臼)的第二多肽是包含用具有至少一个侧链的氨基酸替代天然或原始氨基酸的多肽,所述至少一个侧链从第二多肽的界面凹进,因此能够从第一多肽的界面容纳相应的突起。最常见的是,替代氨基酸是具有比原始氨基酸残基更小的侧链体积的氨基酸。本领域技术人员了解如何测定和/或评估氨基酸残基的性质以鉴定对于形成腔而言理想的替代残基。通常,用于形成腔的替代残基是天然存在的氨基酸,并且包括例如丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)和缬氨酸(V)。在一些例子中,经鉴定用于替代的原始氨基酸是具有大侧链的氨基酸,例如酪氨酸、精氨酸、苯丙氨酸或色氨酸。

[0291] 例如,人IgG1的CH3界面涉及位于四个反平行的β-链上的每个结构域上的十六个残基,所述结构域掩埋来自每个表面的1090Å2(参见例如,Deisenhofer等人(1981)Biochemistry,20:2361-2370;Miller等人,(1990)J Mol.Biol.,216,965-973;Ridgway等人,(1996)Prot.Engin.,9:617-621;美国专利号5,731,168)。用于产生突起或腔的CH3结构域的修饰描述于例如美国专利号5,731,168;国际专利申请WO 98/50431和WO 2005/063816;以及Ridgway等人,(1996)Prot.Engin.,9:617-621。在一些例子中,用于产生突起或腔而对CH3结构域的修饰通常靶向位于两个中心反平行β链上的残基。目的是最小化以下风险,即产生的突起可通过突出到周围溶剂中而被容纳而不是由配偶体CH3结构域中的补偿腔容纳。

[0292] 在一些实施方案中,异二聚体分子含有“杵链”的CH3结构域中的T366W突变,以及“臼链”的CH3结构域中的T366S、L368A、Y407V突变。在一些情况下,例如通过将Y349C突变引入“杵”或“臼”链的CH3结构域中,以及将E356C突变或S354C突变引入另一条链的CH3结构域中,还可以使用CH3结构域之间的另外的链间二硫桥(Merchant,A.M.,等人,Nature Biotech.16(1998)677-681)。在一些实施方案中,异二聚体分子含有两个CH3结构域之一中的S354C、T366W突变,以及两个CH3结构域中的另一个中的Y349C、T366S、L368A、Y407V突变。例如,杵Fc可以含有SEQ ID NO:89中所示的序列,其含有S354C和T366W,以及SEQ ID NO:90中所示的臼Fc,其含有突变Y349C、T366S、L368A和Y407V)。在一些实施方案中,异二聚分子包含两个CH3结构域中的一个中的E356C、T366W突变,以及两个CH3结构域中的另一个中的Y349C、T366S、L368A、Y407V突变。在一些实施方案中,所述异二聚体分子包含两个CH3结构域之一中的Y349C、T366W突变以及两个CH3结构域中的另一个中的E356C、T366S、L368A、Y407V突变。在一些实施方案中,异二聚体分子包含两个CH3结构域中的一个中的Y349C、T366W突变,以及两个CH3结构域中的另一个中的S354C、T366S、L368A、Y407V突变。其他杵臼结构技术的例子是本领域已知的,例如如EP 1 870 459 A1所述。

[0293] 在一些实施方案中,含有CH3突起(杵)或腔(臼)修饰的Fc变体可以在任何位置与多结构域免疫调节多肽接合,但是通常经由其N末端或C末端,接合至一个或多个TACI多肽序列(例如变体TACI多肽序列)的N末端或C末端,如以形成融合多肽。连接可以是直接连接或经由接头的间接连接。通常,通过含有一个或多个CH3突起修饰的Fc变体连接的第一免疫调节多肽与含有一个或多个CH3腔修饰的Fc变体连接的第二免疫调节多肽的共表达来产生杵和臼分子。

[0294] 杵和臼Fc多肽的示例性序列分别示于SEQ ID NO:128和129中。在一些实施方案中,杵或臼Fc区缺少对应于SEQ ID NO:71中所示的野生型或未修饰的Fc的位置232的C末端赖氨酸(按照EU编号对应于K447del)。杵和臼Fc多肽的示例性序列分别示于SEQ ID NO:89

和90中。

[0295] 在一些实施方案中,多结构域多肽的单独多肽或单一结构域多肽的单独多肽与形成免疫调节蛋白的多聚化结构域连接,是三聚体、四聚体或五聚体。在一些实施方案中,这样的分子的单独多肽是相同的。在一些实施方案中,这样的多聚化结构域是软骨寡聚基质蛋白(COMP)组装结构域、血管舒张剂刺激磷蛋白(VASP)四聚化结构域或ZymoZipper(ZZ)12.6结构域。

[0296] 在一些实施方案中,多聚化结构域是软骨寡聚基质蛋白(COMP)组装结构域的一部分(Voulgaraki等人,Immunology(2005)115(3):337-346)。在一些例子中,COMP是或含有如SEQ ID NO:146中所示的氨基酸序列(例如全长COMP的氨基酸29-72,Uniprot登录号P49747)或具有与SEQ ID NO:146的约85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的序列。

[0297] 在一些实施方案中,多聚化结构域是血管舒张剂刺激磷蛋白(VASP)四聚化结构域(Bachmann等人,J Biol Chem(1999)274(33):23549-23557)。在一些实施方案中,VASP是或含有如SEQ ID NO:147中所示的氨基酸序列(例如全长VASP的氨基酸343-375;Uniprot登录号P50552)或具有与SEQ ID NO:147的约85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的序列。

[0298] 在一些实施方案中,将TACI多肽序列(例如变体TACI多肽序列)经由接头(如肽接头)与多聚化结构域(例如Fc区)接合。在一些实施方案中,肽接头的长度可以是单个氨基酸残基或更长。在一些实施方案中,肽接头的长度为至少一个氨基酸残基但不超过20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸残基。

[0299] 在一些实施方案中,接头为(按单字母氨基酸代码):GGGGS(“4GS”;SEQ IDNO:77)或4GS接头的多聚体,如2、3、4或5个4GS接头的重复序列。在一些实施方案中,肽接头为(GGGGS)2(SEQ ID NO:78)、(GGGGS)3(SEQ ID NO:79)、(GGGGS)4(SEQID NO:84)或(GGGGS)5(SEQ ID NO:91)。在一些实施方案中,接头还可以单独包括一系列丙氨酸残基或者还包括另一个肽接头(如4GS接头或其多聚体)。在一些实施方案中,接头(按单字母氨基酸代码)为GSGGGGS(SEQ ID NO:74)或GGGGSSA(SEQID NO:80)。在一些例子中,所述接头是2xGGGGS,之后是三个丙氨酸(GGGGSGGGGSAAA;SEQ ID NO:133)。在一些例子中,接头示于SEQ ID NO:194或195中。

[0300] 在一些实施方案中,TACI多肽(如变体TACI多肽)与Fc序列直接连接。在一些实施方案中,TACI多肽(如变体TACI多肽)与Fc序列间接连接,如经由接头连接。在一些实施方案中,一个或多个“肽接头”连接TACI多肽(例如变体TACI多肽)与Fc区。在一些实施方案中,肽接头的长度可以是单个氨基酸残基或更长。在一些实施方案中,肽接头的长度为至少一个氨基酸残基但不超过20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸残基。示例性接头包括如本文所述的任何接头。

[0301] 在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白具有结构TACI多肽(TACI)-接头-Fc区。在一些实施方案中,免疫调节蛋白是TACI-Fc融合蛋白的两个相同拷贝的同二聚体。例如,两个相同多肽融合物的Fc区之间的相互作用形成共价二硫键以得到含有两个TACI多肽(例如两个变体TACI多肽)的二聚分子。

[0302] 在一些实施方案中,提供一种TACI-Fc融合蛋白,其按顺序含有TACI多肽(例如如

上所述的任一种)、接头和Fc区。在一些实施方案中,TACI Fc融合物中的每个TACI多肽是截短的野生型TACI多肽,例如如所述的任一种。在一些实施方案中,TACI Fc融合物的TACI多肽示于SEQ ID NO:13中。接头可以是如所述的任一种。在一些实施方案中,接头是GSGGGGS(SEQ ID NO:74)。在一些实施方案中,接头是GS(G4S)2(SEQ ID NO:194)。Fc区可以是如所述的任何Fc区。在一些实施方案中,Fc区是SEQ ID NO:81中所示的野生型IgG1 Fc。在一些实施方案中,Fc区是SEQ ID NO:73中所示的变体Fc。

[0303] 在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白具有SEQ ID NO:171中所示的序列。在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白具有SEQ ID NO:197中所示的序列。在一些实施方案中,TACI-Fc融合物由SEQ ID NO:208中所示的序列编码。

SLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPE
AEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:171)

[0304] 在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白具有SEQ ID NO:172中所示的序列。

SLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:172)

[0305] 在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白具有SEQ ID NO:196中所示的序列,并且由SEQ ID NO:207中所示的序列编码。

[0306] 在一些实施方案中,TACI多肽是变体TACI多肽。在一些实施方案中,提供一种变体TACI-Fc融合蛋白,其按顺序含有变体TACI多肽(例如如上所述的任一种)、接头和Fc区。在一些实施方案中,TACI Fc融合物的TACI多肽是变体TACI多肽,例如如所述的任一种。在一些实施方案中,变体TACI Fc融合物的变体TACI示于SEQ ID NO:2-12、21、22或101-120中的任一项中。在一些实施方案中,变体TACI Fc融合物的变体TACI示于SEQID NO:14-20、23-35、92-100或177-192中的任一项中。在一些实施方案中,接头是GSGGGGS(SEQ ID NO:74)。在一些实施方案中,接头是GS(G4S)2(SEQ ID NO:194)。在一些实施方案中,Fc区是SEQ ID NO:81中所示的野生型IgG1 Fc。在一些实施方案中,Fc区是SEQ ID NO:73中所示的变体Fc。

[0307] 在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白具有SEQ ID NO:167-170、200或222-237中任一项中所示的氨基酸序列。

[0308] 在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白具有SEQ ID NO:167中所示的序列。

SLSCRKEQGEYYDHLLRDCISCASICGQHPKQCADFCENKLRSGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPE
AEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:167)

[0309] 在一些实施方案中,TACI-Fc融合物由SEQ ID NO:211中所示的序列编码。

[0310] 在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白具有SEQ ID NO:168中所示的序列。

SLSCRKEQGEYYDHLLRDCISCASICGQHPKQCADFCENKLRSGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL

HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:168)

[0311] 在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白具有SEQ ID NO:169中所示的序列。

SLSCRKEEGKFYDHLLQDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPE
AEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:169)

[0312] 在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白具有SEQ ID NO:170中所示的序列。

SLSCRKEEGKFYDHLLQDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:170)

[0313] 在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白含有多个拷贝的TACI多肽序列(例如变体TACI-多肽序列),如2、3或4个TACI多肽序列。在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白含有两个TACI多肽序列(例如两个变体TACI多肽序列)。在一些情形中,TACI多肽序列可以直接连接或者可以经由接头(如肽接头,包括如所述的任一种)间接连接。在这样的例子中,TACI多肽序列中的一个与Fc区接合或连接,如与Fc区的N末端或C末端接合或连接。在其他情形中,TACI多肽序列可以通过Fc区彼此隔开,并且各自与Fc区的N末端或C末端单独接合。与Fc区的连接可以是直接连接或者可以是经由接头(如肽接头,包括如所述的任一种)的间接连接。

[0314] 在一些实施方案中,TACI多肽序列(例如变体TACI多肽序列)可以按顺序在融合蛋白中串联排列(下文称为“串联”Fc融合构建体)。在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白具有以下结构:(TACI)-接头-(TACI)-接头-Fc区。在一些实施方案中,免疫调节蛋白是四价分子,所述四价分子是TACI-Fc融合蛋白的两个相同拷贝的同二聚体。例如,两个相同多肽融合物的Fc区之间的相互作用形成共价二硫键以得到含有四个TACI多肽(例如四个变体TACI多肽)的二聚分子。

[0315] 在一些实施方案中,提供一种TACI-Fc融合蛋白,其按顺序含有TACI多肽(例如如上所述的任一种);接头;另一种TACI多肽,例如如所述的任一种;以及Fc区。在一些实施方案中,TACI Fc融合物中的每个TACI多肽是截短的野生型TACI多肽,例如如所述的任一种。在一些实施方案中,TACI Fc融合物中的每个TACI多肽示于SEQ ID NO:13中。在一些实施方案中,TACI Fc融合物中的每个TACI多肽是变体TACI多肽,例如如所述的任一种。在一些实施方案中,TACI Fc融合物中的每个TACI多肽是SEQ ID NO:2-12、21、22或101-120中任一项中所示的变体TACI。在一些实施方案中,TACI Fc融合物中的每个TACI多肽是SEQ ID NO:14-20、23-35、92-100或177-192中任一项中所示的变体TACI。接头可以是如所述的任一种。在一些实施方案中,接头是GSGGGGS(SEQ ID NO:74)。Fc区可以是如所述的任何Fc区。在一些实施方案中,Fc区是SEQ ID NO:81中所示的野生型IgG1 Fc。在一些实施方案中,Fc区是SEQ ID NO:73中所示的变体Fc。在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白具有SEQ ID NO:198中所示的序列,并且由SEQ ID NO:209中所示的序列编码。

[0316] 在一些实施方案中,TACI多肽序列(例如变体TACI多肽序列)可以在融合蛋白中被

Fc区隔开,其中所述Fc区位于两个TACI多肽序列之间(下文称为“杠铃(barbell)”Fc融合构建体)。在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白具有以下结构:(TACI)-接头-Fc区-接头-(TACI)。在一些实施方案中,所述接头可以是相同的或不同的。在一些实施方案中,免疫调节蛋白是四价分子,所述四价分子是TACI-Fc融合蛋白的两个相同拷贝的同二聚体。例如,两个相同多肽融合物的Fc区之间的相互作用形成共价二硫键以得到含有四个TACI多肽(例如四个变体TACI多肽)的二聚分子。

[0317] 在一些实施方案中,提供一种TACI-Fc融合蛋白,其按顺序含有TACI多肽(例如如上所述的任一种);接头;Fc区;接头;以及另一种TACI多肽,例如如所述的任一种。在一些实施方案中,TACI Fc融合物中的每个TACI多肽是截短的野生型TACI多肽,例如如所述的任一种。在一些实施方案中,TACI Fc融合物中的每个TACI多肽示于SEQ ID NO:13中。在一些实施方案中,TACI Fc融合物中的每个TACI多肽是变体TACI多肽,例如如所述的任一种。在一些实施方案中,TACI Fc融合物中的每个TACI多肽是SEQ ID NO:2-12、21、22或101-120中任一项中所示的变体TACI。在一些实施方案中,TACI Fc融合物中的每个TACI多肽是SEQ ID NO:14-20、23-35、92-100或177-192中任一项中所示的变体TACI。所述接头可以是如所述的任一种,并且可以是相同的或不同的。在一些实施方案中,第一接头是GSGGGGS(SEQ ID NO:74)并且第二接头是$(GGGGS)_4$(SEQ ID NO:84)。Fc区可以是如所述的任何Fc区。在一些实施方案中,Fc区是SEQ ID NO:81中所示的野生型IgG1 Fc。在一些实施方案中,Fc区是SEQ ID NO:73中所示的变体Fc。在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白具有SEQ ID NO:201中所示的序列,并且由SEQ ID NO:212中所示的序列编码。在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白具有SEQ ID NO:202中所示的序列,并且由SEQ ID NO:213中所示的序列编码。

[0318] 在一些实施方案中,提供一种TACI-Fc融合蛋白,其为由两个相同的如所述与Fc结构域连接的TACI多肽(例如变体TACI多肽)形成的二聚体。在一些实施方案中,相同种类(也称为拷贝)的任何所提供的TACI-Fc融合多肽(例如变体TACI-Fc融合物)将二聚化以产生同二聚体。在一些实施方案中,二聚体是同二聚体,其中两个TACI-Fc多肽(例如变体TACI-Fc多肽)是相同的。对于生成同二聚Fc分子,Fc区是能够通过单独Fc区在细胞中的共表达与匹配的Fc区形成同二聚体的Fc区。在一些实施方案中,二聚体化是通过在多肽融合物的Fc区之间形成的一个或多个共价二硫键介导的。

[0319] 还提供编码免疫调节蛋白的核酸分子。在一些实施方案中,对于免疫调节蛋白的产生,将编码所述免疫调节蛋白的核酸分子插入适当的表达载体中。所得免疫调节蛋白可以在用表达转化的宿主细胞中表达,其中通过在Fc部分之间形成的链间二硫键进行Fc结构域之间的组装,以产生二聚(如二价)免疫调节蛋白。

[0320] 还提供编码TACI-Fc融合蛋白(例如变体TACI-Fc融合蛋白)的核酸分子。在一些实施方案中,对于Fc融合蛋白的产生,将编码TACI-Fc融合蛋白(例如变体TACI-Fc融合蛋白)的核酸分子插入适当的表达载体中。所得TACI-Fc融合蛋白(例如变体TACI-Fc融合蛋白)可以在用表达转化的宿主细胞中表达,其中通过在Fc部分之间形成的链间二硫键进行Fc结构域之间的组装,以产生二聚(如二价)TACI-Fc融合蛋白。所得Fc融合蛋白可以通过亲和色谱在蛋白A或蛋白G柱上容易地纯化。为了产生异二聚体,可能需要另外的纯化步骤。例如,在将编码不同免疫调节蛋白的两种核酸转化至细胞中的情况下,异二聚体的形成必须以生化方式来实现,因为携带Fc结构域的免疫调节蛋白也将被表达为二硫键连接的同二聚体。因

此,同二聚体可以在有利于破坏链间二硫键但不影响链内二硫键的条件下还原。在一些情形中,将不同免疫调节蛋白单体以等摩尔量混合并氧化,以形成同二聚体与异二聚体的混合物。通过色谱技术分离该混合物的组分。可替代地,可以通过使用如所述的杵臼结构方法基因工程化和表达包含含有一个或多个TACI变体的Fc融合分子的免疫调节蛋白来偏向这种类型的异二聚体的形成。

[0321] 在实施方案中,在从细胞产生和表达时,所提供的免疫调节蛋白(如TACI-Fc(例如变体TACI-Fc))是含有两条相同多肽链的同二聚体。图8A和图8B描绘本文提供的示例性TACI-Fc融合蛋白的结构。

[0322] 本文提供两个相同变体TACI-Fc融合蛋白的TACI(26)-Fc_73同二聚体,所述变体TACI-Fc融合蛋白含有SEQ ID NO:26中所示的TACI富半胱氨酸结构域2(CRD2)的变体,所述同二聚体设计为中和APRIL和BAFF的B细胞刺激活性。所述TACI(26)-Fc_73同二聚体是由2条相同受体Fc-融合蛋白链组成的二聚体,每条链具有通过共价二硫键连接的SEQ ID NO:167中所示的变体TACI CRD2结构域人Fc融合物。

[0323] 本文提供两个相同变体TACI-Fc融合蛋白的TACI(26)-Fc_81同二聚体,所述变体TACI-Fc融合蛋白含有SEQ ID NO:26中所示的TACI富半胱氨酸结构域2(CRD2)的变体,所述同二聚体设计为中和APRIL和BAFF的B细胞刺激活性。所述TACI(26)-Fc_81同二聚体是由2条相同受体Fc-融合蛋白链组成的二聚体,每条链具有通过共价二硫键连接的SEQ ID NO:168中所示的变体TACI CRD2结构域人Fc融合物。

[0324] 本文提供两个相同变体TACI-Fc融合蛋白的TACI(27)-Fc_73同二聚体,所述变体TACI-Fc融合蛋白含有SEQ ID NO:27中所示的TACI富半胱氨酸结构域2(CRD2)的变体,所述同二聚体设计为中和APRIL和BAFF的B细胞刺激活性。所述TACI(27)-Fc_73同二聚体是由2条相同受体Fc-融合蛋白链组成的二聚体,每条链具有通过共价二硫键连接的SEQ ID NO:169中所示的变体TACI CRD2结构域人Fc融合物。

[0325] 本文提供两个相同变体TACI-Fc融合蛋白的TACI(27)-Fc_81同二聚体,所述变体TACI-Fc融合蛋白含有SEQ ID NO:27中所示的TACI富半胱氨酸结构域2(CRD2)的变体,所述同二聚体设计为中和APRIL和BAFF的B细胞刺激活性。所述TACI(27)-Fc_81同二聚体是由2条相同受体Fc-融合蛋白链组成的二聚体,每条链具有通过共价二硫键连接的SEQ ID NO:170中所示的变体TACI CRD2结构域人Fc融合物。

[0326] 在一些实施方案中,所提供的TACI-Fc(例如变体TACI-Fc)融合蛋白(如其同二聚体)展现小于400pM的中和BAFF的IC_{50}。在一些实施方案中,中和BAFF的IC50在1pM与400pM之间,如在10pM与300pM之间、在10pM与200pM之间、在10pM与100pM之间、在10pM与50pM之间、在10pM与20pM之间、在20pM与400pM之间、在20pM与300pM之间、在20pM与200pM之间、在20pM与100pM之间、在20pM与50pM之间、在50pM与400pM之间、在50pM与300pM之间、在50pM与200pM之间、在50pM与100pM之间、在100pM与400pM之间、在100pM与300pM之间、在100pM与200pM之间、在200pM与400pM之间、在200pM与300pM之间或者在300pM与400pM之间。在一些实施方案中,中和BAFF的IC_{50}是为或约10pM、15pM、20pM、25pM、30pM、35pM、40pM、45pM、50pM、55pM、60pM、65pM、70pM、75pM、80pM、85pM、90pM、95pM或100pM,或任何前述项之间的任何值。

[0327] 在一些实施方案中,所提供的TACI-Fc(例如变体TACI-Fc)融合蛋白(如其同二聚体)展现小于400pM的中和APRIL的IC_{50}。在一些实施方案中,中和APRIL的IC50在0.5pM与

100pM之间,如在0.5pM与50pM之间、在0.5pM与25pM之间、在0.5pM与10pM之间、在0.5pM与5pM之间、在0.5pM与1pM之间、在1pM与100pM之间、在1pM与50pM之间、在1pM与25pM之间、在1pM与10pM之间、在1pM与5pM之间、在5pM与100pM之间、在5pM与50pM之间、在5pM与25pM之间、在5pM与10pM之间、在10pM与100pM之间、在10pM与50pM之间、在10pM与25pM之间、或在25pM与100pM之间、在25pM与50pM之间或者在50pM与100pM之间。在一些实施方案中,中和APRIL的IC_{50}是为或约0.5pM、0.75pM、1pM、2pM、3pM、4pM、5pM、6pM、7pM、8pM、9pM、10pM、11pM、12pM、13pM、14pM、15pM、20pM或25pM,或任何前述项之间的任何值。

III.用于产生所述多肽或细胞的核酸、载体和方法

[0328] 本文提供分离的或重组的核酸(统称为"核酸"),其编码本文提供的免疫调节蛋白中的任一种。在一些实施方案中,本文提供的核酸(包括下文所述的所有核酸)可用于本文提供的免疫调节蛋白的重组产生(例如,表达)。在一些实施方案中,本文提供的核酸(包括下文所述的所有核酸)可用于本文提供的免疫调节蛋白(如本文提供的TACI融合蛋白)的表达。本文提供的核酸可以呈RNA形式或呈DNA形式,并且包括mRNA、cRNA、重组或合成RNA和DNA,以及cDNA。本文提供的核酸通常是DNA分子,并且通常是双链DNA分子。然而,还提供了包含本发明的任何核苷酸序列的单链DNA、单链RNA、双链RNA和杂合DNA/RNA核酸或其组合。

[0329] 在一些情形中,可以将异源(非天然)信号肽添加至编码免疫调节蛋白的核酸。这可能是期望的,例如,在表达不含氨基末端信号序列的TACI融合蛋白的情形中。在一些实施方案中,信号肽是来自以下的信号肽:免疫球蛋白(如IgG重链或IgG-κ轻链)、细胞因子(如白介素-2(IL-2)或CD33)、血清白蛋白蛋白质(例如HSA或白蛋白)、人天青杀素前蛋白信号序列、萤光素酶、胰蛋白酶原(例如糜蛋白酶原或胰蛋白酶原),或者能够有效表达且在一些方面从细胞分泌蛋白质的其他信号肽。示例性信号肽包括表3中所述的任一种。

表3.示例性信号肽

SEQ ID NO	信号肽	肽序列
SEQ ID NO: 149	HSA信号肽	MKWVTFISLLFLFSSAYS
SEQ ID NO: 150	Igκ轻链	MDMRAPAGIFGFLLVLFPGYRS
SEQ ID NO: 151	人天青杀素前蛋白信号序列	MTRLTVLALLAGLLASSRA
SEQ ID NO: 152	IgG重链信号肽	MELGLSWIFLLAILKGVQC
SEQ ID NO: 153	IgG重链信号肽	MELGLRWVFLVAILEGVQC
SEQ ID NO: 154	IgG重链信号肽	MKHLWFFLLLVAAPRWVLS
SEQ ID NO: 155	IgG重链信号肽	MDWTWRILFLVAAATGAHS
SEQ ID NO: 156	IgG重链信号肽	MDWTWRFLFVVAAATGVQS
SEQ ID NO: 157	IgG重链信号肽	MEFGLSWLFLVAILKGVQC
SEQ ID NO: 158	IgG重链信号肽	MEFGLSWVFLVALFRGVQC
SEQ ID NO: 159	IgG重链信号肽	MDLLHKNMKHLWFFLLLVAAPRWVLS
SEQ ID NO: 160	IgGκ轻链信号序列:	MDMRVPAQLLGLLLLWLSGARC
SEQ ID NO: 161	IgGκ轻链信号序列:	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA
SEQ ID NO: 162	高斯(Gaussia)萤光素酶	MGVKVLFALICIAVAEA
SEQ ID NO: 163	人白蛋白	MKWVTFISLLFLFSSAYS
SEQ ID NO: 164	人糜蛋白酶原	MAFLWLLSCWALLGTTFG
SEQ ID NO: 165	人白介素-2	MQLLSCIALILALV
SEQ ID NO: 166	人胰蛋白酶原-2	MNLLLILTFVAAAVA

[0330] 在一些实施方案中,免疫调节蛋白在表达时包含信号肽,并且在分泌时从免疫调节蛋白切割所述信号肽(或其部分)。

[0331] 本文还提供可用于产生免疫调节蛋白(如本文所提供的TACI融合蛋白)的重组表达载体和重组宿主细胞。

[0332] 在上文提供的任何实施方案中,可以使用重组DNA和克隆技术将编码本文提供的免疫调节多肽的核酸引入细胞中。为此,制备编码免疫调节多肽的重组DNA分子。制备此类DNA分子的方法是本领域中熟知的。例如,可以使用合适的限制性酶从DNA切除肽的编码序列。可替代地,可以使用化学合成技术(如亚磷酰胺法)来合成DNA分子。同样,可以使用这些技术的组合。在一些情况下,重组或合成核酸可通过聚合酶链式反应(PCR)来生成。如本领域技术人员已知,可以将编码免疫调节蛋白的DNA插入物克隆至适当的转导/转染载体中。还提供含有所述核酸分子的表达载体。

[0333] 在一些实施方案中,所述表达载体能在适当细胞中在适于表达蛋白质的条件下表达免疫调节蛋白。在一些方面中,核酸分子或表达载体包含与适当表达控制序列可操作连接的编码免疫调节蛋白的DNA分子。在将DNA分子插入载体中之前或之后实现这种操作性连接的方法是熟知的。表达控制序列包括启动子、激活子、增强子、操纵子、核糖体结合位点、起始信号、终止信号、加帽信号、多腺苷酸化信号和涉及转录或翻译控制的其他信号。

[0334] 在一些实施方案中,免疫调节蛋白的表达受启动子或增强子控制,以控制或调节表达。所述启动子与核酸分子中编码变体多肽或免疫调节蛋白的部分可操作地连接。

[0335] 使用其上具有DNA分子的所得重组表达载体来转化适当宿主。该转化可以使用本领域中熟知的方法来进行。在一些实施方案中,本文提供的核酸还包含编码与编码免疫调节多肽的核酸可操作地连接的分泌或信号肽的核苷酸序列,使得从培养基、宿主细胞或宿主细胞周质中回收所得的可溶性免疫调节多肽。在其他实施方案中,选择适当的表达控制信号以允许免疫调节多肽的膜表达。此外,可商购试剂盒以及签约制造公司也可以用于制备本文提供的工程化细胞或重组宿主细胞。

[0336] 在一些实施方案中,使用其上具有DNA分子的所得表达载体来转化(如转导)适当细胞。可以使用本领域公知的方法进行引入。示例性方法包括用于转移编码受体的核酸的那些方法,包括经由病毒(例如逆转录病毒或慢病毒)、转导、转座子和电穿孔。在一些实施方案中,所述表达载体是病毒载体。在一些实施方案中,通过慢病毒或逆转录病毒转导方法将核酸转移至细胞中。

[0337] 大量公共可获得且熟知的哺乳动物宿主细胞(包括哺乳动物T细胞或APC)中的任一种可用于制备多肽或工程化细胞。细胞的选择取决于本领域中公认的多种因素。这些因素包括例如与所选表达载体的相容性、由DNA分子编码的肽的毒性、转化率、回收肽的容易性、表达特征、生物安全性和成本。要平衡这些因素,必须深入理解,并非所有细胞都可以同等有效地用于特定DNA序列的表达。

[0338] 在一些实施方案中,宿主细胞是哺乳动物细胞。合适的哺乳动物宿主细胞的例子包括非洲绿猴肾细胞(Vero;ATCC CRL 1587)、人胚肾细胞(293-HEK;ATCC CRL 1573)、幼仓鼠肾细胞(BHK-21、BHK-570;ATCC CRL 8544、ATCC CRL 10314)、犬肾细胞(MDCK;ATCC CCL 34)、中国仓鼠卵巢细胞(CHO-K1;ATCC CCL61;CHO DG44(Chasin等人,Som.Cell.Molec.Genet.12:555,1986))、大鼠垂体细胞(GH1;ATCC CCL82)、HeLa S3细胞(ATCC CCL2.2)、大鼠肝癌细胞(H-4-II-E;ATCC CRL 1548)、SV40转化猴肾细胞(COS-1;ATCC CRL 1650)以及鼠胚胎细胞(NIH-3T3;ATCC CRL 1658)。

[0339] 在一些实施方案中,所述宿主细胞可以是多种真核细胞,如酵母细胞,或哺乳动物细胞,如中国仓鼠卵巢(CHO)或HEK293细胞。在一些实施方案中,所述宿主细胞是悬浮细胞,并且多肽是在培养悬浮液中,如在培养的悬浮CHO细胞(例如,CHO-S细胞)中进行工程化或产生。在一些例子中,所述细胞系是缺乏DHFR(DHFR-)CHO细胞系,如DG44和DUXB11。在一些实施方案中,所述细胞缺乏谷氨酰胺合酶(GS),例如,CHO-S细胞、CHOK1 SV细胞和CHOZN((R))GS-/-细胞。在一些实施方案中,所述CHO细胞(如悬浮CHO细胞)可以是CHO-S-2H2细胞、CHO-S-克隆14细胞或ExpiCHO-S细胞。

[0340] 在一些实施方案中,宿主细胞也可以是原核细胞,如大肠杆菌。将转化的重组宿主在多肽表达条件下培养,然后将其纯化以获得可溶性蛋白质。可以在常规发酵条件下培养重组宿主细胞,使得表达所需多肽。这种发酵条件是本领域公知的。最后,可以通过本领域公知的许多方法中的任何一种从重组细胞培养物中回收和纯化本文提供的多肽,该方法包括硫酸铵或乙醇沉淀、酸萃取、阴离子或阳离子交换色谱法、磷酸纤维素色谱法、疏水相互作用色谱法和亲和色谱法。在完成成熟蛋白质的构型时,可以视需要使用蛋白质重折叠步骤。最后,可以在最终纯化步骤中采用高效液相色谱法(HPLC)。

[0341] 在一些实施方案中,所述重组载体是病毒载体。示例性重组病毒载体包括慢病毒载体基因组、痘病毒载体基因组、痘苗病毒载体基因组、腺病毒载体基因组、腺病毒相关病毒载体基因组、疱疹病毒载体基因组和α病毒载体基因组。病毒载体可以是活的、减毒的、有复制条件的或复制缺陷的、非致病的(有缺陷的)、可复制的病毒载体和/或经修饰以表达异源基因产物,例如本文提供的变体免疫调节多肽。用于生成病毒的载体还可以被修饰以改变病毒的衰减,其包括增加或减少转录或翻译负荷的任何方法。

[0342] 可以使用的示例性病毒载体包括经修饰的疫苗病毒载体(参见例如,Guerra等人,J.Virol.80:985-98(2006);Tartaglia等人,AIDS Research and Human Retroviruses 8:1445-47(1992);Gheradi等人,J.Gen.Virol.86:2925-36(2005);Mayr等人,Infection 3:6-14(1975);Hu等人,J.Virol.75:10300-308(2001);美国专利号5,698,530、6,998,252、5,443,964、7,247,615和7,368,116);腺病毒载体或腺病毒相关病毒载体(参见例如,Molin等人,J.Virol.72:8358-61(1998);Narumi等人,Am J.Respir.Cell Mol.Biol.19:936-41(1998);Mercier等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101:6188-93(2004);美国专利号6,143,290;6,596,535;6,855,317;6,936,257;7,125,717;7,378,087;7,550,296);逆转录病毒载体,包括基于鼠白血病病毒(MuLV)、长臂猿白血病病毒(GaLV)、亲嗜性逆转录病毒、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)、人类免疫缺陷病毒(HIV)和组合的那些(参见例如,Buchscher等人,J.Virol.66:2731-39(1992);Johann等人,J.Virol.66:1635-40(1992);Sommerfelt等人,Virology 176:58-59(1990);Wilson等人,J.Virol.63:2374-78(1989);Miller等人,J.Virol.65:2220-24(1991);Miller等人,Mol.Cell Biol.10:4239(1990);Kolberg,NIH Res.4:43 1992;Cornetta等人,Hum.Gene Ther.2:215(1991));慢病毒载体,包括基于人类免疫缺陷病毒(HIV-1)、HIV-2、猫免疫缺陷病毒(FIV)、马传染性贫血病毒、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)和梅迪/维斯纳病毒的那些(参见例如,Pfeifer等人,Annu.Rev.Genomics Hum.Genet.2:177-211(2001);Zufferey等人,J.Virol.72:9873,1998;Miyoshi等人,J.Virol.72:8150,1998;Philpott和Thrasher,Human Gene Therapy 18:483,2007;Engelman等人,J.Virol.69:2729,1995;Nightingale等人,Mol.Therapy,13:1121,2006;

Brown等人,J.Virol.73:9011(1999);WO 2009/076524;WO 2012/141984;WO 2016/011083;McWilliams等人,J.Virol.77:11150,2003;Powell等人,J.Virol.70:5288,1996)或其任何变体,和/或可以用于产生上述任何病毒的载体。在一些实施方案中,重组载体可以包括调节序列,如启动子或增强子序列,该调节序列可以调节病毒基因组(如在RNA病毒的情况下)在包装细胞系中的表达(参见例如美国专利号5,385,839和5,168,062)。

[0343] 在一些方面,核酸或表达载体包含与适当表达控制序列操作性连接的编码免疫调节蛋白的核酸序列。在编码免疫调节蛋白的核酸序列插入载体中之前或之后实现这种可操作连接的方法是公知的。表达控制序列包括启动子、激活子、增强子、操纵子、核糖体结合位点、起始信号、终止信号、加帽信号、多腺苷酸化信号和涉及转录或翻译控制的其他信号。所述启动子可以与核酸序列中编码免疫调节蛋白的部分可操作地连接。

[0344] 转录调节序列包括足以引导RNA合成的起始的启动子区域。合适的真核启动子包括小鼠金属硫蛋白I基因的启动子(Hamer等人,J.Molec.Appl Genet.1:273(1982))、疱疹病毒的TK启动子(McKnight,Cell 31:355(1982))、SV40早期启动子(Benoist等人,Nature290:304(1981))、劳斯肉瘤病毒启动子(Gorman等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 79:6777(1982))、巨细胞病毒启动子(Foecking等人,Gene 45:101(1980))以及小鼠乳瘤病毒启动子(一般参见Etcheverry,"Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture,"Protein Engineering:Principles and Practice,Cleland等人(编辑),第163-181页(John Wiley&Sons,Inc.1996))。启动子与增强子的一种有用的组合由骨髓增生性肉瘤病毒启动子和人巨细胞病毒增强子提供。

[0345] 可替代地,如果原核启动子受真核启动子调节,则所述原核启动子(如噬菌体T3RNA聚合酶启动子)可以用于控制免疫调节蛋白在哺乳动物细胞中的产生(Zhou等人,Mol Cell.Biol.10:4529(1990);以及Kaufman等人,Nucl.Acids Res.19:4485(1991))。

[0346] 可以使用多种标准技术将表达载体引入宿主细胞中,所述标准技术包括磷酸钙转染、脂质体介导的转染、微射弹介导的递送、电穿孔等。可以选择并繁殖转染的细胞以提供包含稳定整合于宿主细胞基因组中的表达载体的重组宿主细胞。用于将载体引入真核细胞中的技术以及用于使用显性可选标记物来选择这样的稳定转化体的技术例如由Ausubel(1995)以及由Murray(编辑),Gene Transfer and Expression Protocols(Humana Press1991)描述。

[0347] 例如,一种合适的可选标记物是提供对抗生素新霉素的抗性的基因。在此情形中,在新霉素型药物(如G-418等)的存在下进行选择。选择系统还可以用于增加目的基因的表达水平,所述过程被称为"扩增"。通过以下方式进行扩增:在低水平的选择剂的存在下培养转染子,然后增加选择剂的量以选择产生高水平的所引入基因的产物的细胞。合适的可扩增可选标记物是二氢叶酸还原酶,其赋予对氨甲蝶呤的抗性。还可以使用其他抗药性基因(例如,潮霉素抗性、多药抗药性、嘌呤霉素乙酰转移酶)。可替代地,可以通过诸如FACS分选或磁珠分离技术的手段使用引入改变的表型的标记物(如绿色荧光蛋白,或细胞表面蛋白(如CD4、CD8、I类MHC、胎盘碱性磷酸酶))来分选转染的细胞与未转染的细胞。

[0348] 在一些实施方案中,本文提供的多肽还可以通过合成方法来制备。固相合成是制备单独肽的优选技术,因为它是制备小肽的最划算的方法。例如,公知的固相合成技术包括保护基团、接头和固相支持体的使用以及特定的保护和去保护反应条件、接头裂解条件、清

除剂的使用以及固相肽合成的其他方面。然后可以将肽组装成如本文所提供的多肽。

IV.药物组合物

[0349] 本文提供含有任何本文所述的所提供的免疫调节蛋白(例如TACI-Fc融合蛋白)的组合物。在一些实施方案中,药物组合物包含治疗有效量的如所述的TACI-Fc融合蛋白,其作为具有药学上可接受的稀释剂、载体、增溶剂、乳化剂、防腐剂和/或佐剂的配制品提供。还提供了任何所提供的药物组合物,包括任何所提供的配制品,所述药物组合物用于治疗有需要的患者的自身免疫性或炎性疾病,如任何用于治疗如章节V中所述的此类疾病或病症的用途。还提供了通过施用任何此类药物组合物或配制品治疗有需要的患者的自身免疫性或炎性疾病的方法,如用于治疗如章节V中所述的任何疾病或病症。

[0350] 所述药物组合物还可以包含药学上可接受的赋形剂。例如,所述药物组合物可以含有一种或多种赋形剂,用于改变、维持或保持例如组合物的pH、渗透压、粘度、透明度、颜色、等渗性、气味、无菌性、稳定性、溶解或释放速率、吸附或渗透。这样的组合物可以包含缓冲液,如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等;碳水化合物,如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸,如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂,如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如,氢氧化铝);和防腐剂。

[0351] 在一些实施方案中,所述药物组合物是固体,如粉末、胶囊或片剂。例如,药物组合物的组分可以是冻干的。在一些实施方案中,在施用之前将固体药物组合物重构或溶解在液体中。

[0352] 在一些实施方案中,所述药物组合物是液体,例如溶解于水溶液(如生理盐水或林格氏溶液)中的免疫调节蛋白(例如TACI-Fc融合蛋白)。在一些实施方案中,药物组合物的pH为约4.0至约8.5(如约4.0至约5.0、约4.5至约5.5、约5.0至约6.0、约5.5至约6.5、约6.0至约7.0、约6.5至约7.5、约7.0至约8.0或约7.5至约8.5)。

[0353] 在一些实施方案中,药物组合物包含药学上可接受的赋形剂,例如填充剂、粘合剂、包衣、防腐剂、润滑剂、调味剂、甜味剂、着色剂、溶剂、缓冲剂、螯合剂或稳定剂。药学上可接受的填充剂的例子包括纤维素、磷酸氢钙、碳酸钙、微晶纤维素、蔗糖、乳糖、葡萄糖、甘露醇、山梨糖醇、麦芽酚、预胶化淀粉、玉米淀粉或马铃薯淀粉。药学上可接受的粘合剂的例子包括聚乙烯吡咯烷酮、淀粉、乳糖、木糖醇、山梨糖醇、麦芽糖醇、明胶、蔗糖、聚乙二醇、甲基纤维素或纤维素。药学上可接受的包衣的例子包括羟丙基甲基纤维素(HPMC)、虫胶、玉米蛋白玉米醇溶蛋白或明胶。药学上可接受的崩解剂的例子包括聚乙烯吡咯烷酮、羧甲基纤维素或羟基乙酸淀粉钠。药学上可接受的润滑剂的例子包括聚乙二醇、硬脂酸镁或硬脂酸。药学上可接受的防腐剂的例子包括对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸或山梨酸。药学上可接受的甜味剂的例子包括蔗糖、糖精、阿斯巴甜或山梨糖醇。药学上可接受的缓冲剂的例子包括碳酸盐、柠檬酸盐、葡糖酸盐、乙酸盐、磷酸盐或酒石酸盐。

[0354] 在某些实施方案中,药物组合物中的主要媒介物或载体的性质可以是水性或非水性的。例如,合适的媒介物或载体可以是注射用水、生理盐水溶液或缓冲盐水。在一些实施方案中,药物组合物包含pH约7.0-8.5的Tris缓冲液。在一些实施方案中,药物组合物包含pH约4.0-6.0的乙酸盐缓冲液。配制品可以含有一定浓度的缓冲液,所述缓冲液具有足够的缓冲能力以在选定的温度下维持配制品的选定pH。在各种实施方案中,缓冲溶液的浓度可

以是从约1mM至约100mM、从约2mM至约50mM、从约3mM至约30mM、从约4mM至约20mM、或从约5mM至约10mM、或从约10mM至约40mM、从约15mM至约35mM、从约20mM至约30mM、从约25mM至约35mM。

[0355] 在一些实施方案中,缓冲溶液含有如下浓度的乙酸盐:从约1mM至约100mM、从约2mM至约50mM、从约3mM至约30mM、从约4mM至约20mM、或从5mM至15mM、或从约5mM至约10mM、或从约10mM至约40mM、从约15mM至约35mM、从约20mM至约30mM、从约25mM至约35mM。在一些实施方案中,缓冲溶液含有浓度为从5mM至15mM的乙酸盐。在一些实施方案中,缓冲溶液含有如下浓度的乙酸盐:为或约5mM、为或约6mM、为或约7mM、为或约8mM、为或约9mM、为或约10mM、为或约11mM、为或约12mM、为或约13mM、为或约14mM或者为或约15mM,或任何前述项之间的任何值。在一些实施方案中,缓冲溶液含有浓度为或约5mM的乙酸盐。在一些实施方案中,缓冲溶液含有浓度为或约10nM的乙酸盐。在一些实施方案中,缓冲溶液含有浓度为或约12mM的乙酸盐。在一些实施方案中,缓冲溶液含有浓度为或约15mM的乙酸盐。乙酸(乙酸盐)缓冲液和/或最终配制品的示例性pH范围可以包括如下pH范围:在约4.0至约6.0之间、在约4.5至约5.5之间、在约4.8至约5.2或约5.0之间。因此,乙酸(乙酸盐)缓冲液和/或最终配制品可以被制备成具有如下pH:约4.0、约4.5、约4.8、约5.0、约5.2、约5.5、约5.7或约6.0,或任何前述项之间的任何值。在一些实施方案中,缓冲溶液的pH是为或约5.0。在一些实施方案中,缓冲溶液的pH是为或约5.2。在一些实施方案中,缓冲溶液的pH是为或约5.5。本领域技术人员可以确定配制品中乙酸(乙酸盐)缓冲液的pH。

[0356] 在某些实施方案中,可接受的配制品材料在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒。在某些实施方案中,药物组合物可以含有用于改良、维持或保持例如组合物的pH、摩尔渗透压浓度、粘度、澄清度、颜色、等渗性、气味、无菌度、稳定性、溶解或释放速率、吸附或渗透的配制材料。在此类实施方案中,合适的配制材料包括但不限于氨基酸(如脯氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸);抗微生物剂;抗氧化剂(如抗坏血酸、亚硫酸钠或亚硫酸氢钠);缓冲液(如乙酸盐、硼酸盐、碳酸氢盐、Tris-HCl、柠檬酸盐、磷酸盐或其他有机酸);膨胀剂(如甘露醇或甘氨酸);螯合剂(如乙二胺四乙酸(EDTA));络合剂(如咖啡因、聚乙烯吡咯烷酮、β-环糊精或羟丙基-β-环糊精);填充剂;单糖;二糖;和其他碳水化合物(如葡萄糖、甘露糖或糊精);蛋白质(如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白);着色剂;调味剂和稀释剂;乳化剂;亲水性聚合物(如聚乙烯吡咯烷酮);低分子量多肽;成盐抗衡离子(如钠);防腐剂(如苯扎氯铵、苯甲酸、水杨酸、硫柳汞、苯乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、氯己定、山梨酸或过氧化氢);溶剂(如丙三醇、丙二醇或聚乙二醇);糖醇(如甘露醇或山梨醇);悬浮剂;表面活性剂或润湿剂(如普朗尼克(pluronics)、PEG、脱水山梨醇酯、聚山梨醇酯(如聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80)、曲通(triton)、氨丁三醇、卵磷脂、胆固醇、泰洛沙泊(tyloxapal));稳定性增强剂(如蔗糖或山梨醇);张力增强剂(如碱金属卤化物(优选氯化钠、氯化钾)、甘露醇山梨醇);递送媒介物;稀释剂;赋形剂和/或药物佐剂。参见,REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES,18″版,(A.R.Genrmo编辑),1990,Mack Publishing Company。

[0357] 游离氨基酸(如但不限于赖氨酸、脯氨酸、丝氨酸和丙氨酸)可以作为膨胀剂、稳定剂和抗氧化剂用于稳定所提供的配制品中的蛋白质,以及用于其他标准用途。在一些实施方案中,游离氨基酸以约1%至约10%或2%至5%的浓度存在于配制品中。

[0358] 在一些实施方案中,配制品含有脯氨酸作为游离氨基酸。在一些实施方案中,所提供的配制品含有浓度为约1%至约10%的脯氨酸。在一些实施方案中,所提供的配制品含有浓度为约2%至约5%的脯氨酸。在一些实施方案中,所提供的配制品含有如下浓度的脯氨酸:为或约1%、为或约2%、为或约3%、为或约4%、为或约5%、为或约6%、为或约7%、为或约8%、为或约9%、为或约10%,或任何前述项之间的任何值。在一些实施方案中,所提供的配制品含有浓度为或约2%的脯氨酸。在一些实施方案中,所提供的配制品含有浓度为或约3%的脯氨酸。在一些实施方案中,所提供的配制品含有浓度为或约4%的脯氨酸。

[0359] 所提供的配制品还可以进一步包含表面活性剂。蛋白质分子可以易于吸附在表面上,并且易于在气-液、固-液和液-液界面处变性和随后聚集。这些效应通常与蛋白质浓度成反比。在一些情况下,物理搅动(如在产品的运输和处理期间产生的物理搅动)可能加剧这种效应。表面活性剂可以用于防止、最小化或减少表面吸附。可以选择包含在配制品中的表面活性剂,例如,以通过防止或减少聚集和/或吸附来增强或促进蛋白质分子稳定性的保持。脱水山梨醇脂肪酸酯如聚山梨醇酯是展现广泛范围的亲水和乳化特征的表面活性剂。它们可以单独使用或与其他表面活性剂组合使用,以覆盖广泛范围的稳定需要。这样的特征可以适合于与活性蛋白质药剂一起使用,因为它们可以被定制以覆盖广泛范围的生物医药的疏水和亲水特征。有用的表面活性剂包括但不限于聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80、脱水山梨醇聚乙氧基化物的其他脂肪酸酯和泊洛沙姆188。

[0360] 所提供的配制品的表面活性剂浓度可以小于约1%(w/v)。在这一方面,表面活性剂浓度通常可以以如下范围使用:在0.001%-0.10%(w/v)之间、在约0.001%-0.05%(w/v)之间、在约0.001%-0.025%(w/v)之间、在约0.001%-0.01%(w/v)之间、在约0.005%-0.10%之间、在约0.005%-0.05%之间、在约0.005%-0.025%之间、在约0.005%-0.01%之间、在约0.01%-0.10%之间、在约0.01%-0.05%之间、或在约0.01%至0.025%之间。也可以使用小于、大于这些范围或在这些范围之间的表面活性剂浓度和/或量。因此,可以产生含有基本上任何所需浓度或量的一种或多种表面活性剂的配制品,所述浓度或量包括例如约0.001%(w/v)、0.002%(w/v)、0.003%(w/v)、0.004%(w/v)、0.005%(w/v)、0.006%(w/v)、0.007%(w/v)、0.008%(w/v)、0.009%(w/v)、0.010%(w/v)、0.015%(w/v)、0.02%(w/v)、0.025%(w/v)、0.03%(w/v)、0.04%(w/v)、0.05%(w/v)、0.06%(w/v)、0.07%(w/v)、0.08%(w/v)、0.09%(w/v)或0.10%(w/v),或任何前述项之间的任何值。

[0361] 在一些实施方案中,所述表面活性剂是聚山梨醇酯80。在一些实施方案中,配制品中聚山梨醇酯80的浓度是在约0.001%-0.10%(w/v)之间、在约0.001%-0.05%(w/v)之间、在约0.001%-0.025%(w/v)之间、在约0.001%-0.01%(w/v)之间、在约0.005%-0.10%之间、在约0.005%-0.05%之间、在约0.005%-0.025%之间、在约0.005%-0.01%之间、在约0.01%-0.10%之间、在约0.01%-0.05%之间或在约0.01%至0.025%之间。在一些实施方案中,聚山梨醇酯80以如下浓度存在:0.001%(w/v)、0.002%(w/v)、0.003%(w/v)、0.004%(w/v)、0.005%(w/v)、0.006%(w/v)、0.007%(w/v)、0.008%(w/v)、0.009%(w/v)、0.010%(w/v)、0.015%(w/v)、0.02%(w/v)、0.025%(w/v)、0.03%(w/v)、0.04%(w/v)、0.05%(w/v)、0.06%(w/v)、0.07%(w/v)、0.08%(w/v)、0.09%(w/v)或0.10%(w/v),或任何前述项之间的任何值。在一些实施方案中,聚山梨醇酯80的浓度是为或约0.010%(w/v)。在一些实施方案中,聚山梨醇酯80的浓度是为或约0.015%(w/v)。在一

些实施方案中,聚山梨醇酯80的浓度是为或约0.02％(w/v)。

[0362] 在一些实施方案中,所述药物组合物还包含用于产物的受控释放或持续释放的药剂,如可注射微球、生物可侵蚀颗粒、聚合化合物(聚乳酸、聚乙醇酸)、珠或脂质体。

[0363] 在一些实施方案中,所述药物组合物是无菌的。灭菌可以通过经由无菌滤膜过滤或辐射来完成。在冻干组合物的情况下,可以在冻干和重构之前或之后使用该方法进行灭菌。用于肠胃外施用的组合物可以以冻干形式或溶液形式储存。此外,通常肠胃外组合物通常置于具有无菌进入口的容器中,例如具有可由皮下注射针刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶。

[0364] 药学上可接受的载体可以是药学上可接受的材料、组合物或媒介物。例如,所述载体可以是液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包封材料,或其一些组合。载剂的每一组分必须是“药学上可接受的”,因为其必须与配制品中的其他成分相容。它还必须适于与它可能遇到的身体的任何组织、器官或部分接触,这意味着它不得带有毒性、刺激、变态反应、免疫原性或过多超出其治疗益处的任何其他并发症的风险。

[0365] 在一些实施方案中,药物组合物被配制为含有如下量的TACI-Fc融合物:从为或约1mg至为或约100mg,如从为或约1mg至为或约75mg、从为或约1mg至为或约50mg、从为或约1mg至为或约25mg、从为或约1mg至为或约10mg、从为或约1mg至为或约5mg、从为或约5mg至为或约100mg、从为或约5mg至为或约75mg、从为或约5mg至为或约50mg、从为或约5mg至为或约25mg、从为或约5mg至为或约10mg、从为或约10mg至为或约100mg、从为或约10mg至为或约75mg、从为或约10mg至为或约50mg、从为或约10mg至为或约25mg、从为或约25mg至为或约100mg、从为或约25mg至为或约75mg、从为或约25mg至为或约50mg、从为或约50mg至为或约100mg、从为或约50mg至为或约75mg或从为或约75mg至为或约100mg。在一些实施方案中,药物组合物被配制为含有如下量的TACI-Fc融合蛋白:为或约10mg、为或约20mg、为或约25mg、为或约30mg、为或约40mg、为或约50mg、为或约60mg、为或约70mg、为或约75mg、为或约80mg或为或约100mg,或任何前述项之间的任何值。在一些实施方案中,药物组合物被配制成含有为或约80mg的量的TACI-Fc融合蛋白。

[0366] 在一些实施方案中,药物组合物被配制在如下体积中:从为或约0.5mL至为或约10mL,如从为或约0.5mL至为或约5mL、从为或约0.5mL至为或约2mL、从为或约0.5mL至为或约1mL、从为或约1mL至为或约10mL、从为或约1mL至为或约5mL或从为或约5mL至为或约10mL。在一些实施方案中,药物组合物被配制在如下体积中:为或约0.5mL、为或约1mL、为或约2mL、为或约2.5mL、为或约3mL、为或约4mL、为或约5mL、为或约6mL、为或约7mL、为或约8mL、为或约9mL或为或约10mL。在一些实施方案中,组合物被配制成如下体积:为或约0.5mL、0.6mL、0.7mL、0.8mL、0.9mL、1.0mL、1.2mL、1.4.mL、1.6mL、1.8mL或2.0mL,或任何前述项之间的任何值。

[0367] 在一些实施方案中,组合物中TACI-Fc融合蛋白的浓度是从为或约1mg/mL至为或约50mg/mL,如从为或约1mg/mL至为或约25mg/mL、从为或约1mg/mL至为或约15mg/mL、从为或约1mg mL至为或约5mg/mL、从为或约5mg/mL至为或约50mg/mL、从为或约5mg/mL至为或约25mg/mL、从为或约5mg/mL至为或约15mg/mL、从为或约15mg/mL至为或约50mg/mL、从为或约15mg/mL至为或约25mg/mL或从为或约25mg/mL至为或约50mg/mL。在一些实施方案中,组合物中TACI-Fc融合蛋白的浓度是为或约1mg/mL、为或约5mg/mL、为或约10mg/mL、为或约

15mg/mL、为或约20mg/mL、为或约25mg/mL、为或约30mg/mL、为或约40mg/mL或为或约50mg/mL。本文提供了包含在容器(如小瓶)中的任何此类组合物。在特定方面,容器(如小瓶)是无菌的。容器可以是任何生物相容性容器,如玻璃容器。在一些实施方案中,小瓶是2mL玻璃小瓶。

[0368] 在一些实施方案中,组合物中TACI-Fc融合蛋白的浓度高于50mg/mL。在一些实施方案中,组合物的浓度是在为或约50mg/mL与200mg/mL之间,如在为或约50mg/mL与150mg/mL之间、在为或约50mg/mL与100mg/mL之间、在为或约100mg/mL与200mg/mL之间、在为或约100mg/mL与150mg/mL或在为或约150mg/mL与200mg/mL之间。在一些实施方案中,组合物中TACI-Fc融合蛋白的浓度是为或约60mg/mL、为或约70mg/mL、为或约80mg/mL、为或约100mg/mL、为或约120mg/mL、为或约140mg/mL、为或约160mg/mL、为或约180mg/mL或为或约200mg/mL,或任何前述项之间的任何值。在一些实施方案中,组合物中TACI-Fc融合蛋白的浓度是为或约100mg/mL。本文提供了包含在容器(如小瓶)中的任何此类组合物。在特定方面,容器(如小瓶)是无菌的。容器可以是任何生物相容性容器,如玻璃容器。在一些实施方案中,小瓶是2mL玻璃小瓶。

[0369] 在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白(如任何所述的)被配制在pH为5.2的含有10mM乙酸盐、3%脯氨酸、0.015%聚山梨醇酯80的缓冲溶液中。在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白以100mg/mL作为注射用液体(例如IV或SC)提供。在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白以为或约8mL(例如80mg)的体积提供于容器(如2mL玻璃小瓶)中。

[0370] 在所提供的配制品的一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白是式TACI-接头-Fc的两个多肽的同二聚体,其中TACI是变体TACI,所述变体TACI是由SEQ ID NO:13中所示的CRD2 TNF受体结构域组成的细胞外结构域的一部分,其中存在氨基酸取代K77E、F78Y和Y102D。在一些实施方案中,所述变体TACI示于SEQ ID NO:26中。在任何所述TACI-Fc融合蛋白的实施方案中,所述变体TACI经由所述接头与所述Fc结构域连接。在一些任何所提供的方法或用途中,TACI-Fc融合蛋白具有SEQ ID NO:167中所示的序列。在一些任何实施方案中,TACI-Fc融合蛋白具有SEQ ID NO:168中所示的序列。

[0371] 在一些任何实施方案中,当以小于100mg/mL的浓度施用TACI-Fc融合蛋白或含有TACI-Fc融合蛋白的配制品时,可以将其在生理上可接受的缓冲液如0.9%氯化钠(生理盐水)中稀释。

[0372] 一旦已经配制药物组合物,可以将其作为溶液、悬浮液、凝胶、乳液、固体、晶体或作为脱水或冻干粉末储存在无菌小瓶中。可以将此类配制品以即用形式或以在施用前重构的形式(例如,冻干)储存。本文还提供了用于产生单剂量施用单位的试剂盒。在一些方面,试剂盒可以各自含有具有干燥蛋白质的第一容器和具有水性配制品的第二容器二者。在某些实施方案中,提供了含有单室和多室预填充注射筒(例如,液体注射筒和冻干注射筒)的试剂盒。

[0373] 在一些实施方案中,药物组合物如任何所提供的配制品在为或约-20℃下稳定长达6个月或更长时间,如长达12个月或更长时间。在一些实施方案中,将药物组合物在为或约-20℃下储存。在一些实施方案中,在如下条件下进行储存:TACI-Fc融合蛋白的配制品避免光照。

[0374] 在一些实施方案中,将药物组合物施用至受试者。通常,根据标准药学实践,根据

受试者的体型和状况确定药物组合物的剂量和施用途径。例如,最初可以在细胞培养测定中或在动物模型如小鼠、大鼠、兔、狗、猪或猴中估算治疗有效剂量。动物模型还可以用于确定适当的浓度范围和施用途径。所述信息随后可用于确定在人中的可用剂量和施用途径。确切剂量将根据与需要治疗的受试者相关的因素来确定。调整剂量和施用以提供足够水平的活性化合物或以维持所需效果。可以考虑的因素包括疾病状态的严重程度、受试者的一般健康状况、受试者的年龄、体重和性别、施用的时间和频率、一种或多种药物组合、反应敏感性以及对疗法的反应。

[0375] 长效药物组合物可以根据特定制剂的半衰期和清除率每3至4天、每周或每两周施用一次。给药频率将取决于所用制剂中分子的药代动力学参数。通常,施用组合物直至达到实现所需效果的剂量。因此,组合物可以以单一剂量的方式施用,或随时间以多剂量(以相同或不同的浓度/剂量)的方式施用,或以连续输注的方式施用。常规地对合适的剂量做出进一步改进。可以通过使用适当的剂量反应数据来确定适当的剂量。

[0376] 在一些实施方案中,通过任何途径向受试者施用所述药物组合物,包括口服、透皮、通过吸入、静脉内、动脉内、肌内、直接应用于伤口部位、应用于外科手术部位、腹膜内、通过栓剂、皮下、皮内、经皮、通过雾化、胸膜内、心室内、关节内、眼内或脊柱内。

[0377] 在一些实施方案中,所提供的药物配制品可以例如呈适于静脉内输注的形式。在一些实施方案中,所提供的配制品可以呈适合于皮下施用的形式。

V.用于评估免疫调节蛋白的活性和免疫调节的方法

[0378] 在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白(如本文提供的TACI融合蛋白)展现免疫调节活性。所提供的免疫调节蛋白(如TACI融合蛋白)可以调节B细胞活性,如B细胞增殖、分化或存活中的一种或多种。

[0379] 可以使用多种方法检查免疫调节蛋白的功能以评估所述蛋白质与同源结合配偶体结合的能力。例如,可以评估TACI融合蛋白与APRIL或BAFF的结合。已知多种测定用于评估结合亲和力和/或确定结合分子(例如,免疫调节蛋白)是否与特定结合配偶体特异性结合。技术人员可以熟练地确定结合分子(例如,免疫调节蛋白)对结合配偶体(例如,APRIL或BAFF)的结合亲和力,如通过使用本领域中熟知的多种结合测定中的任一种。各种结合测定是已知的并且包括但不限于例如ELISA K_D、KinExA、流式细胞术和/或表面等离子体共振装置,包括本文所述的那些。此类方法包括但不限于涉及BIAcore®、Octet®或流式细胞术的方法。例如,在一些实施方案中,BIAcore®仪器可以用于使用表面等离子体共振(SPR)分析确定两种蛋白质之间的复合物的结合动力学和常数(参见例如,Scatchard等人,Ann.N.Y.Acad.Sci.51:660,1949;Wilson,Science 295:2103,2002;Wolff等人,Cancer Res.53:2560,1993;以及美国专利号5,283,173、5,468,614或等同物)。在分子结合至表面或从表面解离时,SPR测量传感器表面处分子浓度的变化。SPR信号的变化与靠近表面的质量浓度变化成正比,从而允许测量两个分子之间的结合动力学。可以通过监测当缓冲液通过芯片时折射率相对于时间的变化来确定复合物的解离常数。用于测量一种蛋白质与另一种蛋白质的结合的其他合适的测定包括例如免疫测定(如酶联免疫吸附测定(ELISA)和放射免疫测定(RIA))或通过借助荧光、紫外吸收、圆二色性或核磁共振(NMR)监测蛋白质的光谱或光学性质的变化来确定结合。其他示例性测定包括但不限于蛋白质印迹、ELISA、分析型超速离心、光谱法、流式细胞术、测序和用于检测所表达的多核苷酸或蛋白质结合的其他

方法。

[0380] 还可以在多种评估中的任一种中评估所提供的免疫调节蛋白以评估对B细胞活性的调节。一种这样的测定是细胞增殖测定。在存在或不存在测试化合物(例如免疫调节蛋白)的情况下培养细胞,并且通过例如测量含氚胸苷的掺入或基于3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基溴化四氮唑(MTT)的代谢分解通过比色测定来检测细胞增殖(Mosman,J.Immunol.Meth.65:55-63,1983)。替代性测定形式使用进一步工程化以表达报告基因的细胞。所述报告基因与对受体连锁途径有反应的启动子元件连接,并且所述测定检测对所述报告基因转录的激活。在细胞提取物中易于测定的多种报告基因是本领域中已知的,例如,大肠杆菌lacZ、氯霉素乙酰转移酶(CAT)和血清应答元件(SRE)(参见例如,Shaw等人,Cell 56:563-72,1989)。示例性报告基因是萤光素酶基因(de Wet等人,Mol.Cell.Biol.7:725,1987)。使用本领域已知的方法通过发光检测萤光素酶基因的表达(例如,Baumgartner等人,J.Biol.Chem.269:29094-101,1994;Schenborn和Goiffin,Promega Notes41:11,1993)。萤光素酶活性测定试剂盒可从例如Promega Corp.(威斯康星州麦迪逊市)商购。

[0381] 所提供的免疫调节蛋白的特征可以是抑制可溶性APRIL或BAFF对人B细胞的刺激的能力,如由Gross等人在国际公开号WO 00/40716中所述。简言之,将人B细胞从外周血单个核细胞分离,如使用CD19磁珠分离(例如Miltenyi Biotec Auburn,加利福尼亚州)。可以将纯化的B细胞在刺激的条件下(例如在可溶性APRIL的存在下)孵育,并进一步在逐步调整浓度的免疫调节蛋白的存在下孵育。所述B细胞可以用增殖染料来标记,或者可以用1μCi ^{3}H-胸苷来标记,以测量增殖。可以随时间确定B细胞的数量。

[0382] 可以制备在转录因子(如NF-κB、NFAT-1和AP-1)的可操作控制下表达报告基因的报告细胞系,其表达TACI或BCMA。例如,报告细胞可以包括Jurkat和其他B淋巴瘤细胞系。这些细胞与可溶性BAFF或APRIL配体一起孵育经由这些构建体中的报告基因发信号。可以评估所提供的免疫调节蛋白调节该信号传导的作用。

[0383] 可获得完善的动物模型来测试所提供的免疫调节蛋白在某些疾病状态(包括涉及自身免疫性或炎性病症的那些)中的体内功效。例如,自身免疫性疾病的动物模型包括例如MRL-lpr/lpr或NZB×NZW F1同类系小鼠品系,其用作SLE(系统性红斑狼疮)的模型。这样的动物模型是本领域中已知的,参见例如Autoimmune Disease Models AGuidebook,Cohen和Miller编辑Academic Press。新西兰黑色(NZB)与新西兰白色(NZW)小鼠之间杂交的后代发生自发形式的SLE,它与人SLE非常相似。称为NZBW的后代小鼠在1月龄时开始产生针对T细胞的IgM自身抗体,并且截至5-7月龄,Ig抗DNA自身抗体为显性免疫球蛋白。多克隆B细胞过度活跃导致自身抗体的过多产生。这些自身抗体、特别是针对单链DNA的自身抗体的沉积与肾小球肾炎的发展相关,肾小球肾炎在临床上表现为蛋白尿、氮质血症和因肾衰竭而死亡。肾脏衰竭是受自发性SLE影响的小鼠的首要死因,并且在NZBW品系中,这个过程是慢性的和闭塞的。所述疾病在雌性中比在雄性中更快且更严重,平均存活时间仅为245天,与之相比,雄性为406天。尽管许多雌性小鼠截至7-9月龄将有症状(蛋白尿),但是一些雌性小鼠在出现症状时可能显著更年轻或更年老。在NZBW小鼠中见到的致命的免疫肾炎与在人SLE中见到的肾小球肾炎非常相似,使得这种自发性鼠模型对于测试潜在的SLE治疗药非常有吸引力(Putterman和Naparstek,Murine Models of Spontaneous Systemic Lupus Erythematosus,Autoimmune Disease Models:A Guidebook,第14章,第217-34页,1994;

Mohan等人,J.Immunol.154:1470-80,1995;以及Daikh等人,J.Immunol.159:3104-08,1997)。可以评估将所提供的免疫调节蛋白施用至这些小鼠以评价改善症状的功效和对病程的改变。

[0384] 炎症和狼疮样疾病的另一种小鼠模型是bm12诱导性小鼠SLE模型(Klarquist和Janssen,2015.J.Vis.Exp.(105),e53319)。来自雌性I-A^{bm12}B6(C)-H2-$Ab1^{bm12}$/KhEgJ("bm12")小鼠的脾细胞悬浮液过继转移至雌性C57BL/6NJ受体小鼠中。H2-$Ab1^{bm12}$与H2-$Ab1^{b}$相差3个核苷酸,导致MHC II类I-A分子的β链中3个氨基酸的改变。受体抗原呈递细胞对供体bm12 CD4+T细胞的同种激活导致慢性GVHD,其症状与SLE非常相似,包括自身抗体产生、免疫细胞子集的变化以及轻度肾脏疾病。具有免疫复合物沉积的肾小球肾炎在所述模型中较晚出现,主要由与IgG1、IgG2b、IgG2c和IgG3抗体结合的自身抗原构成。该模型的终点可以包括抗dsDNA抗体的浓度、选择IgG同种型、血尿素氮(BUN)、和血清中的肌酐、脾脏和子宫颈LN中的免疫细胞子集组成,以及肾脏组织学。

[0385] 在一些实施方案中,可以使用舍格伦综合征(SjS)的小鼠模型。可以基于由Zhou等人,2016Sci.Rep.6,39105所公开方案的修改形式,使用抗小鼠(m)PD-L1抗体的重复给药,在雌性的易患糖尿病的非肥胖糖尿病(NOD)小鼠中诱导SjS疾病以及糖尿病的加速发作。在6周龄开始,在研究第0天、第2天、第4天和第6天,向小鼠腹膜内(IP)注射100μg抗PD-L1抗体,并在不同天数用所提供的免疫调节蛋白治疗所述小鼠。包括未处理小鼠作为终点分析的对照。通常在研究第10天处死所有小鼠,并且从每只小鼠收集下颌下腺(SMG)和胰腺用于组织病理学评价,以评估涎腺炎和胰岛炎的体征和严重性。可以在不同天数测量血糖水平。

[0386] 在一些实施方案中,可以使用实验性变态反应性脑脊髓炎(EAE)的小鼠模型。所述模型类似于人多发性硬化,并且由于对神经蛋白如髓鞘碱性蛋白(MBP)或蛋白脂质蛋白(PLP)的T细胞激活而发生脱髓鞘作用。用抗原接种导致诱导CD4+II类MHC限制性T细胞(Th1)。用于EAE的方案的变化可以产生模型的急性、慢性复发性或被动传递变体(Weinberg等人,J.Immunol.162:1818-26,1999;Mijaba等人,Cell.Immunol.186:94-102,1999;以及Glabinski,Meth.Enzym.288:182-90,1997)。可以评估施用所提供的免疫调节蛋白以改善症状和对病程的改变。

[0387] 在一些实施方案中,可以使用胶原诱发关节炎(CIA)模型,其中小鼠患上慢性炎性关节炎,它与人类风湿性关节炎(RA)非常相似。由于CIA与RA共有类似的免疫和病理学特征,这使其成为用于筛选潜在的人抗炎性化合物的理想模型。使用CIA模型的另一个优点在于,发病机制是已知的。已经鉴定出II型胶原上的T细胞和B细胞表位,并且已经确定与免疫介导的关节炎相关的各种免疫学(延迟型超敏反应和抗胶原抗体)和炎性(细胞因子、趋化因子和基质降解酶)参数,并且它们可以用于评估测试化合物在所述模型中的功效(Wooley,Curr.Opin.Rheum.3:407-20,1999;Williams等人,Immunol.89:9784-788,1992;Myers等人,Life Sci.61:1861-78,1997;以及Wang等人,Immunol.92:8955-959,1995)。可以评估施用所提供的免疫调节蛋白以改善症状和对病程的改变。

[0388] 在一些实施方案中,可以在小鼠被注射卵白蛋白并用抗原经鼻再刺激(其在支气管中产生类似于哮喘的哮喘性反应)时,创建支气管感染(如哮喘)的模型。可以评估施用所提供的免疫调节蛋白以改善症状和对病程的改变。

[0389] 在一些实施方案中,重症肌无力(MG)是另一种可针对其获得鼠模型的自身免疫性

疾病。MG是一种神经肌肉传递障碍,其涉及针对烟碱型乙酰胆碱受体(AChR)的自身抗体的产生。MG是获得性或遗传性的,其临床特征包括在体力活动时异常的乏力和疲劳。已经建立MG小鼠模型。(Christadoss等人,Establishment of a Mouse Model of Myasthenia Gravis Which Mimics Human Myasthenia Gravis Pathogenesis for Immune Intervention,Immunobiology of Proteins and Peptides VIII,Atassi和Bixler编辑,1995,第195-99页。)实验性自身免疫性重症肌无力(EAMG)是一种抗体介导的疾病,其特征为针对AChR的抗体的存在。这些抗体破坏所述受体,导致神经肌肉电脉冲缺陷,从而导致肌无力。在EAMG模型中,用烟碱型乙酰胆碱受体对小鼠进行免疫。MG的临床体征在第二次免疫后数周变得明显。通过若干种方法评价EAMG,包括通过放射免疫测定测量AChR抗体的血清水平(Christadoss和Dauphinee,J.Immunol.136:2437-40,1986;以及Lindstrom等人,Methods Enzymol.74:432-60,1981)、测量肌肉AChR或肌电描记术(Wu等人Protocols in Immunology.第3卷,编辑Coligen,Kruisbeak,Margulies,Shevach和Strober.John Wiley and Sons,New York,第15.8.1页,1997)。

[0390] 体内模型的另一种用途包括将抗原激发递送至动物,之后施用免疫调节蛋白并测量T细胞和B细胞应答。可以如Perez-Melgosa等人,J.Immunol.163:1123-7,1999中所述来测量T细胞依赖型和非T细胞依赖性免疫应答。可以进行经历常规抗原激发(例如,钥孔血蓝蛋白(KLH)、绵羊红细胞(SRBC)、卵白蛋白或胶原)之后施用所提供的免疫调节蛋白的动物中的免疫应答以测量对B细胞应答的作用。

[0391] 可以使用药代动力学研究与放射性标记的免疫调节蛋白结合来确定这样的多肽在体内的分布和半衰期。

[0392] 在一些实施方案中,可以使用在对照动物和疾病的动物模型(例如,癌症模型)中观察到的药代动力学(PK)和药效动力学(PD)概况的建模和模拟来预测或确定患者给药。例如,可以使用来自非人灵长类动物(例如,食蟹猴)的PK数据来估计人PK。类似地,可以使用小鼠PK和PD数据来预测人给药。可以使用观察到的动物数据来为计算模型提供信息,所述计算模型可以用于模拟人剂量反应。

VI.治疗性应用

[0393] 本文所述的药物组合物(包括包含本文所述的免疫调节蛋白(例如TACI-Fc)的药物组合物)可以用于多种治疗性应用(如疾病的治疗方法)中。药物组合物的治疗性应用包括任何所提供的配制品的方法和用途。例如,在一些实施方案中,药物组合物(如任何所提供的配制品)用于治疗哺乳动物的炎性或自身免疫性障碍、癌症、器官移植、病毒感染和/或细菌感染。药物组合物(如任何所提供的配制品)可以调节(例如降低)免疫应答以治疗疾病。

[0394] 这样的方法和用途包括治疗性方法和用途,例如,其设计将分子或含有所述分子的组合物施用至患有疾病、病症或障碍的受试者。在一些情形中,如所述,所述疾病、病症或障碍是自身免疫性或炎性疾病或障碍。在一些实施方案中,以实现所述疾病或障碍的治疗的有效量施用所述分子或工程化细胞。用途包括含有免疫调节蛋白的分子的用途,以及在制备药物以执行这样的治疗性方法中的用途。在一些实施方案中,通过将所提供的免疫调节蛋白或包含其的组合物施用至患有或怀疑患有疾病或病症的受试者来进行所述方法。在一些实施方案中,所述方法由此治疗受试者的疾病、障碍或病症或障碍。

[0395] 说明性受试者包括哺乳动物受试者,如耕畜、家畜和人患者。在特定实施方案中,所述受试者是人受试者。

[0396] 本文所述药物组合物可用于多种治疗性应用中,例如疾病的治疗。例如,在一些实施方案中,药物组合物用于治疗哺乳动物的炎性或自身免疫性障碍、器官移植、病毒感染和/或细菌感染。药物组合物可调节免疫应答以治疗疾病。在一些实施方案中,药物组合物抑制免疫应答,其可用于炎性或自身免疫性障碍的治疗或器官移植中。

[0397] 据信所提供的方法可用于多种应用中,包括但不限于例如用于治疗哺乳动物的多种免疫系统疾病或病症的预防性或治疗性方法中,在所述疾病或病症中免疫系统和免疫系统反应的调节或调控是有益的。例如,阻抑免疫应答在预防性和/或治疗性方法中可以是有益的,用于抑制受体对来自供体的组织、细胞或器官移植物的排斥。在治疗性情况中,哺乳动物受试者通常是患有免疫系统疾病或病症的受试者,并且实施施用以防止疾病或病症的进一步进展。

[0398] 所提供的免疫调节蛋白(包括TACI融合蛋白)可以用于以下疾病的治疗:自身免疫性疾病、B细胞癌、免疫调节、EBD和任何抗体介导的病状(例如,ITCP、重症肌无力等)、肾病、间接T细胞免疫应答、移植物排斥以及移植物抗宿主病。免疫调节蛋白(例如TACI-Fc)的施用可以在免疫应答期间特异性调节B细胞应答。另外,所提供的免疫调节蛋白的施用可以用于调节B细胞发育、其他细胞的发育、抗体产生和细胞因子产生。所提供的免疫调节蛋白的施用或使用还可以调节B细胞通信,如通过中和BAFF或APRIL的增殖效应。

[0399] 在一些实施方案中,药物组合物抑制免疫应答,其可用于炎性或自身免疫性障碍的治疗或器官移植中。在一些实施方案中,药物组合物含有展现对B细胞刺激性受体的拮抗剂活性的免疫调节蛋白,从而降低或减少免疫应答。在一些实施方案中,组合物可以用于治疗B细胞介导的疾病。

[0400] 在一些实施方案中,组合物可用于治疗自身免疫性疾病。在一些实施方案中,将含有本文提供的免疫调节蛋白的治疗组合物施用至患有免疫系统疾病(例如,自身免疫性疾病)的受试者可以导致对这样的免疫系统攻击或与其相关的生物反应的阻抑或抑制。通过抑制对健康身体组织的这种免疫系统攻击,可减少或缓解因针对健康组织的所述攻击所致或与所述攻击相关的所得物理症状(例如,疼痛、关节炎症、关节肿胀或压痛),并且可减少、减缓或停止因免疫系统攻击所致或与所述攻击相关的生物和物理损伤。在预防性情况下,受试者可以是患有、易患或被认为呈现免疫系统疾病、障碍或病症的受试者,并且通常实施施用以防止疾病、障碍或病症进展,抑制或缓解与其相关的症状、体征或生物反应,防止可能由其造成的身体损伤,和/或维持或改善受试者的身体机能。

[0401] 在一些实施方案中,可以通过本文所述的药物组合物治疗的疾病或病症是通过以下介导的任何疾病:免疫复合物沉积(例如狼疮性肾炎、血管炎);对途经的直接干扰(例如灾难性抗磷脂抗体综合征、重症肌无力危象;抗Jo-1病);对细胞的调理作用或直接损伤(例如特发性血小板减少性紫癜、自身免疫性溶血性贫血);抗体介导的对同种异体移植物的排斥(例如高度敏化的肾移植患者);或者针对生物替代因子、载体的抗药抗体(例如抗因子8)。

[0402] 在一些实施方案中,可以通过本文所述的药物组合物治疗的炎性或自身免疫性障碍、病症或疾病是系统性红斑狼疮(SLE),包括不使用糖皮质激素的爆发预防;舍格伦综合

征;原发性胆汁性肝硬化(PBC);系统性硬皮病;多发性肌炎;糖尿病预防;IgA肾病;IgA血管炎;B细胞癌,例如骨髓瘤;多发性硬化、视神经炎。

[0403] 在一些实施方案中,炎性或自身免疫性障碍是炎性关节炎。根据所提供的方法治疗的炎性关节炎的例子包括但不限于类风湿性关节炎、银屑病关节炎、狼疮、莱姆病、痛风或强直性脊柱炎。

[0404] 在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白可以用于治疗前B细胞白血病或B细胞白血病(如浆细胞白血病、慢性或急性淋巴细胞白血病)、骨髓瘤(如多发性骨髓瘤、浆细胞骨髓瘤、内皮骨髓瘤和巨大细胞骨髓瘤)以及淋巴瘤(如非霍奇金淋巴瘤)。在一些任何实施方案中,骨髓瘤的类型包括多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、多发性孤立性浆细胞瘤和/或髓外骨髓瘤。在一些任何实施方案中,骨髓瘤的类型包括轻链骨髓瘤、非分泌性骨髓瘤和/或IgD或IgE骨髓瘤。

[0405] 在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白可以用作免疫抑制剂以选择性阻断B淋巴细胞的作用,用于治疗疾病。例如,某些自身免疫性疾病的特征为产生自身抗体,所述自身抗体促进组织破坏和疾病加重。自身抗体还可能导致免疫复合物沉积并发症的发生并导致系统性红斑狼疮的许多症状(包括肾脏衰竭、神经痛症状和死亡)。调节与细胞应答无关的抗体产生在许多疾病状态中也会是有益的。还已经显示B细胞在类风湿性关节炎中在致关节炎免疫球蛋白的分泌中起作用。所提供的免疫调节蛋白用于抑制、阻断或中和B细胞的作用,从而阻抑抗体产生的方法和用途在以下疾病的治疗中会是有益的:自身免疫性疾病,如重症肌无力、类风湿性关节炎、多关节型幼年型类风湿性关节炎和银屑病关节炎。

[0406] 在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白可以用于阻断或中和与末期肾病相关的B细胞作用,所述B细胞作用可能与自身免疫性疾病相关或可能无关。这样的方法还将可用于治疗免疫性肾病。这样的方法还将可用于治疗与诸如以下的疾病相关的肾小球肾炎:膜性肾病、IgA肾病或Berger病、IgM肾病、IgA血管炎、古德帕斯彻病、感染后肾小球肾炎、系膜增生性疾病、慢性淋巴性白血病、微小病变型肾病综合征。这样的方法还将用作用于治疗与诸如以下的疾病相关的继发性肾小球肾炎或血管炎的治疗性应用:狼疮、多发性大动脉炎、过敏性紫癜、硬皮病、HTV相关疾病、淀粉样变性或溶血尿毒症综合征。所提供的方法还将可用作用于治疗与以下疾病相关的间质性肾炎或肾盂肾炎的治疗性应用的部分:慢性肾盂肾炎、镇痛药滥用、肾钙沉着症、由其他因素引起的肾病、肾结石或者慢性或急性间质性肾炎。本文提供的方法还包括在高血压或大血管疾病的治疗中使用所提供的免疫调节蛋白,所述疾病包括肾动脉狭窄或阻塞以及胆固醇栓塞或肾栓塞。所提供的方法和用途还可以用于治疗肾或泌尿系肿瘤、多发性骨髓瘤、淋巴瘤、轻链神经病或淀粉样变性。

[0407] 在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白还可以用于治疗哮喘和其他慢性气道疾病,如支气管炎和肺气肿。所提供的免疫调节蛋白还可以用于治疗舍格伦综合征。

[0408] 在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白的方法和用途包括免疫抑制,特别是用于诸如用于移植物抗宿主病和移植物排斥的治疗性用途。在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白的方法和用途包括诸如胰岛素依赖性糖尿病(IDDM)和克罗恩病的自身免疫性疾病的治疗。本文提供的方法将具有另外的治疗价值,用于治疗慢性炎性疾病,特别是用于减轻关节疼痛、肿胀、贫血和其他相关症状以及治疗感染性休克。

[0409] 在一些实施方案中,可以通过含有本文所述的免疫调节蛋白的药物组合物治疗的

炎性和自身免疫性障碍包括但不限于失弛缓症;艾迪生病;成人斯蒂尔病;无丙种球蛋白血症;斑秃;淀粉样变性;强直性脊柱炎;抗GBM/抗TBM肾炎;抗磷脂综合征;自身免疫性肾上腺炎(艾迪生病);自身免疫性血管性水肿;自身免疫性自主神经机能异常;自身免疫性脑脊髓炎;自身免疫性肝炎;自身免疫性内耳疾病(AIED);自身免疫性心肌炎;自身免疫性卵巢炎;自身免疫性睾丸炎;自身免疫性胰腺炎;自身免疫性多腺性综合征II型(APS II);自身免疫性视网膜病变;自身免疫性甲状腺疾病(AITD),即桥本甲状腺炎;自身免疫性荨麻疹;轴突和神经元神经病(AMAN);巴洛病;眼-口-生殖器综合征;良性黏膜类天疱疮;大疱性类天疱疮;卡斯尔曼病(CD);乳糜泻;美洲锥虫病;慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病(CIDP);慢性复发性多病灶性骨髓炎(CRMO);查格-施特劳斯综合征(CSS)或嗜酸性肉芽肿病(EGPA);瘢痕性类天疱疮;寇甘综合征;冷凝集素病;先天性心脏传导阻滞;柯萨奇病毒性心肌炎;CREST综合征;克罗恩病;疱疹样皮炎;皮肌炎;德维克病(视神经脊髓炎);盘状狼疮;心肌梗死后综合征;子宫内膜异位症;嗜酸细胞性食管炎(EoE);嗜酸细胞性筋膜炎;结节性红斑;重症混合型冷球蛋白血症;伊文思综合征;纤维肌痛;纤维化肺泡炎;巨细胞动脉炎(颞动脉炎);巨细胞心肌炎;肾小球肾炎;古德帕斯丘综合征;肉芽肿病伴多血管炎;格雷夫斯病;格林-巴利综合征;桥本甲状腺炎;溶血性贫血;过敏性紫癜(HSP);妊娠疱疹或妊娠性类天疱疮(PG);化脓性汗腺炎(HS)(反常性痤疮);低丙球蛋白血症;IgA肾病;IgA血管炎;IgG4相关硬化性疾病;免疫性血小板减少性紫癜(ITP);包涵体肌炎(IBM);间质性膀胱炎(IC);幼年型关节炎;幼年型糖尿病(1型糖尿病);幼年型肌炎(JM);川崎病;兰伯特-伊顿综合征;白细胞破碎性血管炎;紫癜风;硬化性苔癣;木样结膜炎;线性IgA病(LAD);狼疮;慢性莱姆病;美尼尔氏病;显微镜下多血管炎(MPA);混合性结缔组织病(MCTD);蚕蚀性角膜溃疡;穆-哈二氏病;多灶性运动神经病(MMN)或MMNCB;多发性硬化;重症肌无力;肌炎;发作性睡病;新生儿狼疮;视神经脊髓炎;中性粒细胞减少症;眼瘢痕性类天疱疮;视神经炎;复发性风湿病(PR);PANDAS;副肿瘤性小脑变性(PCD);阵发性睡眠性血红蛋白尿(PNH);帕-罗二氏综合征;睫状体扁平部炎(中间葡萄膜炎);Parsonage-Turner综合征;天疱疮、寻常型天疱疮;周围神经病;静脉周脑脊髓炎;恶性贫血(PA);POEMS综合征;结节性多动脉炎;多腺性综合征I型、II型、III型;风湿性多肌痛;多发性肌炎;心肌梗死后综合征;心包切开术后综合征;原发性胆汁性肝硬化;原发性硬化性胆管炎;孕酮性皮炎;银屑病;银屑病关节炎;纯红细胞再生障碍(PRCA);坏疽性脓皮病;雷诺现象;反应性关节炎;反射交感性营养不良;复发性多软骨炎;不宁腿综合征(RLS);腹膜后纤维化;风湿热;类风湿性关节炎;结节病;施密特综合征;巩膜炎;硬皮病;舍格伦综合征;精子和睾丸自身免疫;僵人综合征(SPS);亚急性细菌性心内膜炎(SBE);Susac综合征;交感性眼炎(SO);系统性红斑狼疮(SLE);Takayasu动脉炎;颞动脉炎/巨细胞动脉炎;血小板减少性紫癜(TTP);托洛萨-亨特综合征(THS);横贯性脊髓炎;1型糖尿病;溃疡性结肠炎(UC);未分化结缔组织病(UCTD);葡萄膜炎;血管炎;白癜风或伏格特-小柳-原田病。在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白(例如TACI-Fc)可以用于治疗硬皮病、重症肌无力、GVHD(包括急性GVHD或慢性GVHD)、与移植有关的免疫应答;抗磷脂Ab综合征;多发性硬化;舍格伦综合征;IgG4相关疾病;I型糖尿病;类风湿性关节炎(包括糖皮质激素疗法(GC)RA)或急性狼疮性肾炎。

[0410] 在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白(例如TACI-Fc)可以用于治疗肌萎缩侧索硬化、视神经脊髓炎、横贯性脊髓炎、CNS自身免疫、格林-巴利综合征、神经囊尾蚴病、

结节病(T/seroneg)、查格-施特劳斯综合征、桥本甲状腺炎、格雷夫斯病、免疫性血小板减少症(ITP)、艾迪生病、多发性肌炎或皮肌炎。

[0411] 在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白(例如TACI-Fc)可以用于治疗IgA肾病、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病(CIDP)、抗合成酶病如Jo-1综合征或ANCA血管炎。

[0412] 在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白(例如TACI-Fc)可以用于治疗自身抗体相关肾小球疾病。在一些实施方案中,自身抗体相关肾小球疾病可以包括免疫球蛋白(Ig)A肾病(IgAN)、狼疮性肾炎(LN)、原发性膜性肾病(pMN)或肾抗嗜中性粒细胞胞质抗体(ANCA)相关血管炎(AAV)。

[0413] 在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白(例如TACI-Fc)可以用于治疗免疫球蛋白(Ig)A肾病(IgAN)。在一些实施方案中,在筛选或选择用于施用或开始施用TACI-Fc融合蛋白治疗之前小于或等于3年内,通过活检已证实IgAN诊断。在一些实施方案中,可以在施用TACI-Fc融合蛋白之前对受试者进行活检。在一些实施方案中,受试者是在施用TACI-Fc融合蛋白时或被选择施用TACI-Fc融合蛋白时具有升高的半乳糖缺陷型IgA1(GdIgA1)抗体的受试者。

[0414] 在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白(例如TACI-Fc)可以用于治疗狼疮性肾炎(LN)。在一些实施方案中,在开始筛选用于施用或开始施用TACI-Fc融合蛋白治疗之前小于或等于1年内,通过活检已证实LN诊断。在一些实施方案中,受试者是具有根据ISN/RPS标准显示活性、增殖性III类或IV类LN的证据的肾活检物的受试者(参见例如,Markowitz和D'Agati,2007,Kidney Int.71:491-5)。在一些实施方案中,除了III类或IV类疾病之外,受试者还可以同时展现V类疾病。在一些实施方案中,可以在施用TACI-Fc融合蛋白之前对受试者进行活检。在一些实施方案中,在施用TACI-Fc融合蛋白时或当被选择施用TACI-Fc融合蛋白时,受试者具有升高的抗双链DNA(抗dsDNA)。在一些实施方案中,在施用TACI-Fc融合蛋白时或当被选择施用TACI-Fc融合蛋白时,受试者呈抗核抗体(ANA)阳性。在一些实施方案中,呈ANA阳性的受试者具有大于或等于1:80的滴度。

[0415] 在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白(例如TACI-Fc)可以用于治疗原发性膜性肾病(pMN)。在一些实施方案中,在筛选或选择用于施用或开始施用TACI-Fc融合蛋白治疗之前小于或等于3年内,通过活检已证实pMN诊断。在一些实施方案中,可以在施用TACI-Fc融合蛋白之前对受试者进行活检。在一些实施方案中,在施用TACI-Fc融合蛋白时或当被选择施用TACI-Fc融合蛋白时,受试者对抗磷脂酶A2受体1(抗PLA2R1)抗体和/或抗含血小板反应蛋白1型结构域的7A蛋白(抗THSD7A)抗体呈阳性。

[0416] 在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白(例如TACI-Fc)可以用于治疗肾抗嗜中性粒细胞胞质抗体(ANCA)相关血管炎(AAV)。在一些实施方案中,在筛选或选择用于施用或开始施用TACI-Fc融合蛋白治疗之前小于或等于23年内,通过活检已证实肾AAV诊断。在一些实施方案中,活检证实肾ANCA相关血管炎的证据。在一些实施方案中,可以在施用TACI-Fc融合蛋白之前对受试者进行活检。在一些实施方案中,在施用TACI-Fc融合蛋白时或当被选择施用TACI-Fc融合蛋白时,受试者呈抗蛋白酶3(PR3)或抗髓过氧化物酶(MPO)抗体阳性。

[0417] 在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白(例如TACI-Fc)可以用于治疗系统性红斑狼疮(SLE)。

[0418] 在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白(例如TACI-Fc)可以用于治疗舍格伦综合征(SjS)。

[0419] 在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白(例如TACI-Fc)可以用于治疗B细胞癌。在一些实施方案中,所述B细胞癌是如下癌症,其中在向B细胞提供自分泌生存环时涉及或牵涉到BAFF和APRIL。在一些实施方案中,所述癌症是B细胞慢性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤或骨髓瘤。在一些实施方案中,所述癌症是骨髓瘤。在一些任何实施方案中,骨髓瘤的类型包括多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、多发性孤立性浆细胞瘤和/或髓外骨髓瘤。在一些任何实施方案中,骨髓瘤的类型包括轻链骨髓瘤、非分泌性骨髓瘤和/或IgD或IgE骨髓瘤。

[0420] 在一些实施方案中,受试者可以接受针对其潜在障碍的标准护理(SOC)疗法,这在研究者或临床医师的技能水平内。在一些实施方案中,SOC疗法可以包括肾素-血管紧张素-醛固酮系统抑制剂(RAASi)、他汀类、利尿剂、免疫调节剂、免疫抑制剂或皮质类固醇。在一些实施方案中,受试者在接受所提供的TACI-Fc融合蛋白之前先前已经接受SOC疗法。在一些实施方案中,受试者在接受所提供的TACI-Fc融合蛋白的施用的同时继续接受SOC疗法。在一些实施方案中,在接受所提供的TACI-Fc融合蛋白的施用之后SOC疗法随时间逐渐减量。在一些实施方案中,SOC疗法可以包括抗疟药、抗生素如四环素、类固醇如泼尼松、钠葡萄糖协同转运蛋白-2(SGLT2)抑制剂、霉酚酸酯(MMF)、霉酚酸(MPA)、伏环孢素(voclosporin)或技术人员水平内的其他SOC疗法。在一些实施方案中,在正要开始施用TACI-Fc之前,受试者尚未接受或未接受与两种免疫调节治疗(如MMF和伏环孢素)的组合疗法。

[0421] 在一些实施方案中,受试者患有LN或肾AAV,并且受试者已接受使用霉酚酸酯(MMF)/霉酚酸(MPA)的疗法或作为用于治疗LN或肾AAV的标准护理疗法的其他免疫疗法。在一些实施方案中,在施用所提供的TACI-Fc融合蛋白之前或期间,向受试者施用霉酚酸酯(MMF)/霉酚酸(MPA)或作为用于治疗LN或肾AAV的标准护理疗法的其他免疫疗法。在一些实施方案中,在开始施用所提供的TACI-Fc融合蛋白之前5天内,受试者尚未接受类固醇。

[0422] 在一些实施方案中,根据所提供的方法施用所提供的免疫调节蛋白(例如TACI-Fc)的受试者不患有另一种肾病,包括但不限于糖尿病性肾病;C3肾小球肾病;局灶性节段性肾小球硬化症;薄基底膜疾病;奥尔波特病(Alport's disease);IgA血管炎;微小变化疾病;感染后肾小球肾炎;继发性膜性肾病(不包括合并III或IV类的V类LN);或继发性IgAN,包括但不限于乳糜泻、克罗恩病、HIV或肝硬化。

[0423] 在一些实施方案中,在开始施用所提供的免疫调节蛋白(例如TACI-Fc)之前的48周内,受试者尚未接受直接耗尽B淋巴细胞的药剂(例如利妥昔单抗)。在一些实施方案中,如果在施用TACI-Fc融合蛋白之前B细胞已经恢复到正常参考范围,则在开始施用所提供的免疫调节蛋白(例如TACI-Fc)之前的大于24周内,受试者可以已接受直接耗尽B淋巴细胞的药剂(例如利妥昔单抗)。

[0424] 在一些实施方案中,在开始施用所提供的免疫调节蛋白(例如TACI-Fc)之前的24周内,受试者尚未接受直接抑制BAFF和/或APRIL的药剂,如贝利木单抗。

[0425] 在一些实施方案中,在开始施用所提供的免疫调节蛋白(例如TACI-Fc)之前的8周内,受试者尚未接受静脉内Ig、阿巴西普、阿尼鲁单抗(anifrolumab)、贝拉西普、阿达木单抗、英夫利昔单抗、赛妥珠单抗、依那西普、戈利木单抗、阿那白滞素、卡那单抗、托珠单抗、

萨瑞鲁单抗、沙妥珠单抗。在一些实施方案中,在开始施用所提供的免疫调节蛋白(例如TACI-Fc)之前的8周内,受试者尚未接受任何批准的用于治疗免疫疾病的治疗剂的施用。

[0426] 在一些实施方案中,在开始施用所提供的免疫调节蛋白(例如TACI-Fc)之前的8周内,受试者尚未接受环磷酰胺。

[0427] 在一些实施方案中,施用治疗量的药物组合物。通常,要施用的本发明组合物的精确量可以由医师在考虑患者(受试者)的年龄、体重、感染程度和身体状况的个体差异后决定。特定患者的最佳剂量和治疗方案可以由医学领域技术人员通过监测患者的疾病征候并相应调整治疗而容易地确定。

[0428] 在一些实施方案中,受试者是人。在一些实施方案中,受试者是成年受试者。在一些实施方案中,受试者大于或等于18岁。

[0429] 在一些实施方案中,将本文所述的药物组合物(包括包含本文所述的任何TACI-Fc融合蛋白的药物组合物)施用至受试者。通常,根据标准药学实践,根据受试者的体型和状况确定药物组合物的剂量和施用途径。例如,最初可以在细胞培养测定中或在动物模型如小鼠、大鼠、兔、狗、猪或猴中估算治疗有效剂量。动物模型还可以用于确定适当的浓度范围和施用途径。所述信息随后可用于确定在人中的可用剂量和施用途径。可以根据与需要治疗的受试者相关的因素来确定确切剂量。可以调整剂量和施用以提供足够的活性化合物水平或维持所需作用。可以考虑的因素包括疾病状态的严重程度、受试者的一般健康状况、受试者的年龄、体重和性别、施用的时间和频率、一种或多种药物组合、反应敏感性以及对疗法的反应。

[0430] 在一些实施方案中,可以使用在对照动物和疾病的动物模型(例如,癌症模型)中观察到的药代动力学(PK)和药效动力学(PD)概况的建模和模拟来预测或确定患者给药。例如,可以使用来自非人灵长类动物(例如,食蟹猴)的PK数据来估计人PK。类似地,可以使用小鼠或大鼠PK和PD数据来预测人给药。可以使用观察到的动物数据来为计算模型提供信息,所述计算模型可以用于模拟人剂量反应。

[0431] 在一些实施方案中,本文提供的方法包括以如下量施用本文所述的药物组合物(包括包含TACI-Fc融合蛋白的药物组合物),其中已知或预测剂量可中和APRIL或BAFF配体(包括BAFF或APRIL同三聚体、BAFF/APRIL异三聚体或BAFF 60聚体)的活性,对于治疗效果而言是足够的。具体的量可以通过实验或经验来确定。在一些实施方案中,所述量可以根据体外结合数据或动物模型通过经验来确定。

[0432] 在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白或其药物组合物可以每3至4天施用、每周施用一次、每两周施用一次、每三周施用一次、每月施用一次、每两个月施用一次或每三个月施用一次。精确的时间和频率可以由熟练的临床医生或医师通过经验来确定,如取决于特定配制品的具体半衰期和清除率。给药频率将取决于所用制剂中分子的药代动力学参数。通常,施用组合物直至达到实现所需效果的剂量。因此,组合物可以以单一剂量的方式施用,或随时间以多剂量(以相同或不同的浓度/剂量)的方式施用,或以连续输注的方式施用。常规地对合适的剂量做出进一步改进。可以通过使用适当的剂量反应数据来确定适当的剂量。

[0433] 在一些情况下,例如当用本文提供的药物组合物(如本文提供的TACI-Fc融合蛋白)治疗慢性炎性或自身免疫性障碍时,随着时间或间歇地随着时间连续地(例如重复地)

施用所述组合物。施用的持续时间可以是数周、数月或数年。在一些情况下,慢性炎性或自身免疫性障碍(例如用本文提供的药物组合物,如含有本文所提供的TACI-Fc融合蛋白)的治疗可以包括向受试者无限期地施用治疗。在一些实施方案中,当炎性或自身免疫性障碍是慢性炎性或自身免疫性障碍时,在所述疾病缓解或部分缓解和/或疾病的体征和/或症状减轻或改善(如患有所述慢性炎性或自身免疫性障碍的受试者中的一种或多种炎症体征减轻)之后继续用本文提供的药物组合物(如本文提供的TACI-Fc融合蛋白)治疗。在一些实施方案中,根据熟练从业者的需要,继续施用直至任何时间。在一些情况下,例如当用本文提供的药物组合物(如本文提供的TACI-Fc融合蛋白)治疗急性炎性或自身免疫性障碍时,在限定或有限的时间段内施用所述组合物。在一些实施方案中,当炎性或自身免疫性障碍是急性炎性或自身免疫性障碍时,在所述疾病缓解或部分缓解和/或疾病的体征和/或症状减轻或改善(如患有所述急性炎性或自身免疫性障碍的受试者中的一种或多种炎症体征减轻)之后停止用本文提供的药物组合物(如本文提供的TACI-Fc融合蛋白)治疗。在一些实施方案中,根据熟练从业者的需要,在任何时间停止施用。

[0434] 通常,要施用的本发明组合物的准确量可以由医师考虑患者(受试者)的年龄、体重、肿瘤大小、感染或转移程度以及身体状况的个体差异后来确定。在一些实施方案中,在基于mg/kg受试者提及剂量时,认为普通人受试者具有约70kg-75kg(如70kg)的质量以及1.73m^2的体表面积(BSA)。

[0435] 在一些实施方案中,所述药物组合物的剂量是单一剂量或重复剂量。在一些实施方案中,向受试者给予所述剂量为每天一次、每天两次、每天三次或者每天四次或更多次。在一些实施方案中,在一周内给予约1或更多(如约2或更多、约3或更多、约4或更多、约5或更多、约6或更多或约7或更多)个剂量。在一些实施方案中,在数天、数周、数月或数年的过程中给予多剂量。在一些实施方案中,治疗过程为约1或更多个剂量(例如约2或更多个剂量、约3或更多个剂量、约4或更多个剂量、约5或更多个剂量、约7或更多个剂量、约10或更多个剂量、约15或更多个剂量、约25或更多个剂量、约40或更多个剂量、约50或更多个剂量或约100或更多个剂量)。

[0436] 在特定实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白以多个剂量施用,其中每个剂量每周施用不超过一次。在一些实施方案中,每个剂量每周施用一次(Q1W)。在一些实施方案中,每个剂量每两周施用一次(Q2W)。在一些实施方案中,每个剂量每三周施用一次(Q3W)。在一些实施方案中,每个剂量每四周施用一次(Q4W)。在一些实施方案中,每个剂量每两个月施用一次(例如Q8W)。在一些实施方案中,每个剂量每三个月施用一次(例如Q12W)。在所提供的实施方案的方面中,施用周期重复多次以施用多个剂量的TACI-Fc融合蛋白。在一些实施方案中,施用持续预定的时间段,例如4周、6周、8周、3个月、6个月、1年或更长时间。在一些实施方案中,在受试者的疾病或病症复发或进展后中断施用。

[0437] 在一些实施方案中,施用如本文所述的施用方案以达到用于治疗有需要的受试者的疾病、障碍或病症的治疗有效量。在一些实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白的每个剂量以为或约2.4mg与为或约960mg之间的量施用,包含端值。在一些实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白的每个剂量以如下量施用:在为或约8mg与为或约960mg之间、在为或约8mg与为或约880mg之间、在为或约8mg与为或约800mg之间、在为或约8mg与为或约720mg之间、在为或约8mg与为或约640mg之间、在为或约8mg与为或约560mg之间、在为或约8mg与为或约480mg之

间、在为或约8mg与为或约400mg之间、在为或约8mg与为或约320mg之间、在为或约8mg与为或约240mg之间、在为或约8mg与为或约160mg之间、在为或约8mg与为或约80mg之间、在为或约8mg与为或约40mg之间、在为或约40mg与为或约960mg之间、在为或约40mg与为或约880mg之间、在为或约40mg与为或约800mg之间、在为或约40mg与为或约720mg之间、在为或约40mg与为或约640mg之间、在为或约40mg与为或约560mg之间、在为或约40mg与为或约480mg之间、在为或约40mg与为或约400mg之间、在为或约40mg与为或约320mg之间、在为或约40mg与为或约240mg之间、在为或约40mg与为或约160mg之间、在为或约40mg与为或约80mg之间、在为或约80mg and与为或约960mg之间、在为或约80mg与为或约880mg之间、在为或约80mg与为或约800mg之间、在为或约80mg与为或约720mg之间、在为或约80mg与为或约640mg之间、在为或约80mg与为或约560mg之间、在为或约80mg与为或约480mg之间、在为或约80mg与为或约400mg之间、在为或约80mg与为或约320mg之间、在为或约80mg与为或约240mg之间、在为或约80mg与为或约160mg之间、在为或约160mg and与为或约960mg之间、在为或约160mg与为或约880mg之间、在为或约160mg与为或约800mg之间、在为或约160mg与为或约720mg之间、在为或约160mg与为或约640mg之间、在为或约160mg与为或约560mg之间、在为或约160mg与为或约480mg之间、在为或约160mg与为或约400mg之间、在为或约160mg与为或约320mg之间、在为或约160mg与为或约240mg之间、在为或约240mg与为或约960mg之间、在为或约240mg与为或约880mg之间、在为或约240mg与为或约800mg之间、在为或约240mg与为或约720mg之间、在为或约240mg与为或约640mg之间、在为或约240mg与为或约560mg之间、在为或约240mg与为或约480mg之间、在为或约240mg与为或约400mg之间、在为或约240mg与为或约320mg之间、在为或约320mg与为或约960mg之间、在为或约320mg与为或约880mg之间、在为或约320mg与为或约800mg之间、在为或约320mg与为或约720mg之间、在为或约320mg与为或约640mg之间、在为或约320mg与为或约560mg之间、在为或约320mg与为或约480mg之间、在为或约320mg与为或约400mg之间、在为或约400mg与为或约960mg之间、在为或约400mg与为或约880mg之间、在为或约400mg与为或约800mg之间、在为或约400mg与为或约720mg之间、在为或约400mg与为或约640mg之间、在为或约400mg与为或约560mg之间、在为或约400mg与为或约480mg之间、在为或约480mg与为或约960mg之间、在为或约480mg与为或约880mg之间、在为或约480mg与为或约800mg之间、在为或约480mg与为或约720mg之间、在为或约480mg与为或约640mg之间、在为或约480mg与为或约560mg之间、在为或约560mg与为或约960mg之间、在为或约560mg与为或约880mg之间、在为或约560mg与为或约800mg之间、在为或约560mg与为或约720mg之间、在为或约560mg与为或约640mg之间、在为或约640mg与为或约960mg之间、在为或约640mg与为或约880mg之间、在为或约640mg与为或约800mg之间、在为或约640mg与为或约720mg之间、在为或约720mg与为或约960mg之间、在为或约720mg与为或约880mg之间、在为或约720mg与为或约800mg之间、在为或约800mg与为或约960mg之间、在为或约800mg与为或约880mg或在为或约880mg与为或约960mg之间,每个都包含端值。

[0438] 在一些实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白的每个剂量以如下量施用:在为或约8mg与为或约20mg之间、在为或约20mg与为或约960mg之间、在为或约20mg与为或约880mg之间、在为或约20mg与为或约800mg之间、在为或约20mg与为或约720mg之间、在为或约20mg与为或约640mg之间、在为或约20mg与为或约560mg之间、在为或约20mg与为或约480mg之间、在

为或约20mg与为或约400mg之间、在为或约20mg与为或约320mg之间、在为或约20mg与为或约240mg之间、在为或约20mg与为或约160mg之间、在为或约20mg与为或约40mg之间,每个都包含端值。

[0439] 在一些实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白的每个剂量以如下量施用:在为或约8mg与为或约20mg之间、在为或约20mg与为或约960mg之间、在为或约20mg与为或约880mg之间、在为或约20mg与为或约800mg之间、在为或约20mg与为或约720mg之间、在为或约20mg与为或约640mg之间、在为或约20mg与为或约560mg之间、在为或约20mg与为或约480mg之间、在为或约20mg与为或约400mg之间、在为或约20mg与为或约320mg之间、在为或约20mg与为或约240mg之间、在为或约20mg与为或约160mg之间、在为或约20mg与为或约40mg之间,每个都包含端值。

[0440] 在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白的每个剂量是或是约2.4mg。在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白的每个剂量是或是约8mg。在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白的每个剂量是或是约20mg。在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白的每个剂量是或是约24mg。在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白的每个剂量是或是约40mg。在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白的每个剂量是或是约80mg。在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白的每个剂量是或是约160mg。在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白的每个剂量是或是约240mg。在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白的每个剂量是或是约320mg。在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白的每个剂量是或是约400mg。在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白的每个剂量是或是约480mg。在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白的每个剂量是或是约560mg。在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白的每个剂量是或是约640mg。在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白的每个剂量是或是约720mg。在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白的每个剂量是或是约800mg。在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白的每个剂量是或是约880mg。在一些实施方案中,TACI-Fc融合蛋白的每个剂量是或是约960mg。

[0441] 在一些实施方案中,剂量是如下量:在或在约40mg与为或约480mg之间、在为或约80mg至为或约320mg之间或在为或约80mg至为或约120mg之间,每个都包含端值。

[0442] 在一些实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白的每个剂量每三个月施用一次。在一些实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白以从为或约160mg至为或约960mg的量每三个月施用一次。在一些实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白以从为或约240mg至为或约800mg的量每三个月施用一次。在一些实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白以从为或约480mg至为或约720mg的量每三个月施用一次。

[0443] 在一些实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白的每个剂量每隔一个月施用一次(Q4W)。在一些实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白以从为或约2.4mg至为或约960mg Q4W的量施用。在一些实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白以从为或约80mg至为或约720mg Q4W的量施用。在一些实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白以从为或约160mg至为或约560mg Q4W的量施用。在一些实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白以从为或约240mg至为或约480mg Q4W的量施用。在一些实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白以为或约80mg Q4W施用。在一些实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白以为或约160mg Q4W施用。在一些实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白以为或约240mg Q4W施用。在一些实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白皮下施用。在一些实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白静脉内施用。

[0444] 在一些实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白的每个剂量每隔一周施用一次(Q2W)。在一些实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白以从为或约2.4mg至为或约960mg Q2W的量施用。在一些实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白以从为或约80mg至为或约720mg Q2W的量施用。在一些实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白以从为或约160mg至为或约560mg Q2W的量施用。在一些实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白以从为或约240mg至为或约480mg Q2W的量施用。在一些实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白以为或约80mg Q2W施用。在一些实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白以为或约160mg Q2W施用。在一些实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白以为或约240mg Q2W施用。在一些实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白皮下施用。在一些实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白静脉内施用。

[0445] 在一些实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白的每个剂量每周施用一次(Q1W)。在一些实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白以从为或约2.4mg至为或约960mg Q1W的量施用。在一些实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白以从为或约40mg至为或约480mg Q1W的量施用。在一些实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白以从为或约80mg至为或约320mg Q1W的量施用。在一些实施方案中,将TACI-Fc融合蛋白以从为或约80mg至为或约120mg Q1W的量施用。

[0446] 考虑到给药(例如,多个剂量)可以持续直到如熟练从业者所需的任何时间。例如,给药可以持续直到在受试者中获得期望的疾病反应,如疾病缓解或部分缓解和/或疾病的体征和/或症状的减轻或改善,如炎症的一种或多种体征的减轻。在一些实施方案中,在受试者中疾病缓解或部分缓解和/或疾病的体征和/或症状减轻或改善,如炎症的一种或多种体征减轻之后继续给药。

[0447] 主题组合物的基于可以任何便捷方式来实施,包括通过气溶胶吸入、注射、摄入、输液、植入或移植来实施。本文所述的组合物可以皮下、真皮内、瘤内、结内、髓内、肌内、通过静脉内(i.v.)注射或腹膜内施用。在一个实施方案中,治疗组合物是通过真皮内或皮下注射施用至患者。在另一实施方案中,治疗组合物是通过静脉内注射来施用。

[0448] 在一些实施方案中,将药物组合物(包括包含本文所述的任何TACI-Fc融合蛋白的药物组合物)通过任何途径施用至受试者,包括口服、透皮、通过吸入、静脉内、动脉内、肌内、直接施加至伤口部位、施加至手术部位、腹膜内、通过栓剂、皮下、皮内、经皮、通过雾化、胸膜内、心室内、关节内、眼内、脊柱内、瘤内或经全身。

[0449] 在一些实施方案中,经由皮下施用将药物组合物(包括包含本文所述的任何TACI-Fc融合蛋白的药物组合物)施用至受试者。在一些实施方案中,用于皮下施用的所述TACI-Fc融合物的剂量是为或约80mg。在一些实施方案中,用于皮下施用的所述TACI-Fc融合物的剂量是为或约240mg。在一些实施方案中,用于皮下施用的所述TACI-Fc融合物的剂量是为或约480mg。在一些实施方案中,用于皮下施用的所述TACI-Fc融合物的剂量是为或约720mg。在一些实施方案中,将每个剂量皮下Q1W施用。在一些实施方案中,将每个剂量皮下Q2W施用。在一些实施方案中,将每个剂量皮下Q4W(即每月一次)施用。

[0450] 在一些实施方案中,经由静脉内施用将药物组合物(包括包含本文所述的任何TACI-Fc融合蛋白的药物组合物)施用至受试者。在一些实施方案中,用于静脉内施用的所述TACI-Fc融合物的剂量是为或约2.4mg。在一些实施方案中,用于静脉内施用的所述TACI-Fc融合物的剂量是为或约8mg。在一些实施方案中,用于静脉内施用的所述TACI-Fc融合物的剂量是为或约24mg。在一些实施方案中,用于静脉内施用的所述TACI-Fc融合物的剂量是

为或约80mg。在一些实施方案中,用于静脉内施用的所述TACI-Fc融合物的剂量是为或约240mg。在一些实施方案中,用于静脉内施用的所述TACI-Fc融合物的剂量是为或约480mg。在一些实施方案中,用于静脉内施用的所述TACI-Fc融合物的剂量是为或约720mg。在一些实施方案中,将每个剂量以Q1W静脉内施用。在一些实施方案中,将每个剂量以Q2W静脉内施用。在一些实施方案中,将每个剂量以Q4W(即每月一次)静脉内施用。

[0451] 在一些实施方案中,将药物组合物(包括包含本文所述的任何TACI-Fc融合蛋白的药物组合物)肠胃外施用。在一些实施方案中,药物组合物呈适合于输注注射(例如,通过静脉内注射)的形式。在一些实施方案中,输注持续时间为、为至少或为约30分钟、40分钟、50分钟、1小时、1.5小时、2小时、3小时、4小时、5小时或6小时。在一些实施方案中,输注持续时间在约30分钟与6小时之间。在一些实施方案中,输注持续时间在约30分钟与5小时之间。在一些实施方案中,输注持续时间在约30分钟与4小时之间。在一些实施方案中,输注持续时间在约30分钟与3小时之间。在一些实施方案中,输注持续时间在约30分钟与2小时之间。在一些实施方案中,输注持续时间在约30分钟与1小时之间。在一些实施方案中,输注持续时间为或为约30分钟。

[0452] 在一些实施方案中,给药方案可以包括静脉内和皮下给药。在一些实施方案中,可以静脉内施用初始负荷剂量,然后皮下施用一个或多个维持剂量。在一些实施方案中,提供了一种负荷/维持方案,其中给予一次静脉内剂量,然后在同一天施用皮下剂量,然后每周一次至每三周一次皮下施用维持剂量。在一些实施方案中,每周施用一次(Q1W)维持剂量。在一些实施方案中,每两周施用一次(Q2W)维持剂量。在一些实施方案中,每月施用一次(Q4W)维持剂量。在一些实施方案中,每三个月施用一次(Q12W)维持剂量。

[0453] 在一些实施方案中,施用方案还可以包括中间/逐步降低方案,其中剂量量和/或施用频率随时间降低。在一些实施方案中,将免疫调节蛋白(例如TACI-Fc融合蛋白)每周施用一次(Q1W),持续四周,然后每月施用一次(Q4W)。在一些实施方案中,将免疫调节蛋白(例如TACI-Fc融合蛋白)每周施用一次(Q1W),持续四周,然后每周施用一次(Q1W)或每两周施用一次(Q2W),持续二至四周,然后每三个月施用一次(Q12W)。

[0454] 在一些实施方案中,施用方案还可以包括中间/逐步降低方案,其中剂量量和/或施用频率随时间降低。在一些实施方案中,将免疫调节蛋白(例如TACI-Fc融合蛋白)每周施用一次(Q1W),共三至四个剂量,然后每月施用一次(Q4W)。在一些实施方案中,将免疫调节蛋白(例如TACI-Fc融合蛋白)每周施用一次(Q1W),共三四个剂量,然后每周施用一次(Q1W)或每两周施用一次(Q2W),持续二至四周,然后每三个月施用一次(Q12W)。在一些实施方案中,将免疫调节蛋白(例如TACI-Fc融合蛋白)每隔一周施用一次(Q2W),共三至四个剂量,然后每月施用一次(Q4W)。例如,在一些实施方案中,将Q1W或Q2W剂量给予3-4个剂量,然后以该剂量或更高剂量每月给予(Q4W)。在一些实施方案中,以为或约80mg Q1W或Q2W施用3-4个剂量,然后以该剂量或更高剂量(例如160或240mg)每月(Q4W)施用。

[0455] 在一些实施方案中,根据所提供的方法施用所提供的免疫调节蛋白(如TACI-Fc融合蛋白)持续由治疗医师或研究者确定的所需时间。在一些实施方案中,施用持续直到受试者展现完全应答或临床缓解。在一些实施方案中,根据所提供的方法施用所提供的免疫调节蛋白(如TACI-Fc融合蛋白)持续治疗期。在一些实施方案中,治疗期持续为或约6个月至3年,如为或约24周、36周、48周、1年(例如52周)、2年或3年。在一些实施方案中,施用持续直

到如下时间:受试者的症状恶化或者疾病或病症在缓解后在受试者中已经进展或复发。

[0456] 在一些实施方案中,药物组合物是作为单一疗法(即,作为单一药剂)或作为组合疗法(即,与一种或多种另外的免疫抑制剂组合)来施用。在一些实施方案中,所述另外的药剂是糖皮质激素(例如,泼尼松、地塞米松和氢化可的松)、细胞抑制剂(如影响T细胞和/或B细胞的增殖的细胞抑制剂(例如,嘌呤类似物、烷化剂或抗代谢物))、抗体(例如,抗CD20、抗CD25或抗CD3单克隆抗体)、环孢菌素、他克莫司、西罗莫司、依维莫司、干扰素、阿片类、TNF结合蛋白、霉酚酸酯、小型生物制剂(如芬戈莫德或多球壳菌素)、细胞因子(如干扰素β-1a)、整联蛋白激动剂或整联蛋白拮抗剂。

[0457] 在一些实施方案中,监测受试者中的治疗功效。在一些实施方案中,监测受试者中抗体(如自身抗体)的循环水平随时间相比于基线的变化。在一些实施方案中,受试者患有LN,并且监测受试者中抗dsDNA的循环水平随时间相比于基线的变化。在一些实施方案中,受试者患有IgAN,并且监测受试者中GdIgA1和抗GdIgA1的循环水平随时间相比于基线的变化。在一些实施方案中,受试者患有pMN,并且监测受试者中pMN和抗MPO的循环水平随时间相比于基线的变化。在一些实施方案中,受试者患有肾AAV,并且监测受试者中抗PR3的循环水平随时间相比于基线的变化。

[0458] 在一些实施方案中,监测受试者中补体组分随时间相比于基线的变化。在一些实施方案中,补体组分是C3、C4或CH50中的一种或多种。

[0459] 在一些实施方案中,监测受试者中的临床反应。在一些实施方案中,可以通过监测随时间而变的基线估计肾小球滤过率(eGFR)来评估临床反应。在一些实施方案中,通过使用血清肌酸或胱抑素C的方程计算eGFR。在一些实施方案中,通过独立于种族的方程计算eGFR,如Inker等人,2021N Engl J Med.,385:1737-1749中所述。在一些实施方案中,可以使用慢性肾脏疾病流行病学合作研究所(CKD-EPI)公式估计eGFR。

[0460] 在一些实施方案中,通过测定eGFR(例如使用胱抑素C种族非依赖性方程)将反应测量为肾反应。在一些实施方案中,在患有LN或pMN的受试者中测量肾反应。

[0461] 在一些实施方案中,受试者患有LN,并且如果受试者的UPCR小于0.5g/g(例如基于24小时尿液收集)并且eGFR大于或等于正常下限(LLN)或者在eGFR小于LLN的情况下eGFR相比于基线已降低小于20%,则存在完全肾反应。在一些实施方案中,受试者患有LN,并且如果受试者的UPCR小于或等于3.5g/g且相比于基线降低大于50%(例如基于24小时尿液收集)并且eGFR大于或等于60mL/min/1.73m^{2}或者eGFR相比于基线降低小于20%,则存在部分肾反应。

[0462] 在一些实施方案中,受试者患有pMN,并且如果受试者的UPCR小于0.3g/g(例如基于24小时尿液收集),血清白蛋白大于35g/L,并且eGFR大于或等于60mL/min/1.73m^2,则存在完全肾反应。在一些实施方案中,受试者患有pMN,并且如果受试者的UPCR小于或等于3.5g/g且相比于基线降低大于50%(例如基于24小时尿液收集),血清白蛋白大于30g/L并且eGFR稳定(例如,与基线相比下降小于15%),则存在部分肾反应。

[0463] 在所述方法的一些实施方案中,治疗可以导致临床缓解。在一些方面,治疗可以导致在自第一剂量起约1周、约2周、约3周、约4周、约5周、约6周、约7周、约9周、约10周、约11周、约12周、约14周、约16周、约18周、约20周、约22周、约24周、约26周、约28周、约30周、约32周、约34周、约36周、约38周、约40周、约42周、约44周、约46周、约48周、约50周、约52周、约54

周、约56周、约58周、约60周、约62周、约64周、约66周、约68周、约70周、约72周、约74周、约76周、约78周、或约80周内临床缓解。在一些实施方案中，治疗导致自第一剂量起约10周内临床缓解。在一些实施方案中，治疗导致自第一剂量起约6周内临床缓解。在一些实施方案中，治疗导致在自第一剂量起约6周时和在自第一剂量起约10周时临床缓解。

在任何前述方法的一些实施方案中，临床缓解是持续缓解。例如，在一些实施方案中，持续缓解是在自第一剂量起约10周、约15周、约20周、约25周、约30周、约35周、约40周、约45周、约50周、约52周、约55周、约60周、约65周、约70周、约72周、约75周、约80周、约85周、约90周、约95周、约100周、约102周、约105周或约110周时临床缓解。在一些实施方案中，持续缓解是在自第一剂量起约十周时和在自第一剂量起约30周时临床缓解。在一些实施方案中，持续缓解具有至少约30周或至少约7、约8、约9、约10、约11或约12个月的长度。在任何前述方面的一些实施方案中，疾病或病症的一种或多种症状的改善、临床缓解和/或临床反应在治疗结束后维持至少一个月(例如，至少一个月、至少两个月、至少三个月、至少四个月、至少五个月、至少六个月、至少七个月、至少八个月、至少九个月、至少十个月、至少十一个月、至少十二个月或更长时间)。

VII.制品和试剂盒

[0464] 本文还提供了处于合适包装中的包含本文所述药物组合物的制品。用于本文所述组合物的合适包装是本领域已知的，并且包括例如小瓶(如密封小瓶)、器皿、安瓿、瓶子、罐子、软包装(例如，密封的聚酯薄膜(Mylar)或塑料袋)等。可以进一步将这些制品灭菌和/或密封。

[0465] 还提供试剂盒，其包含本文所述的药物组合物(或制品)，所述试剂盒还可以包含关于使用所述组合物的方法(如本文所述的用途)的一个或多个说明书。本文所述的试剂盒还可包含商业和用户角度所需的其他材料，包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针、注射筒以及具有针对执行本文所述任何方法的说明书的包装插页。

VIII.示例性实施方案

[0466] 所提供的实施方案包括：

1.一种治疗炎性或自身免疫性疾病或障碍的方法，所述方法包括向受试者施用TACI-Fc融合蛋白，所述TACI-Fc融合蛋白是式TACI-接头-Fc的两个多肽的同二聚体，其中TACI是包含SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列中的氨基酸取代K77E、F78Y和Y102D的变体TACI多肽，其中将所述TACI-Fc融合蛋白以从为或约8mg至为或约960mg的剂量每周施用一次直到每三个月施用一次。

2.根据实施方案1所述的方法，其中将所述TACI-Fc融合蛋白的剂量每三个月施用一次。

3.根据实施方案1所述的方法，其中将所述TACI-Fc融合蛋白的剂量每月施用一次(Q4W)。

4.根据实施方案1所述的方法，其中将所述TACI-Fc融合蛋白的剂量每隔一周施用一次(Q2W)。

5.根据实施方案1所述的方法，其中将所述TACI-Fc融合蛋白的剂量每周施用一次(Q1W)。

6.根据实施方案1-5中任一项所述的方法，其中将所述TACI-Fc融合蛋白以从为或

约80mg至为或约720mg、从为或约160mg至为或约560mg或从为或约240mg至为或约480mg的剂量施用。

7.根据实施方案1-6中任一项所述的方法,其中将所述TACI-Fc融合蛋白以从为或约20mg至为或约720mg、从为或约40mg至为或约480mg、从为或约80mg至为或约320mg或从为或约80mg至为或约120mg的剂量施用。

8.根据实施方案1-7中任一项所述的方法,其中将所述TACI-Fc融合蛋白以从为或约240mg至为或约480mg一次的剂量施用。

9.根据实施方案1-8中任一项所述的方法,其中将所述TACI-Fc融合物以从为或约80mg至为或约120mg的剂量施用。

10.根据实施方案1-9中任一项所述的方法,其中所述变体TACI多肽示于SEQ ID NO:26中。

11.根据实施方案1-10中任一项所述的方法,其中所述接头选自GSGGS(SEQ ID NO:76)、GGGGS(G4S;SEQ ID NO:77)、GSGGGGS(SEQ ID NO:74)、GGGGSGGGGS(2xGGGGS;SEQ ID NO:78)、GGGGSGGGGSGGGGS(3xGGGGS;SEQ ID NO:79)、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(4xGGGGS;SEQ ID NO:84)、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(5XGGGGS;SEQ ID NO:91)、GGGGSSA(SEQ ID NO:80)、或GSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:194)或其组合。

12.根据实施方案1-11中任一项所述的方法,其中所述接头示于SEQ ID NO:74中。

13.根据实施方案1-12中任一项所述的方法,其中所述Fc是IgG1 Fc结构域。

14.根据实施方案1-13中任一项所述的方法,其中所述Fc是变体IgG1 Fc,与野生型IgG1Fc结构域相比,其展现对Fc受体的降低的结合亲和力和/或降低的效应子功能。

15.根据实施方案14所述的方法,其中所述变体IgG1 Fc结构域包含选自以下的一个或多个氨基酸取代:L234A、L234V、L235A、L235E、G237A、S267K、R292C、N297G和V302C,根据EU编号。

16.根据实施方案14或实施方案15所述的方法,其中所述变体IgG1 Fc包含氨基酸取代L234A、L235E和G237A,根据EU编号。

17.根据实施方案13-16中任一项所述的方法,其中所述Fc包含氨基酸取代C220S,其中所述残基根据Kabat的EU索引编号。

18.根据实施方案13-17中任一项所述的方法,其中所述Fc缺乏铰链序列EPKSS或EPKSC。

19.根据实施方案13-18中任一项所述的方法,其中所述Fc区包含K447del,其中所述残基根据Kabat的EU索引编号。

20.根据实施方案1-17和19所述的方法,其中所述Fc包含SEQ ID NO:73中所示的氨基酸序列。

21.根据实施方案1-17、19和20中任一项所述的方法,其中所述TACI-Fc融合蛋白示于SEQ ID NO:167中。

22.根据实施方案1-13、17和19所述的方法,其中所述Fc包含SEQ ID NO:81中所示的氨基酸序列。

23.根据实施方案1-13、17、19和22中任一项所述的方法,其中所述TACI-Fc融合蛋白示于SEQ ID NO:168中。

24.根据实施方案1-23中任一项所述的方法,其中所述施用是经由静脉内施用。

25.根据实施方案1-23中任一项所述的方法,其中所述施用是经由皮下施用。

26.根据实施方案1-25中任一项所述的方法,其中所述受试者中的B细胞免疫应答或活性降低。

27.根据实施方案1-26中任一项所述的方法,其中所述受试者中的循环血清免疫球蛋白减少。

28.根据实施方案1-27中任一项所述的方法,其中B细胞成熟、分化和/或增殖中的一种或多种被降低或抑制。

29.根据实施方案1-28中任一项所述的方法,其中所述受试者中的APRIL或BAFF蛋白的循环水平降低,任选地其中APRIL或BAFF蛋白是APRIL同三聚体、BAFF同三聚体、APRIL/BAFF异三聚体或BAFF 60聚体。

30.根据实施方案1-29中任一项所述的方法,其中所述疾病或障碍是B细胞介导的疾病或障碍。

31.根据实施方案1-30中任一项所述的方法,其中所述疾病或障碍是自身免疫性疾病、和炎性病症、B细胞癌、抗体介导的病状、肾病、移植物排斥、移植物抗宿主病或病毒感染。

32.根据实施方案1-31中任一项所述的方法,其中所述疾病或障碍选自系统性红斑狼疮(SLE)、狼疮性肾炎、皮肤红斑狼疮、舍格伦综合征、硬皮病(系统性硬化)、多发性硬化、糖尿病(例如I型糖尿病)、多发性肌炎、原发性胆汁性肝硬化、IgG4相关疾病、IgA肾病、IgA血管炎、ANCA血管炎(显微镜下多血管炎、肉芽肿病伴多血管炎[韦格纳肉芽肿病]、嗜酸性肉芽肿病伴多血管炎[查格-施特劳斯])、冷球蛋白血症、冷凝集素或温凝集素疾病、免疫性血小板减少性紫癜、视神经炎、淀粉样变性、抗磷脂抗体综合征(APS)、自身免疫性多内分泌腺综合征II型(APS II)、自身免疫性甲状腺疾病(AITD)、格雷夫斯病、自身免疫性肾上腺炎、寻常型天疱疮、大疱性类天疱疮、重症肌无力、移植物抗宿主病(GVHD)、移植、类风湿性关节炎、急性狼疮性肾炎、肌萎缩侧索硬化、视神经脊髓炎、横贯性脊髓炎、拉斯穆森脑炎、CNS自身免疫、格林-巴利综合征、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病、神经囊尾蚴病、结节病、抗磷脂抗体综合征、IgG4相关疾病、桥本甲状腺炎、免疫性血小板减少症、艾迪生病和皮肌炎。

33.根据实施方案1-31中任一项所述的方法,其中所述疾病或障碍是B细胞癌。

34.根据实施方案33所述的方法,其中所述B细胞癌是骨髓瘤、B细胞慢性淋巴细胞白血病、华氏巨球蛋白血症或非霍奇金淋巴瘤。

35.根据实施方案1-34中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

IX.实施例

[0467] 以下实施例被包括在内仅用于说明目的,并不旨在限制本发明的范围。

实施例1.亲和力修饰的TACI的鉴定

[0468] 此实施例描述生成人TACI TNFR结构域(TD)的突变体DNA构建体,用于在作为酵母展示文库的酵母的表面上翻译和表达、将DNA文库引入酵母中以及选择表达含有至少一个TD的TACI的细胞外结构域(ECD)的亲和力修饰的变体(TACI vTD)的酵母细胞。然后将选择的TACI vTD格式化为Fc融合蛋白。

A.TACI TNFR结构域的突变体DNA构建体的生成

[0469] 构建含有随机氨基酸取代的文库以鉴定TACI的细胞外结构域(ECD)的变体。基于含有TACI的ECD部分的野生型人TACI序列来生成构建体,所述ECD部分包括(1)如SEQ ID NO:1中所示的两个富半胱氨酸蛋白质结构域(CRD,CRD1/CRD2)(对应于如UniProt登录号O14836中所示的残基29-110),或者(2)仅如SEQ ID NO:13中所示的单一CRD(CRD2)(对应于如UniProt登录号O14836中所示的残基68-110)。

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

VAMRSCPEEQYWDPLLGTCMSCKTICNHQSQRTCAAFCRSLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRS

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

SLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRS

[0470] 将编码野生型TACI ECD结构域的DNA克隆于修饰的酵母表达载体PBYDS03(Life Technologies,美国)的BamHI与KpnI位点之间,其将TACI ECD置于酵母表面锚定结构域Sag1(酵母α-凝集素的C末端结构域)的N末端,其具有位于所述TACI ECD序列的N末端的框内HA融合标签以及位于所述TACI ECD序列的C末端的c-Myc融合标签。通过诱导性GAL1启动子来控制该载体中的表达。在验证正确的DNA序列后,使用野生型TACIECD DNA构建体作为模板进行易错PCR,以横跨TACI ECD序列以每个基因拷贝2-5个突变的频率引入随机突变。与0.0至0.6 mM的逐步调整量的MnCl2组合使用Genemorph II试剂盒(Agilent,美国)来实现所需错误率。在易错PCR后,使用NucleoSpin®凝胶和PCR提纯试剂盒(Macherey-Nagel,德国)对诱变的DNA进行凝胶纯化。然后使用含有与pBYDS03同源的48 bp重叠区的引物以OneTaq 2x PCR主混合物(New England Biolabs,美国)对该分离的DNA片段进行PCR扩增,用于准备大规模酵母电穿孔。将TACI ECDDNA插入物凝胶纯化并以500 ng/μL的标称浓度重悬于无菌去离子水中。

[0471] 为了制备用于转化的载体,将pBYDS03用BamHI-HF和KpnI-HF限制性酶(NewEngland Biolabs,美国)消化,并且将大的载体片段(预期大小:7671bp)凝胶纯化并以500ng/μL的标称浓度溶解于无菌去离子水中。为了准备酵母转化,对于每一电穿孔,将12μg的文库DNA插入物与4μg的线性化载体混合。

[0472] 为了将随机DNA文库引入酵母中,紧接在电穿孔之前准备酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)菌株BJ5464(ATCC.org;ATCC编号208288),如Benatuil,L.等人,Protein Eng Des Sel.2010年4月;23(4):155-159中所详述。简言之,将BJ5464的过夜固定相培养物在100mL YPD培养基(10g/L酵母氮源、20g/L蛋白胨和20g/L D-(+)-葡萄糖)中传代至OD_{600} 0.3,并且将其置于30℃和300rpm的平台振荡器中直至接种的培养物达到OD_{600} 1.6。在约5小时后,通过离心收获细胞并在方案的剩余时间中保持在冰上,除非另外陈述。在收获后,将细胞用50mL冰冷水洗涤两次,并用电穿孔缓冲液(1M山梨醇、1mM CaCl2)洗涤一次。通过以下方式将收集的细胞条件化:重悬于20mL 0.1M LiAc/10mM DTT中并以225rpm在培养瓶中在30℃下振荡30分钟。立即将条件化的细胞离心,用电穿孔缓冲液洗涤两次,并且用约100-200μl的电穿孔缓冲液重悬以使体积达到1mL。此条件化的细胞悬浮液足以在400μl比色皿中进行两次电穿孔反应。

[0473] 对于每次电穿孔,将12μg的文库DNA插入物和4μg的线性化pBYDS03载体(上文所

述)与400μl的电感受态BJ5464混合,并转移至具有2mm电极间隙的预冷的BioRad GenePulser比色皿中。将混合物在冰上保持5分钟,之后使用BTX ECM399指数衰减波电穿孔系统在2500V下进行电穿孔。紧接在电穿孔之后,将细胞添加至8mL的1M山梨醇:1XYPD的1:1混合物,并在室温下无振荡静置10min,然后将其置于平台振荡器上在225rpm和30℃下持续1h。通过离心收集细胞并重悬于250mL SCD-Leu培养基中以适应由修饰的质粒pBYDS03携带的LEU2选择性标记物。生成一升SCD-Leu培养基,其具有14.7gm柠檬酸钠、4.29gm柠檬酸一水合物、20gm右旋糖、6.7gm酵母氮源和1.6gm不含亮氨酸的酵母合成缺失培养基补充剂。在使用前使用0.22μm真空过滤器装置将培养基过滤灭菌。通过以下方式来估计文库大小:在SCD-Leu琼脂板上在10^{-5}至10^{-10}的稀释范围内对刚回收的细胞进行点样连续稀释,并且在三天后通过计数菌落进行外推。使电穿孔培养物的其余部分生长至饱和,并且将来自此培养的细胞再次1/100传代培养至相同培养基中并生长至饱和,以使未转化细胞的比例降至最低并允许从可能含有两个或更多个文库变体的细胞分离质粒。为了维持文库多样性,使用所含细胞比计算的文库大小多至少10倍的接种物进行此传代培养步骤。将来自第二饱和培养的细胞重悬于含有25%(重量/体积)甘油的新鲜培养基中至$1x10^{10}$/mL的密度,并且在-80℃下冷冻和储存(冷冻的文库原液)。

[0474] 将数量等于所估计文库大小的至少10倍的细胞从单独文库原液解冻,在非诱导性SCD-Leu培养基中悬浮至$0.5x10^{7}$个细胞/mL,并生长过夜。第二天,将等于文库大小10倍数量的细胞以2000RPM离心2分钟,并在诱导型SCDG-Leu培养基中重悬至$0.5x10^{7}$个细胞/mL。生成一升SCDG-Leu诱导培养基,其具有溶于水中并经由0.22μm膜过滤器装置灭菌的5.4gm Na_2HPO_4、8.56gm $NaH_2PO_4 \cdot H_20$、20gm半乳糖、2.0gm右旋糖、6.7gm酵母氮源和1.6gm不含亮氨酸的酵母合成缺失培养基补充剂。使培养物在诱导培养基中在30℃下生长过夜,以诱导文库蛋白在酵母细胞表面上的表达。

[0475] 在TACI ECD文库的过夜诱导后,通过磁性分离使用预加载BAFF-9xHis的Dynabeads™ His标签磁珠分选等同于估计的文库多样性的10倍的细胞数量,以富集具有结合其外源重组反结构蛋白的能力的TACI ECD变体。将来自所述磁性分离的输出用于随后的FACS选择方案中,所述FACS选择方案涉及在BAFF-9xHis与APRIL-FLAG之间交替的四轮阳性选择,其中每轮的反结构浓度同时降低10倍(例如,FACS1:50nM APRIL-FLAG;FACS4:0.05nM BAFF-9xHis)。调整孵育体积以维持反结构超过酵母展示的TACI ECD变体分子的总数量至少10倍化学计量过量(假定每个细胞100,000个拷贝的蛋白质),以避免可能减小文库区别的配体耗尽伪像。分别用PE缀合的抗6xHis标签抗体(Biolegend,美国)和PE缀合的抗FLAG标签抗体检测BAFF-9xHis和APRIL-FLAG与TACI ECD变体的结合。分离来自FACS3和FACS4输出的变体用于DNA测序和随后的克隆,用于重组Fc融合物表达。

[0476] 对来自上述FACS4 BAFF-9xHis选择的酵母细胞输出进行第二循环的随机诱变。每次分选使用交替反结构的阳性选择方案与第一循环相同,但是转换反结构的顺序(例如,FACS1:50nM BAFF-9xHis;FACS4:0.05nM APRIL-FLAG)。从FACS3和FACS4酵母细胞输出选择另外的变体。

B.将选择输出再格式化为Fc融合物

[0477] 将来自如上所述的循环1选择和循环2选择二者的FACS3和FACS4输出的TACI ECD变体插入物亚克隆至Fc融合载体中用于单独克隆的序列分析。为了生成作为含有具有至少

一个亲和力修饰的结构域的TACI的ECD的Fc融合蛋白的重组免疫调节蛋白(例如,变体TACI ECD-Fc),生成编码DNA以编码如下蛋白质:变体TACI结构域,之后是7个氨基酸的接头(GSGGGGS;SEQ ID NO:74),之后是按照用于免疫球蛋白蛋白质的Eu索引编号系统含有突变L234A、L235E和G237A的人IgG1无效应子Fc序列。由于构建体不包括任何可与半胱氨酸形成共价键的抗体轻链,因此人IgG1 Fc还在依据免疫球蛋白蛋白质的EU索引编号系统的位置220处含有半胱氨酸残基被丝氨酸残基的替代(C220S)(对应于关于SEQ ID NO:71中所示的野生型或未经修饰的Fc的位置5(C5S))。Fc区还缺少在野生型人IgG1恒定区基因中通常编码的位置447处的C末端赖氨酸(命名为K447del)(对应于SEQ ID NO:71中所示的野生型或未经修饰的Fc的位置232)。融合构建体中的无效应子(惰性)IgG1 Fc示于SEQ ID NO:73中。

[0478] 使来自选择的TACI ECD FACS分选的输出细胞库在SCD-Leu选择培养基中生长至最终密度,并且使用酵母质粒DNA分离试剂盒(Zymoresearch,美国)分离质粒DNA。对于Fc融合物的生成,用在任一端上含有与AfeI和BamHI消化的Fc融合载体(编码Fc区并与Fc区同框)的40bp同源区的引物对亲和力成熟的TACI ECD变体进行PCR扩增,以使用Gibson Assembly主混合物(New England Biolabs)进行体外重组。按照制造商的说明,将Gibson Assembly反应物添加至大肠杆菌菌株NEB5α(New England Biolabs,美国)中用于热激转化。

[0479] 将转化反应物的稀释液铺板在含有100μg/mL羧苄西林(Teknova,美国)的LB琼脂上以分离单一菌落用于选择。通常,然后使来自每次转化的多达96个菌落在96孔板中在37℃下在含有100μg/mL羧苄西林的LB肉汤(Teknova目录号L8112)中过夜生长至饱和,并且将来自每个孔的小等分试样提交用于DNA测序,以鉴定所有克隆中的一个或多个突变。

[0480] 在对目标克隆进行序列分析和鉴定后,使用MidiPlus试剂盒(Qiagen)制备质粒DNA。

[0481] 重组变体Fc融合蛋白是使用Expi293表达系统(Invitrogen,美国)从悬浮适应的人胚肾(HEK)293细胞产生。收获上清液并将Fc蛋白捕获于Mab SelectSure(GE Healthcare目录号17543801)上。使用50mM乙酸盐(pH 3.6)从柱中洗脱蛋白质。合并MabSelect Sure洗脱液,并将pH调整至高于pH 5.0。然后在制备型SEC柱上精制此材料,以生成高度纯化的单体材料。将该材料缓冲液交换至10mM乙酸盐、9%蔗糖(pH 5.0)中。通过分析型SEC评估蛋白质纯度。将材料装入小瓶并储存在-80下。

[0482] 通过所述选择鉴定并生成的选择的TACI vTD中的氨基酸取代示于表1中。如实施例2中所述来测试格式化为Fc融合蛋白的选择的vTD的结合和功能活性。

实施例2.Fc融合蛋白的活性的评估.

[0483] 此实施例描述使用基于细胞系的体外生物测定对格式化为Fc融合物的含有TACI结构域的分子(如可溶性野生型(WT)或变体TACI vTD)的活性的表征。

[0484] 具有激活的B细胞的核因子κ轻链增强子(NF-κB)基于萤光素酶的报告物的Jurkat细胞是购得的(BPS Bioscience)。用慢病毒转导Jurkat/NK-κB细胞以产生小鼠TACI的稳定细胞表面表达(Jurkat/NF-κB/TACI)。表达小鼠TACI的细胞对人和小鼠APRIL或BAFF二者都有反应。在重组人或小鼠APRIL或BAFF与TACI结合后,Jurkat细胞中的内源NK-κB转录因子与控制萤火虫萤光素酶基因转录的DNA应答元件结合。通过添加含有萤光素的底物对萤光素酶产生进行定量,所述底物在氧化时发出可以使用酶标仪测量的光。Jurkat/NF-κB/TACI

测定的示意图显示于图1中。

[0485] 重组人和小鼠APRIL和BAFF配体是购得的:人APRIL(Tonbo Biosciences);人BAFF(Biolegend);小鼠APRIL(ProSci Incorporated);以及小鼠BAFF(R&D Systems)。

[0486] 为了确定含有TACI WT或vTD结构域的分子的生物活性,将30μL不同浓度(范围为1-10nM)的重组人或小鼠APRIL或BAFF与30μL固定的或逐步调整的(范围为40nM-66pM)含有TACI结构域的分子一起孵育。将配体和可溶性受体在振荡和室温(RT)下孵育20分钟。将50μL转移至含有1.5x10^5个Jurkat/NF-κB/TACI细胞/孔的96孔白色平底板中的50μL培养基(RPMI1640+5%胎牛血清[FBS])中。将孔混合并将板在37摄氏度(C)下在加湿的5% CO_2孵育室中孵育5小时。将板从孵育器取出并将100μL细胞溶解和萤光素酶底物溶液(Bio-Glo™萤光素酶测定系统,Promega)添加至每孔,并将所述板在定轨振荡器上孵育10分钟。通过使用Cytation 3(BioTek Instruments)成像读取仪以1秒/孔积分时间测量发光来确定每个测试样品的相对发光值(RLU)。在TACI WT或vTD存在下相对于对照蛋白减小的RLU表示在Jurkat/NF-κB/TACI细胞中对经由转导的TACI受体的配体信号传导的阻断和抑制。

[0487] 如图2中所示,示例性TACI-Fc vTD分别以等于或高于含有WT TACI结构域的Fc融合蛋白的水平抑制配体信号传导。

[0488] 基本如上所述还使用经TACI转导的Jurkat/NF-κB萤光素酶报告细胞进行了类似的实验,以另外地评估通过含有SEQ ID NO:26中所示的vTD的示例性TACI-Fc融合物(26TACI CRD2-Fc)实现的对食蟹猴和大鼠APRIL或BAFF介导的信号传导的功能性阻断。如表E1.A所示,TACI-Fc融合物显示对于所有测试的物种的APRIL和BAFF介导的信号传导的阻断。

表E1.A:26TACI CRD2-Fc的跨物种抑制

	Jurkat/NF-κB/TACI细胞中的信号抑制	
BAFF/APRIL的物种	APRIL IC_{50} (nM)	BAFF IC_{50} (nM)
人	3.4	2.8
食蟹猴	3.3	1.9
大鼠	22.7	3.8
小鼠	24.5	15.2

注释:APRIL=增殖诱导配体;BAFF=B细胞激活因子;IC50=半最大抑制浓度;NF-κB=核因子

活化B细胞κ轻链增强子;TACI=跨膜激活剂和钙调节配体相互作用因子。

实施例3.含有TACI的分子对TACI介导的刺激的TACI阻断的生物活性评估.

[0489] 使用实施例2中所述的基于细胞系的生物测定来评估含有TACI的WT或vTD蛋白用于阻断Jurkat/NF-κB/TACI细胞中APRIL或BAFF介导的经由TACI受体的配体信号传导的功能表征。通过监测细胞中的萤光素酶产生,对APRIL或BAFF介导的配体信号传导进行定量。评估含有SEQ ID NO:26中所示的vTD的TACI-Fc融合物的结合(26TACI CRD2-Fc)。对于比较,还评估仅含TACI的CRD2结构域的WT TACI-Fc(13TACI CRD2-Fc)。

[0490] 如图3A中所示,示例性TACI vTD显示增加的对人APRIL和BAFF二者的抑制。如图3B所示,示例性TACI vTD-Fc分子抑制小鼠APRIL和BAFF配体信号传导。总之,结果显示TACI vTD分子阻断APRIL和BAFF TACI介导的配体信号传导的能力。

[0491] 在另一项类似研究中,评估如实施例1中所述的示例性生成的分子阻断Jurkat/

NF-κB/TACI细胞中APRIL或BAFF介导的配体信号传导的能力。对于比较,生成含有与SEQ ID NO:73中所示的Fc序列融合的野生型TACI ECD的对照分子。在一种对照中,融合蛋白含有WT TACI(TACI 30-110,SEQ ID NO:130;对应于阿塞西普中的TACI ECD部分,SEQ ID NO:132)。在另一种对照中,融合蛋白含有WT TACI(TACI 13-118,SEQ ID NO:131,对应于泰它西普中的TACI ECD部分)。将活性与对照分子相比较。还将活性与抗BAFF单克隆抗体贝利木单抗相比较。

[0492] 将示例性TACI分子(WT或变体TACI vTD)逐步调整(在100,000pM-32pM之间),将其添加至2nM重组人APRIL或BAFF并如上文针对Jurkat/NF-κB测定所述进行测定。如图4中所示,含有TACI vTD的示例性分子展现大于TACI 30-100-Fc、TACI 13-118-Fc和贝利木单抗的增强的APRIL和BAFF阻断。仅含TACI的CRD2结构域的WT TACI-Fc(13TACI CRD2-Fc)也展现大于TACI 30-100-Fc和TACI 13-118-Fc的增强的APRIL阻断。

[0493] 这些结果与如下发现一致:与还含有如存在于阿塞西普和泰它西普中的CRD1结构域的部分的TACI ECD分子相比,最小CRD2结构域(含有氨基酸残基68-110)展现改进的APRIL阻断。表E1.B提供图4中所述的示例性分子抑制APRIL和BAFF介导的TACI信号传导的半最大抑制浓度(IC50)的值。括号中还显示每种测试分子与阿塞西普相比的相对阻断(Δ阿塞西普)。

表E1.B. TACI vTD相比于阿塞西普的生物活性

描述	SEQ ID NO	IC50 (nM) APRIL	IC50 (nM) APRIL (Δ TACI 30-110-Fc)	IC50 (nM) BAFF (Δ TACI 30-110-Fc)
26 TACI CRD2-Fc	26	179	179 (0.05)	1216 (0.21)
27 TACI CRD2-Fc	27	262	262 (0.07)	1387 (0.24)
29 TACI CRD2-Fc	29	339	339 (0.09)	1336 (0.23)
13 TACI CRD2-Fc	13	369	369 (0.10)	1328 (0.23)
TACI 13-118-Fc		9103	9103 (2.37)	7699 (1.33)
贝利木单抗		214911	214911 (55.84)	2496 (0.43)
TACI 30-110-Fc		3849	3849 (1.00)	5771 (1.00)

[0494] 在另一项研究中,在实施例2中所述的基于细胞系的体外生物测定中,在存在重组人或小鼠APRIL和/或BAFF(独立地或组合地)的情况下评估含vTD结构域的分子26TACI CRD2-Fc(含有SEQ ID NO:26中所示的vTD TACI结构域;Fc融合物SEQ ID NO:167)的生物活性。将不同浓度的含TACI结构域的分子与15nM APRIL、10nM BAFF或APRIL+BAFF(15nM APRIL+10nM BAFF)组合一起孵育。将活性与对照分子相比较。为了比较,测试了对应于阿塞西普(含有WT TACI 30-110SEQ ID NO:132;SEQ ID NO:130)或泰它西普/Tai'ai(RemeGen)的WT TACI-Fc序列。作为进一步的对照,还将不同浓度的含有来自贝利木单抗(Benlysta)或抗APRIL mAb BION-1301的序列(例如来自美国专利号10,377,830的SEQ ID NO:50和52)(各自单独的或共同的)的抗BAFF单克隆抗体(mAb)与APRIL、BAFF或BAFF+APRIL组合一起孵育。

[0495] 如图5A-图5C和表E1.C所示,示例性26TACI CRD2-Fc在大于或等于Fc融合蛋白阿塞西普、泰它西普以及单独或组合的贝利木单抗或BION-1301的水平上抑制配体信号传导。含有26TACI CRD2-Fc的融合蛋白中和BAFF和APRIL的组合活性。这些结果支持在基于细胞的报告物测定中变体TACI-Fc(26TACI CRD2-Fc)比WT TACI-Fc或组合的抗BAFF+APRIL mAb更有效地中和APRIL和BAFF活性。

表E1.C. IC50值			
测试品	IC50（pM）		
	BAFF	APRIL	BAFF + APRIL
26 TACI CRD2-Fc	1337	1758	1390
贝利木单抗	2263	--	> 100,000
BION-1310	--	4901	> 100,000
贝利木单抗 + BION-1310	6848	2100	6805
阿塞西普	8285	9258	7718
泰它西普	6852	17244	16751

实施例4.在体内小鼠狼疮模型中对TACIvTD-Fc的活性的评估.

[0496] 此实施例描述在体内鼠(NZB/NZW)F1自发狼疮模型中对示例性TACI vTD-Fc分子影响免疫应答的评估。(NZBxNZW)F1小鼠自发患上与人SLE非常相似的自身免疫性疾病,并且被视为该疾病的最佳小鼠模型之一。(NZB/NZW)F1小鼠在约20周龄开始具有高循环浓度的抗dsDNA抗体,且在约23周龄可检测到疾病的最初临床体征。所述小鼠患上通过肾小球基膜中的免疫复合物沉积介导的溶血性贫血、蛋白尿和进行性肾小球肾炎。

[0497] 每周两次经由腹膜内(IP)注射用14mg/kg Fc对照或摩尔匹配量的TACI vTD-Fc(26TACI CRD2-Fc)(17mg/kg)对(NZB/NZW)F1小鼠进行给药。处理从组分配(第22周龄)时开始,并且继续至研究结束。研究在小鼠达到第43周龄时结束,但是在一些动物垂死时在研究中较早将其安乐死。

[0498] 在20与40周龄之间的不同时间点,收集尿液和血清样品。当小鼠为20周龄时开始,每周用尿液分析测试条(Roche Chemstrip 2GP,目录号11895397160)确定研究中所有小鼠的尿液中的蛋白质浓度。每个处理组中随时间变化的平均蛋白尿得分呈现于图6A中,并且每组中体重的平均变化百分比(体重减轻与进行性疾病相关)绘图于图6B中。每个处理组中小鼠的存活率百分比绘图于图6C中。抗双链(ds)DNA IgG血清滴度由Hooke Laboratories,Inc.(劳伦斯,马萨诸塞州)使用其内部试剂盒测量,并且结果呈现于图6D中。在患有进行性疾病的这些小鼠中,血尿素氮(BUN)水平增加。在终止研究时(或在提前死亡的小鼠死亡时),每个处理组的BUN水平显示于图6E中。使用Student's t检验进行统计学分析;****表示$p<0.0001$并且***表示$p=0.0008$。

[0499] 在终止时从每只小鼠收集肾脏并在重复过碘酸希夫(PAS)染色切片中使用Alperovich G等人,2007.Lupus 16:18-24中所述的标准进行组织学分析。由不了解处理和临床得分的病理学家对所有肾脏切片进行盲分析。使用0至3的评分系统对肾小球病变(系膜扩张、毛细管内增生、肾小球沉积和毛细管外增生)和肾小管/间质病变(间质浸润、肾小管萎缩和间质纤维化)进行半定量的分析和分级,其中0=无变化,1=轻度变化,2=中度变化,且3=重度变化。将每只小鼠的总组织学得分计算为单独得分之和(最大总分为21)。总肾小球病变、总肾小管和间质病变以及总肾病变的肾脏得分显示于图6F中;如与Fc对照处理的小鼠相比,在用TACI vTD-Fc处理的动物中观察到显著改进的肾组织病理学(相比于Fc组,$p<0.0001$)。

[0500] 对于图6G-图6I,在研究终止时从每只小鼠收集右肾,称重,横向解剖,并在单一最适切割温度化合物(OCT)块中冷冻,之后切片并进行小鼠IgG和小鼠补体C3的免疫组织化学(IHC)染色,以分别评估肾小球IgG和C3沉积。将肾脏切片用丙酮进行渗透化处理并用以下进行染色:以1:25稀释于初级抗体稀释剂(Leica Biosystems)中的FITC缀合的大鼠单克隆

抗小鼠补体成分C3(Cedarlane),或者以1:200稀释于初级抗体稀释剂中的AF594缀合的山羊抗小鼠IgG(Thermo Fisher Scientific)。由病理学家基于Kelkka等人(2014)Antioxid Redox Signal.21:2231-45中所述的方法使用0至4的半定量评分系统来分析IgG和C3的肾小球沉积,其中0＝无沉积,1＝轻度系膜沉积,2＝明显系膜沉积,3＝系膜和轻微毛细管沉积,且4＝重度系膜和系膜毛细管沉积。如与Fc对照处理的小鼠相比,在用26TACI CRD2-Fc处理的动物中观察到显著减少的肾小球IgG和C3(对于IgG,相比于Fc对照组,$p<0.0001$;并且对于C3,$p=0.0005$);使用Student's t检验分析数据中的统计学上显著的差异。与Fc对照相比,26TACI CRD2-Fc也减少涎腺炎(图6J;相对于Fc对照组,$p<0.0001$)。

[0501] 因此,结果共同显示,与Fc对照相比,26TACI CRD2-Fc减少抗双链(ds)DNA自身抗体、涎腺炎、肾小球肾炎、BUN、蛋白尿和死亡率。

[0502] 结果证实,在(NZB/NZW)F1小鼠SLE模型中,TACI vTD-Fc能够显著抑制蛋白尿,保持体重,增强总体存活,减少抗dsDNA自身抗体和BUN,减少IgG和C3肾沉积,并预防或改善肾脏疾病。示例性分子也能够有效减少这些小鼠的脾脏和淋巴结中的B细胞和T细胞子集,包括浆细胞、滤泡T辅助细胞、生发中心细胞和记忆T细胞(数据未显示)。

实施例5:在添加鉴定的突变的情况下对TACI13-118-Fc的活性的评估

[0503] 评估实施例1中鉴定的TACI突变(参见表1)的影响以确定它们调节含有更长TACI ECD序列(含有CRD1和CRD2结构域二者)的Fc融合蛋白的活性的能力。在此实施例中,将示例性突变K77E、F78Y和Y102D引入参考TACI ECD 13-118中,其与SEQ ID NO:73中所示的示例性Fc序列融合。将活性与仅含具有相同突变的CRD2结构域(SEQ ID NO:26中所示)的TACI vTD-Fc融合蛋白或者与WT TACI(30-110,SEQ ID NO:130;对应于阿塞西普中的TACI ECD部分,SEQ ID NO:132)相比较,它们各自也与SEQ ID NO:73中所示的Fc序列融合。使用实施例2中描述的基于细胞系的生物测定来评估对Jurkat/NF-κB/TACI细胞中APRIL或BAFF介导的经由TACI受体的配体信号传导的阻断。通过监测细胞中的萤光素酶产生对APRIL或BAFF介导的经由TACI受体的配体信号传导进行定量。

[0504] 如图7中所示,相对于相应WT TACI 13-118ECD(菱形)或替代性ECD对照WT TACI 30-110(上三角),将K77E、F78Y和Y102D突变引入TACI 13-118ECD中以生成变体(K77E/F78Y/T102D)TACI 13-118改进APRIL和BAFF阻断(分别地)。然而,即使将所述突变掺入TACI 13-118ECD中,具有相同突变但仅含TACI的CRD2结构域(SEQ ID NO:26中所示的vTD)的更短的变体TACI在此测定中展现最大的APRIL和BAFF阻断(下三角)。这些结果确认,最小的含有CRD2的结构域赋予阻断APRIL和BAFF介导的TACI信号传导的改进的活性,然而,突变K77E/F78Y/Y102D也进一步增强掺入所述突变的变体TACI ECD的APRIL和BAFF阻断。

[0505] 表E2提供图7中所述的示例性分子抑制APRIL和BAFF介导的TACI信号传导的半最大抑制浓度(IC50)的值。还显示每种分子与WT TACI-Fc对照(Δ阿塞西普)的比较。

表E2. 多结构域免疫调节蛋白相比于阿塞西普的生物活性					
描述	SEQ ID NO	IC50 (nM) APRIL	IC50 (nM) APRIL (Δ TACI 30-110)	IC50 (nM) BAFF	IC50 (nM) BAFF (Δ TACI 30-110)
26 TACI-Fc	26	214	214 (0.05)	1268	1268 (0.28)
TACI 13-118	131	7811	7811 (1.81)	8452	8452 (1.88)
TACI 13-118, 具有 K77E/F78Y/Y102D		848	848 (0.20)	2048	2048 (0.46)
TACI 30-110		4317	4317 (1.00)	4490	4490 (1.00)

实施例6:在体内KLH免疫模型中对TACIvTD-Fc的比较性评价

[0506] 此实施例描述对示例性测试的单一结构域Fc融合蛋白(实施例1中所述)影响小鼠体内对钥孔戚血蓝蛋白(KLH)的免疫应答的评估。可以使用小鼠KLH免疫模型来评价在KLH的一次或两次注射后,免疫调节分子对针对T细胞依赖性抗原KLH的抗原特异性应答的作用。KLH的两次注射(每次相隔至少7天)提供如下模型,所述模型可以评价第1次KLH注射后的初级免疫应答和第2次注射后的时间段中的次级免疫应答二者。此实施例描述一项研究,所述研究评价多种含有TACI单一结构域的分子(如格式化为Fc融合物的可溶性野生型(WT)或变体TACI vTD)在没有佐剂的情况下响应KLH的两次注射(在研究第0天和第12天)的活性。将这些测试品与施用摩尔匹配水平的Fc同种型对照蛋白相比较。在小鼠KLH模型中观察到的测试品的活性通常可以预测所述测试品在人体中的免疫调节作用。

[0507] 为了开始KLH研究,将10周龄雌性C57/BL6NJ小鼠(The Jackson Laboratories,加利福尼亚州萨克拉门托)随机化为12个组,每组5只小鼠。在第0天和第12天经由腹膜内(IP)注射向小鼠施用0.25mg KLH(EMD Millipore,目录号374825-25MG);在注射前将KLH的原始商业原液用杜氏磷酸盐缓冲盐水(DPBS)稀释至适当浓度。如表E3中所概述经由IP注射用测试品对小鼠给药(在第4天和第11天给药)。测试品的剂量与15mg/kg TACI-Fc摩尔匹配。六只小鼠保持不处理/不注射作为未处理对照(第13组)。在第5天(第1剂量后24h)、第12天(第2剂量后/KLH加强前24h)和第20天手机血清以评价药物暴露、ADA和/或抗KLH抗体水平。第10组中的一只动物接受不完整剂量的测试品,并因此将其从研究去除。

表E3. 测试品描述和给药方案						
组号	小鼠数量	测试品 (多个)	剂量水平 (mg/剂)	(mg/kg)	剂量时间表 (D=研究天数)	递送途径
1	5	Fc对照	0.225	11.3	D4和D11	IP
5	5	TACI 30-110 – Fc	0.306	15.3	D4和D11	IP
6	5	TACI 13-118 – Fc	0.327	16.4	D4和D11	IP
7	5	26 TACI CRD2-Fc	0.271	13.6	D4和D11	IP
8	5	27 TACI CRD2-Fc	0.271	13.6	D4和D11	IP
9	5	29 TACI CRD2-Fc	0.272	13.6	D4和D11	IP
13	6	无 (未处理)	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A=不适用

[0508] 在第20天,将所有小鼠用异氟醚麻醉并将血液收集至血清分离器管中。处死小鼠,并取出它们的脾脏,称重并置入冰上的DPBS中。对全血进行离心,取出血清并储存于-80℃下直至通过酶联免疫吸附测定(ELISA)针对抗KLH水平进行分析。将脾脏处理成单细胞悬浮液,根据制造商的说明书使用RBC裂解缓冲液(Biolegend,目录号420301)裂解红细胞(RBC),并使用双重荧光活力利用吖啶橙/碘化丙啶(AO/PI)染色(Nexcelom,目录号CS2-

0106-5mL)对每个样品中的细胞进行计数。

[0509] 然后对每个脾脏样品进行染色以供使用以下方法的免疫细胞子集的流式细胞术分析:将1x10^{6}个活细胞置于两个96孔板(Corning,目录号3797;一个板用于B细胞特定测试组套,并且一个板用于T细胞特定测试组套)的孔中,以1500x g离心10秒,去除上清液,并用DPBS洗涤细胞沉淀两次。将沉淀重悬于100μL live-dead染色剂(LIVE/DEAD可固定浅绿色死细胞染色试剂盒,Life Technologies Corp.,1:1000稀释于DPBS中)中并在暗中在室温下孵育10min。在用流式细胞术缓冲液洗涤两次(每次175μL)后,将肿瘤沉淀重悬于Mouse BD Fc Block(用流动缓冲液以1:50稀释)中,并在暗中在RT下再孵育5min。在不再进行任何洗涤的情况下,将50μL的以下流式细胞术抗体的混合剂(稀释于流式细胞术缓冲液中)添加至B细胞组或T细胞组的每个细胞孔中。对于B细胞组,将以下抗体组合用于混合剂:抗小鼠CD19 BUV395(克隆1D3,Becton-Dickinson;1:100)、抗小鼠CD138 BV421(克隆281-2,BioLegend Inc.;1:100,终浓度)、抗小鼠CD3εBV510(克隆17A2,BioLegend Inc.;1:100,终浓度)、抗小鼠IgD BV605(克隆11-26c.2a,BioLegend Inc.;1:100,终浓度)、抗小鼠B220 BV785(克隆RA3-6B2,BioLegend Inc.;1:100,终浓度)、抗小鼠CD95 FITC(克隆SA367H8,BioLegend Inc.;1:100,终浓度)、抗小鼠CD23 PerCP Cy5.5(克隆B3B4,BioLegend Inc.;1:100,终浓度)、抗小鼠GL7 PE(克隆GL7,BioLegend Inc.;1:100,终浓度)、抗小鼠Gr1 PE Cy7(克隆RB6-8C5,BioLegend Inc.;1:100,终浓度)、抗小鼠CD21 APC(克隆7E9,BioLegend Inc.;1:100,终浓度)以及抗小鼠IgM APC Cy7(克隆RMM-1,BioLegend Inc.;1:100,终浓度)。对于T细胞组,将以下抗体组合用于混合剂:抗小鼠PD-1BV421(克隆29F.1A12,BioLegend Inc.;1:100,终浓度)、抗小鼠CD11b BV510(克隆M1/70,BioLegend Inc.;1:100,终浓度)、抗小鼠CD3εBV605(克隆145-2C11,BioLegend Inc.;1:100,终浓度)、抗小鼠CD8 BV785(克隆53-6.7,BioLegend Inc.;1:100,终浓度)、抗小鼠CD44 FITC(克隆IM7,BioLegend Inc.;1:100,终浓度)、抗小鼠CD4 PerCP Cy5.5(克隆GK1.5,BioLegend Inc.;1:100,终浓度)、抗小鼠CD62L PE(克隆MEL-14,BioLegend Inc.;1:100,终浓度)、抗小鼠CXCR5 PE Dazzle(克隆L138D7,BioLegend Inc.;1:100,终浓度)、抗小鼠CD25 PE Cy7(克隆PC61.5,BioLegend Inc.;1:100,终浓度)以及抗小鼠CD45 AF700(克隆30-F11,BioLegend Inc.;1:100,终浓度)。将所述细胞与抗体混合剂中的一种在暗中在冰上在温和混合下一起孵育45min,之后用流式细胞术缓冲液洗涤两次(每次洗涤175μL)。将细胞沉淀重悬于200μL流式细胞术缓冲液中并收集于LSRII流式细胞仪上。使用FlowJo软件10.2版(FlowJo LLC,美国)分析数据,并使用GraphPad Prism软件(8.1.2版)图形化。关键细胞子集分析包括:总B细胞(B220$^+$细胞)、边缘区(MZ)B细胞(B220$^+$、CD19$^+$、CD23$^-$、CD21^{高}、IgM^{高}细胞)、生发中心(GC)B细胞(B220$^+$、CD19$^+$、GL7$^+$、CD95$^+$细胞)、T滤泡辅助(Tfh)细胞(CD45$^+$、CD3$^+$、CD4$^+$、PD-1$^+$、CD185$^+$细胞)、CD4$^+$T效应记忆(T_{em})细胞(CD45$^+$、CD3$^+$、CD4$^+$、CD44$^+$、CD62L$^-$细胞)以及CD8$^+$$T_{em}$细胞(CD45$^+$、CD3$^+$、CD8$^+$、CD44$^+$、CD62L$^-$细胞)。

[0510] 通过单因素方差分析(ANOVA)和未校正的Fisher最小显著差异(LSD)多重比较检验使用GraphPad Prism软件(8.1.2版)来确定组间的统计学上显著的差异($p<0.05$)。

[0511] 为了确定与Fc同种型对照(SEQ ID NO:73)相比,测试品抑制KLH介导的抗体免疫应答的程度,在两个ELISA测定中评价血清样品中抗KLH抗体的浓度。ELISA测定测量血清中的IgM特异性或IgG1特异性抗KLH水平。将多种稀释度的小鼠血清样品在涂布有KLH的板中

孵育,之后洗涤并用1:2000山羊抗小鼠IgG1:HRP或1:5000山羊抗小鼠IgM:HRP进行检测。使用TMB底物试剂盒(SeraCare)实现显色,并且在酶标仪(SpectraMax®iD3酶标仪,Molecular Devices LLC)上分析ELISA板。所述测定不存在标准曲线,因此使用光学密度(OD)来比较抗KLH抗体的水平;OD越高,血清样品中抗KLH抗体的水平越高。对于抗KLH IgM OD水平,数据呈现于图10A(初次应答)、图10B(再次应答)中,并且通过单因素ANOVA和未校正的Fisher's LSD多重比较检验进行的统计学分析分别呈现于表E4和表E5中。抗KLH IgG1 OD水平呈现于图10C(初次应答)、图10D(再次应答)中,并且通过单因素ANOVA和未校正的Fisher's LSD多重比较检验进行的统计学分析呈现于表E6和表E7中。结果证实,在初次免疫应答期间,与Fc对照处理相比,每种测试品能够显著降低血清中的抗KLH IgM水平,其中在所有测试品中,29TACI-CRD2-Fc(SEQ ID NO:29)显示最大降低,并且TACI 30-110-Fc和TACI 13-118-Fc处理具有最小作用(图10A)。对于第20天的再次应答,在第2剂和最后一剂测试品后9天测量,除了TACI 13-118-Fc外的所有测试品都诱导抗KLH IgM水平的显著降低,其中除了TACI 30-110-Fc、TACI 13-118-Fc外的所有测试品都显示降低(图10B)。在初次免疫应答期间,与Fc对照相比,每种测试品还能够显著降低抗KLH IgG1水平,其中除了TACI 30-110-Fc、TACI 13-118-Fc的所有测试品仍显示最大降低(图10C)。对于针对KLH的再次应答,除了TACI 30-110-Fc、TACI 13-118-Fc外的所有测试品显著降低抗KLH IgG1的水平(图10D)。这些结果表明,在此小鼠免疫模型中,在降低对KLH的T细胞依赖性抗体免疫应答方面,大多数含有TACI vTD的分子是有效的,其中26TACI CRD2-Fc、27TACI CRD2-Fc和29TACI CRD2-Fc展现最显著的作用。

表E4. 抗KLH IgM OD水平的统计学分析(初次应答;图10A)

比较	p值	显著?
Fc对照与TACI 30-110-Fc	< 0.0001	是
Fc对照与TACI 13-118-Fc	< 0.0001	是
Fc对照与26 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	是
Fc对照与27 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	是
Fc对照与29 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	是
Fc对照与未处理	< 0.0001	是

表E5. 抗KLH IgM OD水平的统计分析(再次应答;图10B)

比较	p值	显著?
Fc对照与TACI 30-110-Fc	0.0283	是
Fc对照与TACI 13-118-Fc	0.4653	否

表E5. 抗KLH IgM OD水平的统计分析（再次应答；图10B）		
比较	p值	显著?
Fc对照与26 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	是
Fc对照与27 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	是
Fc对照与29 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	是
Fc对照与未处理	< 0.0001	是

表E6. 抗KLH IgG1 OD水平的统计学分析（初次应答；图10C）		
比较	p值	显著?
Fc对照与TACI 30-110-Fc	0.0218	是
Fc对照与TACI 13-118-Fc	0.0093	是
Fc对照与26 TACI CRD2-Fc	0.0012	是
Fc对照与27 TACI CRD2-Fc	0.0002	是
Fc对照与29 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	是
Fc对照与未处理	< 0.0001	是

表E7. 抗KLH IgG1 OD水平的统计学分析（再次应答；图10D）		
比较	p值	显著?
Fc对照与TACI 30-110-Fc	0.5367	否
Fc对照与TACI 13-118-Fc	0.1477	否
Fc对照与26 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	是
Fc对照与27 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	是
Fc对照与29 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	是
Fc对照与未处理	< 0.0001	是

[0512] 如图11A和图11B中所示，在研究结束时(第20天)，与Fc对照处理的小鼠相比，用除了TACI 30-110-Fc或TACI 13-118-Fc外的所有测试品处理的小鼠具有显著更小的脾脏，如分别依据重量和细胞数量所评估(表E8)。用每种测试品处理的小鼠还具有与Fc对照组相比显著更少的脾细胞。更小的脾脏指示淋巴细胞的减少，这可能对与加强的免疫应答相关的自身免疫性和炎性疾病(特别是由B细胞和/或T细胞驱动的那些)的发病机制具有免疫调节作用。脾脏重量和总细胞数量的统计学分析分别显示于表E8和表E9中。

表E8. 这对脾脏重量在所有处理组中的统计学比较（图11A）：						
处理组	Fc对照	TACI 30-110-Fc	TACI 13-118-Fc	541 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110 – Fc	ns					
TACI 13-118 – Fc	ns	ns				
26 TACI CRD2-Fc	0.0062	0.0172	0.0319			
27 TACI CRD2-Fc	0.0097	0.0261	0.0469	ns		
29 TACI CRD2-Fc	0.0181	0.0435	ns	ns	ns	
未处理	0.041	ns	ns	ns	ns	ns

表E9. 针对脾细胞数量在所有处理组之间的统计学比较（图11B）						
处理组	Fc对照	TACI 30-110-Fc	TACI 13-118-Fc	26 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110 – Fc	0.0022					

表E9. 针对脾细胞数量在所有处理组之间的统计学比较（图11B）						
处理组	Fc对照	TACI 30-110-Fc	TACI 13-118-Fc	26 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
TACI 13-118 – Fc	0.0079	ns				
26 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	0.0099	0.0029			
27 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	0.004	0.0011	ns		
29 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	ns	0.0227	ns	ns	
未处理	< 0.0001	ns	0.0241	ns	ns	ns

[0513] 对自身免疫性和炎性疾病的发病机制特别重要的是促进B细胞存活和分化、抗体产生和T细胞效应记忆的细胞类型。这些细胞类型包括但不限于以下：总B细胞、边缘区(MZ)B细胞、生发中心(GC)B细胞、T滤泡辅助(Tfh)细胞以及$CD4^+$和$CD8^+$T效应记忆(T_{em})细胞。可预期作用机制包括减少这些细胞类型的治疗药在多种自身抗体介导的疾病的治疗中有效。与其余处理组相比，用任何TACI vTD-Fc测试品处理显著减少多个脾B细胞子集的数量，包括对以下的影响：过渡-2($B220^+CD19^+CD23^+CD21^{高}IgM^{高}$)、滤泡($B220^+CD19^+CD23^+CD21^+IgM^+$)、边缘区($B220^+CD19^+CD23^{neg}$ $CD21^{高}IgM^{高}$)、生发中心($B220^+CD19^+GL7^+CD95^+$)以及浆细胞($B220^{低}CD19^+CD138^{高}$)(图12和图13)。在减少在B细胞存活和分化和抗体产生中重要的这些群体的百分比(未显示)或数量的能力方面，这些TACI vTD-分子与两种WT TACI-Fc分子(TACI 13-188-Fc和TACI 30-110-Fc)同样有效或比所述两种WT TACI-Fc分子更有效。来自第20天脾细胞的流式细胞术数据的统计学分析显示于表E10-表E28中。

[0514] 与Fc对照组相比，脾CD3+、CD4+或CD8+T细胞群体在很大程度上不受6种含有TACI vTD的测试品的影响(图14A-图14C)，并且与Fc对照组相比，Tcm和Tem记忆T细胞不受影响(图15)。如与Fc对照相比，所有测试品都减少滤泡辅助T细胞($CD45^+$、$CD3^+$、$CD4^+$、$PD\text{-}1^+$、$CD185^+$)的数量，所述滤泡辅助T细胞与生发中心中的B细胞相互作用并且是T细胞依赖性抗体应答的重要贡献者(图14D)。

表E10. 相比于Fc对照组，脾B细胞子集—细胞数量的统计学分析（图12）						
比较	T1 B细胞	T2 B细胞	滤泡B细胞	边缘区B细胞	GC B细胞	浆细胞
Fc对照与TACI 30-110-Fc	0.2738	0.4820	< 0.0001	< 0.0001	0.0152	< 0.0001
Fc对照与TACI 13-118-Fc	0.5942	0.0045	< 0.0001	< 0.0001	0.0115	0.0012
Fc对照与26 TACI CRD2-Fc	0.9402	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Fc对照与27 TACI CRD2-Fc	0.4679	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Fc对照与29 TACI CRD2-Fc	0.9061	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Fc对照与未处理	0.2333	0.0241		< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

表E11.相比于Fc对照组，脾T细胞子集—细胞数量的统计学分析（图14A-图14D）				
比较	CD3+ T细胞	CD8+ T细胞	CD4+ T细胞	CD4+ Tfh细胞
Fc对照与TACI 30-110-Fc	0.7623	0.5177	0.2474	< 0.0001
Fc对照与TACI 13-118-Fc	0.7210	0.6151	0.2739	0.0001
Fc对照与26 TACI CRD2-Fc	0.1513	0.6863	0.0261	< 0.0001
Fc对照与27 TACI CRD2-Fc	0.1209	0.8049	0.0095	< 0.0001
Fc对照与29 TACI CRD2-Fc	0.4042	0.7596	0.0728	< 0.0001
Fc对照与未处理	0.0038	0.0086	0.0029	< 0.0001

表E12.相比于Fc对照组，脾T细胞子集—细胞数量的统计学分析（图15）						
比较	幼稚CD4+ T细胞	CD4+ Tcm细胞	CD4+ Tem细胞	幼稚CD8+ T细胞	CD8+ Tcm细胞	CD8+ Tem细胞
Fc对照与TACI 30-110-Fc	0.4484	0.0695	0.0088	0.9952	0.2531	0.1411
Fc对照与TACI 13-118-Fc	0.4336	0.1831	0.0355	0.8153	0.3456	0.0729
Fc对照与26 TACI CRD2-Fc	0.1548	0.0003	< 0.0001	0.5016	0.7516	0.7624
Fc对照与27 TACI CRD2-Fc	0.0824	< 0.0001	< 0.0001	0.5055	0.8187	0.2444
Fc对照与29 TACI CRD2-Fc	0.2292	0.0015	0.0004	0.5929	0.3311	0.1632
Fc对照与未处理	0.0433	0.0516	< 0.0001	0.0782	0.0016	0.0166

表E13. 针对T1 B细胞的数量在所有处理组之间的统计学比较						
处理组	Fc对照	TACI 30-110-Fc	TACI 13-118-Fc	26 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110 – Fc	ns					
TACI 13-118 – Fc	ns	ns				
26 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns			
27 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns	ns		
29 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns	ns	ns	
未处理	ns	ns	ns	ns	ns	ns

表E14. 针对T2 B细胞的数量在所有处理组之间的统计学比较						
处理组	Fc对照	TACI 30-110-Fc	TACI 13-118-Fc	26 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110 – Fc	ns					
TACI 13-118 – Fc	0.0042	0.0268				
26 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001			
27 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	ns		
29 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	ns	ns	
未处理	0.0231	0.0033	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

表E15. 针对滤泡B细胞的数量在所有处理组之间的统计学比较						
处理组	Fc对照	TACI 30-110-Fc	TACI 13-118-Fc	26 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110 – Fc	< 0.0001					
TACI 13-118 – Fc	< 0.0001	ns				
26 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001			
27 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	ns		
29 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	ns	ns	
未处理	< 0.0001	ns	ns	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

表E16. 针对边缘区B细胞的数量在所有处理组之间的统计学比较						
处理组	Fc对照	TACI 30-110-Fc	TACI 13-118-Fc	26 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110 – Fc	< 0.0001					
TACI 13-118 – Fc	< 0.0001	ns				

表E16. 针对边缘区B细胞的数量在所有处理组之间的统计学比较

处理组	Fc对照	TACI 30-110-Fc	TACI 13-118-Fc	26 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
26 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	ns	ns			
27 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	ns	ns	ns		
29 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	ns	ns	ns	ns	
未处理	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

表E17. 针对生发中心B细胞的数量在所有处理组之间的统计学比较

处理组	Fc对照	TACI 30-110-Fc	TACI 13-118-Fc	26 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110 – Fc	0.0182					
TACI 13-118 – Fc	0.0139	ns				
26 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	0.0036	0.0049			
27 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	0.0008	0.0011	ns		
29 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	0.0403	ns	ns	ns	
未处理	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	ns	ns	0.0601

表E18. 针对浆细胞的数量在所有处理组之间的统计学比较

处理组	Fc对照	TACI 30-110-Fc	TACI 13-118-Fc	26 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110 – Fc	< 0.0001					
TACI 13-118 – Fc	0.0016	ns				
26 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	0.0007	< 0.0001			
27 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	0.0024	0.0001	ns		
29 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	0.0028	0.0002	ns	ns	
未处理	< 0.0001	ns	0.0211	0.0236	ns	ns

表E19. 针对CD3+ T细胞的数量在所有处理组之间的统计学比较

处理组	Fc对照	TACI 30-110-Fc	TACI 13-118-Fc	26 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110 – Fc	ns					
TACI 13-118 – Fc	ns	ns				
26 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns			
27 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns	ns		
29 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns	ns	ns	
未处理	0.0038	0.0089	0.0104	ns	ns	ns

表E20. 针对CD4+ T细胞的数量在所有处理组之间的统计学比较

处理组	Fc对照	TACI 30-110-Fc	TACI 13-118-Fc	26 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110 – Fc	ns					
TACI 13-118 – Fc	ns	ns				
26 TACI CRD2-Fc	0.0261	ns	ns			
27 TACI CRD2-Fc	0.0095	ns	ns	ns		
29 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns	ns	ns	

表E20. 针对CD4+ T细胞的数量在所有处理组之间的统计学比较

处理组	Fc对照	TACI 30-110-Fc	TACI 13-118-Fc	26 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
未处理	0.0029	0.062	ns	ns	ns	ns

表E21. 针对CD8+ T细胞的数量在所有处理组之间的统计学比较

处理组	Fc对照	TACI 30-110-Fc	TACI 13-118-Fc	26 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110 – Fc	ns					
TACI 13-118 – Fc	ns	ns				
26 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns			
27 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns	ns		
29 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns	ns	ns	
未处理	0.023	0.0051	0.0072	ns	0.0387	0.0167

表E22. 针对滤泡辅助T细胞的数量在所有处理组之间的统计学比较

处理组	Fc对照	TACI 30-110-Fc	TACI 13-118-Fc	26 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110 – Fc	< 0.0001					
TACI 13-118 – Fc	0.0001	ns				
26 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	ns	0.0078			
27 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	ns	0.0058	ns		
29 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	ns	0.0293	ns	ns	
未处理	< 0.0001	ns	ns	0.0472	0.036	ns

表E23. 针对幼稚CD4+ T细胞的数量在所有处理组之间的统计学比较

处理组	Fc对照	TACI 30-110-Fc	TACI 13-118-Fc	26 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110 – Fc	ns					
TACI 13-118 – Fc	ns	ns				
26 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns			
27 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns	ns		
29 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns	ns	ns	
未处理	0.0433	ns	ns	ns	ns	ns

表E24. 针对CD4+ Tcm细胞的数量在所有处理组之间的统计学比较

处理组	Fc对照	TACI 30-110-Fc	TACI 13-118-Fc	26 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110 – Fc	ns					
TACI 13-118 – Fc	ns	ns				
26 TACI CRD2-Fc	0.0003	0.0488	0.0148			
27 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	0.0206	0.0056	ns		
29 TACI CRD2-Fc	0.0015	ns	0.0415	ns	ns	
未处理	ns	ns	ns	0.0453	0.0183	ns

表E25. 针对CD4+ Tem细胞的数量在所有处理组之间的统计学比较

处理组	Fc对照	TACI 30-110-Fc	TACI 13-118-Fc	26 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110 – Fc	0.0088					
TACI 13-118 – Fc	0.0355	ns				
26 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	0.0188	0.0043			
27 TACI CRD2-Fc	< 0.0001	0.0094	0.002	ns		
29 TACI CRD2-Fc	0.0004	ns	ns	ns	ns	
未处理	< 0.0001	0.0128	0.0026	ns	ns	ns

表E26. 针对幼稚CD8+ T细胞的数量在所有处理组之间的统计学比较

处理组	Fc对照	TACI 30-110-Fc	TACI 13-118-Fc	26 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110 – Fc	ns					
TACI 13-118 – Fc	ns	ns				
26 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns			
27 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns	ns		
29 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns	ns	ns	
未处理	ns	ns	ns	ns	ns	ns

表E27. 针对CD8+ Tcm细胞的数量在所有处理组之间的统计学比较

处理组	Fc对照	TACI 30-110-Fc	TACI 13-118-Fc	26 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110 – Fc	ns					
TACI 13-118 – Fc	ns	ns				
26 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns			
27 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns	ns		
29 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns	ns	ns	
未处理	0.0016	< 0.0001	< 0.0001	0.0041	0.0032	0.0001

表E28.针对CD8+ Tem细胞的数量在所有处理组之间的统计学比较

处理组	Fc对照	TACI 30-110-Fc	TACI 13-118-Fc	26 TACI CRD2-Fc	27 TACI CRD2-Fc	29 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110 – Fc	ns					
TACI 13-118 – Fc	ns	ns				
26 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns			
27 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns	ns		
29 TACI CRD2-Fc	ns	ns	ns	ns	ns	
未处理	0.0166	0.0002	< 0.0001	0.0073	0.0005	0.0004

[0515] 总之,这些结果表明,抑制B细胞和/或T细胞活性的含有TACI vTD的单一结构域Fc融合分子可以减小由T细胞依赖性抗原KLH在体内介导的免疫应答和细胞子集变化(即血清中的抗KLH水平和免疫细胞子集的变化)。这些结果与单一TACI结构域B细胞抑制分子作为临床处理药在过度活跃的淋巴细胞起作用的自身免疫性和炎性疾病的治疗中的评价一致。

实施例7.含有TACI的分子对TACI介导的刺激的TACI阻断的生物活性评估

[0516] 生成另外的TACI vTD,其含有SEQ ID NO:26(K77E、F78Y、Y102D)、SEQ ID NO:27(Q75E、R84Q)或SEQ ID NO:29(K77E、A101D、Y102D)中所示的示例性TACI vTD中存在的一个或多个突变。生成来自Q75E、K77E、F78Y、R84Q、A101D和Y102D的突变的含有单一突变、双突

变和三突变的组合。将所得TACI vTD进一步格式化为具有Fc结构域的TACI vTD-Fc融合蛋白。基本上如实施例1中所述生成示例性生成的Fc融合蛋白。简言之,为了生成作为Fc融合蛋白的重组免疫调节蛋白,生成编码DNA以编码如下蛋白质:变体TACI结构域,之后是7个氨基酸的接头(GSGGGGS;SEQ ID NO:74),之后是按照用于免疫球蛋白蛋白质(SEQ ID NO:73)的Eu索引编号系统含有突变L234A、L235E和G237A的人IgG1无效应子Fc序列。对于比较,还测试以下分子:(1)WT TACI(68-110)-Fc(TACI 68-110,SEQ ID NO:13,TACI-Fc SEQ ID NO:171);以及(2)具有引入参考TACI ECD 13-118中的示例性突变K77E、F78Y和Y102D的TACI-Fc,其与SEQ ID NO:73中所示的示例性Fc序列融合;参见实施例5。另外的对照包括:(3)WT TACI(13-118)-Fc(TACI 13-118,SEQ ID NO:131;对应于泰它西普中的TACI ECD部分);(4)WT TACI(30-110)-Fc(TACI 30-110,SEQ ID NO:130;对应于阿塞西普中的TACI ECD部分,SEQ ID NO:132);(5)BAFF-R ECD以及(6)贝利木单抗。

[0517] 基本上如实施例2中所述来评估所生成的分子对Jurkat/NF-κB/TACI细胞中APRIL或BAFF介导的经由TACI受体的配体信号传导的阻断。示例性TACI vTD-Fc分子从100,000-6pM逐步调整,并且与30nM人APRIL或10nM人BAFF混合,30分钟后添加Jurkat/NF-kB/TACI细胞。通过监测细胞中的萤光素酶产生,对APRIL或BAFF介导的配体信号传导进行定量。

[0518] 结果作为示例性测试的分子的半最大抑制浓度(IC50)总结于表E29中。IC50与参考对照WT TACI(68-110)-Fc(TACI 68-110,SEQ ID NO:13,TACI-Fc SEQ ID NO:171)相比的变化百分比示于括号中(ΔWT)。与上文描绘的结果类似,与其他测试的对照分子(包括具有与泰它西普和阿塞西普类似的序列的那些)相比,野生型最小CRD2 WT TACI(68-110)-Fc展现更优的APRIL和BAFF阻断。如所指示,某些突变和突变组合与阻断APRIL或BAFF介导的配体信号传导的能力的进一步显著增加相关。总之,结果显示TACI vTD分子阻断APRIL和BAFF TACI介导的配体信号传导的能力。

表E29. 示例性TACI vTD-Fc

SEQ ID NO	突变	APRIL IC_{50}（pM）（Δ WT）	BAFF IC_{50}（pM）（Δ WT）
26	K77E、F78Y、Y102D	9209 (0.75)	1552 (0.84)
27	Q75E、R84Q	11832 (0.96)	1461 (0.79)
29	K77E、A101D、Y102D	2914 (0.24)	1184 (0.64)
177	Q75E	1938 (0.16)	1457 (0.79)
32	K77E	159 (0.01)	1537 (0.83)
183	F78Y	176 (0.01)	1638 (0.88)
30	R84Q	566 (0.05)	5493 (2.96)
23	A101D	8382 (0.68)	1827 (0.99)
190	Y102D	11601 (0.94)	1863 (1.00)
178	Q75E、K77E	10709 (0.87)	1888 (1.02)
179	Q75E、F78Y	13431 (1.09)	1793 (0.97)
180	Q75E、A101D	19999 (1.62)	2357 (1.27)
181	Q75E、Y102D	11096 (0.90)	2147 (1.16)
191	K77E、F78Y	10110 (0.82)	1966 (1.06)
24	K77E、R84Q	4256 (0.35)	2258 (1.22)
25	K77E、A101D	2039 (0.17)	1957 (1.06)
192	K77E、Y102D	891 (0.07)	2178 (1.17)
184	F78Y、R84Q	2623 (0.21)	2260 (1.22)
185	F78Y、A101D	2015 (0.16)	1853 (1.00)
186	F78Y、Y102D	8492 (0.69)	1964 (1.06)
187	R84Q、A101D	11200 (0.91)	2346 (1.27)
188	R84Q、Y102D	12300 (1.00)	1864 (1.01)
189	A101D、Y102D	33570 (2.72)	1953 (1.05)
182	K77E、F78Y、R84Q	10058 (0.82)	2206 (1.19)
13	WT TACI (68-110)（SEQ ID NO: 171）	12321 (1.00)	1854 (1.00)
1	WT TACI (13-118) Fc1.3	-	7905 (4.26)
阿塞西普	-	-	7735 (4.17)
泰它西普	-	-	9172 (4.95)
泰它西普	-	-	7297 (3.94)
泰它西普+	K77E、F78Y、Y102D	13168 (1.07)	1988 (1.07)
BAFF-R	-	-	53226 (28.7)
贝利木单抗	-	-	2195 (1.18)

实施例8.在非肥胖糖尿病小鼠的舍格伦综合征模型中的评价

[0519] 此实施例描述在NOD小鼠的体内短期舍格伦综合征模型中对示例性单一结构域26-TACI-vTD Fc融合蛋白(TACI vTD SEQ ID NO:26;Fc融合物SEQ ID NO:167)的评估,包括对涎腺炎、测试分子的血清水平和胰岛炎的评估。

[0520] 舍格伦综合征模型是在雌性易患糖尿病的NOD/ShiLtJ小鼠(约6周龄)中通过抗mPD-L1抗体的重复给药来诱导的。具体而言,在第0天、第2天、第4天和第6天通过腹膜内注射施用0.1mg抗mPD-L1抗体。在第0天、第2天和第4天根据下表E30给药测试分子融合蛋白。

表E30. 处理组和给药方案					
组	N	抗 mPD-L1 处理（IP）	测试品（TA）	TA 剂量水平（IP）	mAb处理和TA给药天数
1	15	0.1 mg	Fc对照	0.28 mg	0、2、4、6和0、2、4
3	15	0.1 mg	26-TACI-CRD2 Fc	0.34 mg	0、2、4、6和0、2、4
6（未处理）	5	0	n/a	0	n/a

缩写:IP＝腹膜内(地);mg＝毫克;n/a＝不适用

[0521] 在第7天、第8天、第9天和第10天从小鼠尾静脉获得血液(2-5μL),将其置于ReliOn Prime血糖测试条上,并使用ReliOn Prime血糖测试系统测量血糖(mg/dL)。在实验第10天,处死小鼠并且收集和分析血清、下颌下腺(SMG)和胰腺。

[0522] 取出左SMG和胰腺,从相邻淋巴结解剖分离,并将其置入中性缓冲福尔马林(NBF)中持续约72小时,之后将其转移至70％乙醇中。将固定的组织包埋于石蜡中,切片,并在载玻片上用苏木精和伊红(H&E)染色。

[0523] 用于评价涎腺炎程度的评分系统按照Nandula等人2011(其中的表6;重制为表E31)进行评分,并且按照Gutierrez等人2014(其中的表7;重制为表E32)对胰岛炎进行评分。

表E31. 用于评价涎腺炎的组织学评分	
得分	标准
0	无炎性病灶
1	1-5个>50个炎性细胞的病灶
2	>5个无实质破坏的病灶
3	中度实质破坏
4	广泛实质破坏

表E32. 用于评价胰岛炎的组织学评分	
得分	标准
0	无胰岛炎
1	胰岛周围胰岛炎
2	中间胰岛炎
3	胰岛内胰岛炎
4	完全性胰岛炎

[0524] 使用Student's t检验来确定组织学得分在组间的统计学显著的差异。使用GraphPad PRISM®软件(8.1.2版)进行统计学分析,并且对于所有统计学检验,将p值<0.05视为统计学显著的。

[0525] 使用示例性26-TACI-CRD2 Fc融合蛋白的处理降低涎腺炎的发病率(图16A)并得到比Fc对照的平均得分显著更低的组织学得分($p<0.01$)(图16B)。这些结果与如下发现一致:在此舍格伦综合征模型中,用测试分子对注射抗PD-L1的NOD小鼠的处理降低涎腺炎的发病率和严重性二者。

[0526] 这些易患糖尿病的小鼠中胰岛炎的总体发病率和用测试分子处理后的胰岛炎程度显示于图17A和图17B中。26-TACI-CRD2 Fc融合蛋白显著降低胰岛炎程度,如通过组织学分析所评估(图17B)。

[0527] 总之,这些结果表明,在该小鼠舍格伦综合征模型中,用所测试的示例性TACI-Fc

分子处理降低涎腺炎的发病率和严重性。这些表明了TACI分子在用于治疗舍格伦综合征的治疗性用途中的潜力,以及TACI-CTLA-4多结构域堆叠分子作为治疗药影响人体中1型糖尿病的发作的潜力。

实施例9.示例性单体和四聚体构建体的评估.

[0528] 使用以下不同长度的WT TACI生成含有一个(单体)或四个(四聚杠铃和四聚串联)TACI vTD结构域的另外的TACI-Fc融合蛋白:68-110(SEQ ID NO:13中所示)、29-110(SEQ ID NO:1中所示)或13-118(SEQ ID NO:131中所示)以及SEQ ID NO:26中所示的TACI vTD(K77E、F78Y、Y102D)。单体和四聚TACI WT和TACI vTD格式化为具有Fc结构域的TACI WT和TACI vTD-Fc融合蛋白。示例性生成的Fc融合蛋白是基本上如实施例1中所述来生成,并且描述于表E33A-表E33C中。

[0529] 简言之,为了生成作为单链Fc融合蛋白的重组单体免疫调节蛋白,生成编码DNA以编码如下蛋白质:WT TACI或变体TACI结构域,之后是12个氨基酸的接头(GSGGGGSGGGGS;SEQ ID NO:194),之后是SEQ ID NO:218中所示的单链Fc(scFc)(由人IgG1无效应子Fc序列构成,其按照用于免疫球蛋白蛋白质(SEQ ID NO:73)的Eu索引编号系统含有突变L234A、L235E和G237A),之后是$(GGGGS)_{13}$接头(SEQ ID NO:195),之后是第二人IgG1无效应子Fc序列(其按照用于免疫球蛋白蛋白质的Eu索引编号系统含有突变L234A、L235E和G237A)。长接头(例如SEQ ID NO:195中所示)将第一Fc单元的C末端连接至第二Fc单元的N末端,形成scFc。所生成的分子总结于表E33A中。

表E33A. 示例性单体免疫调节蛋白

AA SEQ ID NO	NT SEQ ID NO	描述	TACI SEQ ID NO	接头 SEQ ID NO	FC SEQ ID NO
196	207	TACI WT 13 GS(G4S)2 (194) sc_Fc 218	13	194	218
199	210	TACI 26 GS(G4S)2 (194) scFc_218	26	194	218
203	214	TACI WT 1 GS(G4S)2 (194) scFc_218	1	194	218
205	216	TACI WT 131 GS(G4S)2 (194) scFc_218	131	194	218

[0530] 为了生成作为Fc融合蛋白的重组四聚免疫调节蛋白,以如下不同形式生成蛋白质:

[0531] 在一种形式中,生成编码DNA以编码如下三种不同的蛋白质形式:WT TACI(SEQ ID NO:198):WT TACI结构域SEQ ID NO:13,之后是接头(G4S)4SEQ ID NO:84;之后是WT TACI结构域SEQ ID NO:13;之后是接头GSGGGGS SEQ ID NO:74;之后是按照用于免疫球蛋白蛋白质(SEQ ID NO:73)的Eu索引编号系统含有突变L234A、L235E和G237A的人IgG1无效应子Fc序列。

[0532] 在一种形式中,生成编码DNA以编码如下三种不同的蛋白质形式:WT TACI(SEQ ID NO:202):WT TACI结构域SEQ ID NO:13,之后是接头GSGGGGS SEQ ID NO:74;之后是按照用于免疫球蛋白蛋白质(SEQ ID NO:73)的Eu索引编号系统含有突变L234A、L235E和G237A的人IgG1无效应子Fc序列,之后是接头(G4S)4SEQ ID NO:84,之后是WT TACI结构域SEQ ID

NO:13。

[0533] 在一种形式中,生成编码DNA以编码如下三种不同的蛋白质形式:TACI vTD杠铃(SEQ ID NO:201):SEQ ID NO:26中所示的TACI vTD,之后是接头GSGGGGS SEQ ID NO:74;之后是按照用于免疫球蛋白蛋白质(SEQ ID NO:73)的Eu索引编号系统含有突变L234A、L235E和G237A的人IgG1无效应子Fc序列,之后是接头(G4S)4SEQ ID NO:84,之后是SEQ ID NO:26中所示的TACI vTD。

表E33B. 示例性四聚免疫调节蛋白

AA SEQ ID NO	NT SEQ ID NO	描述	第一TACI	接头	第二TACI	接头	Fc
198	209	TACI WT 13 (G4S)4 (84) (TACI WT 13 GSG4S (74) Fc 73	13	84	13	74	73

表E33C. 示例性四聚免疫调节蛋白

AA SEQ ID NO	NT SEQ ID NO	描述	第一TACI	接头	FC	接头	第二TACI
202	213	TACI WT 13 GSG4S (74) Fc 73(G4S)4 (84) (TACI WT 13	13	74	73	84	13
201	212	TACI 26 GSG4S (74) Fc 73 (G4S)4 (84) TACI 26	26	74	73	84	26

A.示例性多结构域分子的生物活性

[0534] 在一项实验中,基本上如实施例1中所述,使用Jurkat/NF-κB/TACI报告细胞来评估表E33A-表E33C中所示的示例性分子对APRIL或BAFF介导的信号传导的阻断。针对对可溶性BAFF(3聚体)的抑制或针对对二十个BAFF 3聚体的寡聚物(BAFF 60聚体)的抑制来评估活性。表E34提供抑制APRIL和BAFF介导的TACI信号传导的半最大抑制浓度(IC50)的值。在一些情况下,不将所测试的蛋白质与其亲代WT对照作比较,并且在下表中表示为(-)。表E34中的结果证实,所有生成的形式都阻断BAFF和APRIL结合。

表E34.示例性单体和四聚免疫调节蛋白的评估

SEQ ID NO	描述	APRIL	BAFF IC_{50}	BAFF 60聚体

		IC_{50} (pM)	(pM)	IC_{50} (pM)
196	TACI WT 13 GS(G4S)2 (194) sc_Fc 218	-	5695	24081
198	TACI WT 13 (G4S)4 (84) (TACI WT 13 GSG4S (74) Fc 73	34554	3287	4333
202	TACI WT 13 GSG4S (74) Fc 73(G4S)4 (84) (TACI WT 13	11910	1039	2581
199	TACI 26 GS(G4S)2 (194) scFc_218	-	8237	106021
201	TACI 26 GSG4S (74) Fc 73 (G4S)4 (84) TACI 26	3762	779	778
203	TACI WT 1 GS(G4S)2 (194) scFc_218	-	4422	15801
205	TACI WT 131 GS(G4S)2 (194) scFc_218	-	4577	14268

实施例10.在药代动力学/药效学研究中对示例性TACIvTD-Fc在雄性SpragueDawley大鼠中单次静脉内输注后的评价.

[0535] 此实施例描述在HEK-293细胞系(26TACI CRD2-Fc(HEK-293))中产生或在CHOZN细胞系(26TACI CRD2-Fc(CHOZN))中产生的示例性变体融合蛋白26TACI CRD2-Fc当通过单次静脉内输注至雄性Sprague Dawley大鼠时的耐受性、药代动力学和药效学。

[0536] 将示例性变体融合蛋白26TACI CRD2-Fc(HEK-293)和26TACI vTD-Fc(CHOZN)在第1天经由静脉内团注以20mg/kg一次施用至每组3只雄性大鼠。基于来自用于给药的制剂的分析结果制备剂量配制品。

[0537] 评估的终点包括临床观察、食物消耗、体重和血清免疫球蛋白。在多个时间点收集血液以表征26TACI CRD2-Fc(HEK-293)和26TACI CRD2-Fc(CHOZN),并且随时间分析血清浓度。本研究的生命内部分在第22天完成。

[0538] 除了施用26TACI CRD2-Fc(CHOZN)的一只动物外,在给药后0.083小时观察两个测试品的T_{max}。基于平均C_{max}和AUC_{0-t}的暴露在两个测试品之间也相似。$t_{1/2}$在每组两只动物中是一致的(范围=3.66至4.89天),但在第三只动物中是可变的(26TACI CRD2-Fc(HEK-293)为10.3天,26TACI CRD2-Fc(CHOZN)为1.57天)。在本研究过程中未观察到26TACI CRD2-Fc(HEK-293)与26TACI CRD2-Fc(CHOZN)相比在临床观察、食物消耗变化或体重变化方面的差异(数据未示出)。经由团注(而不是缓慢输注)静脉内注射施用测试品,这种方法可能是观察到的动物间可变性的原因。

[0539] 对于26TACI CRD2-Fc(HEK-293),血清免疫球蛋白(IgM、IgA和IgG)浓度在第22天分别相比于基线平均下降86%、66%和45%,而对于26TACI CRD2-Fc(CHOZN)分别相比于基线平均下降77%、40%和25%(图18和图19)。对于26TACI CRD2-Fc(HEK-293)和(CHOZN),平均C_{max}分别为231和249μg/mL,并且平均AUC_{0-t}分别为473和554天*μg/mL。

[0540] 总之,经由单次静脉内团注向大鼠施用20mg/kg 26TACI CRD2-Fc(HEK-293)或26TACI CRD2-Fc(CHOZN)导致良好的耐受性以及相似的PK特征和相似的血清免疫球蛋白水

平降低。这些结果与以下发现一致:在哺乳动物HEK-293或CHO细胞中产生TACI-Fc融合蛋白导致相似的药代动力学/药效学。

实施例11.在药代动力学/药效学研究中示例性TACI vTD-Fc与WT TACI-Fc蛋白在雌性食蟹猴中单次静脉内输注后的比较.

[0541] 此实施例描述当通过单次静脉内输注经30分钟施用至食蟹猴时4种示例性变体TACI-Fc融合蛋白的药代动力学和药效学的评价。此实施例中的变体TACI-Fc融合蛋白是通过在CHOZN细胞中表达产生的。

[0542] 向雌性食蟹猴(2只/组)通过经30分钟(±3分钟)单次静脉内(IV)输注施用媒介物缓冲液(25 mM Tris,161 mM精氨酸,pH 7.5)(0 mg/kg)或9 mg/kg 26 TACI CRD2-Fc(SEQ ID NO:167)、26 TACI CRD2-Fc 81(SEQ ID NO:168)、TACI 13-118-Fc(对应于SEQ ID NO:131中所示的泰它西普中的TACI ECD部分与无效应子IgG1 Fc;SEQ ID NO:241)或TACI 13-118-Fc 81(SEQ ID NO:131中所示的TACI 13-118与野生型IgG1 Fc;SEQID NO:240),如表E35A所概述。作为另一种比较物,将结果与来自公开数据(Carbonatto等人(2008)Toxicol.Sci.105:200-210)的以1 mg/kg静脉内施用的阿塞西普进行比较。使用插入外周静脉中的与输注管线连接的临时导管施用剂量配制品。使用输注泵递送适当的体积。

TACI 13-118-Fc-81(SEQ ID NO:240)

SRVDQEERFPQGLWTGVAMRSCPEEQYWDPLLGTCMSCKTICNHQSQRTCAAFCRSLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPVNLPPELDKPHTCPLCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKATPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

TACI 13-118-Fc(SEQ ID NO:241;还参见美国专利8,193,316的SEQ ID NO:3)

SRVDQEERFPQGLWTGVAMRSCPEEQYWDPLLGTCMSCKTICNHQSQRTCAAFCRSLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPVNLPPELDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

表E35A:测试品描述和给药方案

组号	雌性食蟹猴的数量	测试品(多个)	剂量水平(mg/kg)	剂量体积(mL/kg)	递送途径
1	2	媒介物(25 mM Tris、161 mM精氨酸,pH 7.5)	0	2.5	IV
2	2	26 TACI CRD2-Fc;SEQ ID NO:167	9	2.5	IV
3	2	26 TACI CRD2-Fc 81(SEQ ID NO:168)	9	2.5	IV
4	2	TACI 13-118-Fc	9	2.5	IV
5	2	TACI 13-118-Fc 81	9	2.5	IV

药代动力学分析

[0543] 将血清PK数据导入Phoenix WinNonlin v8.3(Certara,新泽西州普林斯顿)进行分析。使用经IV输注给药的标准非房室模型估计单独动物PK参数。使用相对于输注开始的标称样品收集时间进行计算。使用上升段线性下降段对数(linear up/log down)梯形法估计AUC值。

血清PK

[0544] 每个测试品的单独动物血清浓度与时间曲线(平均值+范围)示于图20A中。在接受26TACI CRD2-Fc或26TACI CRD2-Fc 81的动物中,血清IgM、IgA和IgG的水平在第27天(在最低点处)相比于基线分别降低平均约60%、50%和30%(图21)。无论融合构建体包含无效应子Fc(SEQ ID NO:73)还是野生型Fc(SEQ ID NO:81),都观察到类似的结果。图20B显示与阿塞西普进一步比较的结果。图20B中的结果总结在表E35B中。

表E35B

	Cmax/剂量 (每mg/kg的μg/mL)	AUC/剂量 (每mg/kg的μg*h/mL)
26 TACI CRD2-Fc	27	1167
TACI 13-118-Fc	25	397
阿塞西普	23	215

[0545] 在单次9mg/kg IV剂量的26TACI CRD2-Fc之后,在两只给药动物中直到给药后34或26天分别可测量出血清浓度(LLOQ=19.5ng/mL)。在单次9mg/kg IV剂量的26TACI CRD2-Fc 81之后,在两只给药动物中直到给药后34或26天分别可测量出血清浓度(LLOQ=39ng/mL)。在单次9mg/kg IV剂量的26TACI CRD2-Fc之后,在两只给药动物中直到给药后26或20天分别可测量出血清浓度(LLOQ=156ng/mL)。在单次9mg/kg IV剂量的TACI 13-118Fc 81之后,在两只给药动物中直到给药后13天均可测量出血清浓度(LLOQ=156ng/mL)。

[0546] 在整个研究中全血的免疫分型表明,与基线值(第-8天至第-3天的平均值)相比,在第2-5组中在施用测试品后在淋巴细胞群体中观察到多个变化。图22描绘绝对细胞计数,并且图23描绘相比于基线的细胞%。尽管绝对细胞计数存在典型的动物间可变性,但在用26TACI CRD2-Fc、26TACI CRD2-Fc 81、TACI 13-118-Fc或TACI 13-118-Fc 81处理的动物中的各种B细胞子集与基线相比具有明显的降低(图22和图23)。具体地,在记忆B细胞(CD3-CD20+CD21+CD27+)中观察到绝对B细胞计数的降低和相比于基线的变化%,在第27天出现最低点,随后在第35和42天出现轻微上升趋势(图22和图23的右图)。所评价的其他B细胞子集(包括幼稚(CD3-CD20+CD21+CD27-)B细胞)中与测试品相关的改变并不明显,这可能归因于群体量小和动物间可变性。

[0547] 在所有四个测试品处理组中,在第20天和第27天观察到总T细胞(CD3+CD20-)和静息T细胞(CD3+Ki67-)的轻微减少。未观察到对相对不频繁的增殖性T细胞(CD3+Ki67+)的绝对计数或相对百分比的测试品相关影响(图24)。

[0548] 表E36描绘给药后的药代动力学(PK)参数。在IV给药后,在输注开始后0.0236天(即输注结束后0.083h,第一个测量的时间点)观察所有测试品的T_{max}。所有四个测试品之间基于平均C_{max}的暴露是相似的(在25%内)。然而,与TACI 13-118-Fc或TACI 13-118-Fc 81测试品相比,在26TACI CRD2-Fc和26TACI CRD2-Fc 81给药后基于AUC_{0-t}的暴露高约3至4倍。这种暴露差异对应于与TACI 13-118-Fc或TACI 13-118-Fc 81组相比在26TACI CRD2-Fc和26TACI CRD2-Fc 81组中的较低CL和V_{ss}(表3)。TACI 13-118-Fc显现出具有最长的$t_{1/2}$

(平均$t_{1/2}$=5.14天,相比之下,其他剂量组中为2.57至3.47天)。

[0549] 抗药物抗体(ADA)可能影响26TACI CRD2-Fc 81的PK特征,因为接受该测试品的两只动物到第26天时均产生了相对较高的滴度(≥1:1000)。来自所有其他剂量组的动物对于ADA呈阴性,或者具有相对较低的滴度(滴度=1:100)。

表E36 向雌性食蟹猴单次30分钟9 mg/kg IV输注后的非房室PK参数

组	测试品	ID	T_{max} 天	C_{max} μg/mL	$T_{最后}$ 天	AUC_{0-t} 天* μg/m	$AUC_{0-\infty}$ 天* μg/m	$t_{1/2}$ 天	CL mL/天/kg	Vss mL/kg	Vz mL/kg
			估计值								
2	26 TACI CRD2-Fc (SEQ ID NO: 167),	1	0.0236	252	34.0	470	470	3.08	19.1	71.1	85.1
		2	0.0236	231	26.0	402	402	2.12	22.4	74.2	68.7
		平均值	0.0236	242	30.0	436	436	2.60	20.8	72.6	76.9
3	26 TACI CRD2-Fc 81 (SEQ ID NO: 168)	3	0.0236	236	34.0	487	487	4.39	18.5	72.6	117
		4	0.0236	236	26.0	558	559	2.54	16.1	70.4	59.0
		平均值	0.0236	236	30.0	522	523	3.47	17.3	71.5	88.0
4	TACI 13-118 -Fc (SEQ ID NO:171)	5	0.0236	215	26.0	177	179	5.58	50.3	167	405
		6	0.0236	230	20.0	128	130	4.70	69.2	185	469
		平均值	0.0236	223	23.0	152	155	5.14	59.7	176	437
5	TACI 13-118 -Fc 81	7	0.0236	220	13.0	120	121	2.52	74.4	126	271
		8	0.0236	167	13.0	114	115	2.61	78.0	162	294
		平均值	0.0236	193	13.0	117	118	2.57	76.2	144	282

[0550] 总之,经由30分钟静脉内输注向雌性食蟹猴以9mg/kg单次施用26TACI CRD2-Fc、26TACI CRD2-Fc 81、TACI 13-118-Fc或TACI 13-118-Fc 81导致在与TACI 13-118-Fc或TACI 13-118-Fc 81组相比时26TACI CRD2-Fc和26TACI CRD2-Fc 81的较高暴露。与测试品相关的血清IgM、IgA和IgG浓度的降低在用26TACI CRD2-Fc或26TACI CRD2-Fc 81给药的动物中最显著,在第21天与第27天之间达到其最低点。在用测试品处理的动物中观察到CD20+CD21+B细胞群体的绝对计数和相比于基线的变化百分比的减少,其中在用26TACI CRD2-Fc或26TACI CRD2-Fc 81处理的动物中在第27天观察到最低水平。因此,26TACI CRD2-Fc和26TACI CRD2-Fc 81两者均展现比TACI 13-118-Fc或TACI 13-118-Fc81更高的总暴露和更有效的血清IgM、IgA和IgG降低。这些发现与四个TACI-Fc测试品的作用机制和相对体外效力一致。结果进一步支持26TACI CRD2-Fc融合蛋白显示有利的特征,包括更高的血清暴露和更有效的免疫抑制活性,甚至与WT TACI-Fc融合蛋白相比也是如此。这些结果可以支持比WT TACI-Fc治疗剂更低的临床剂量和/或更长的给药间隔,包括用于治疗多种自身免疫性和炎性疾病,特别是B细胞相关疾病,如系统性红斑狼疮(SLE)、舍格伦综合征(SjS)和其他结缔组织疾病。

实施例12.临床剂量选择和药代动力学建模

[0551] 此实施例描述示例性测试品26TACI CRD2-Fc的临床剂量的选择和药代动力学建

模。

[0552] 基于来自实施例11中描述的食蟹猴研究的PK数据和异速生长缩放方法预测人药代动力学(PK)。假设不同剂量水平的线性PK以预测人暴露。基于预测的人PK以及实施例2中描述的Jurkat/NF-kB/TACI测定中来自BAFF阻断的体外抑制常数(IC)值选择临床剂量水平。

PK建模

[0553] 使用两室PK模型拟合在实施例11中描述的食蟹猴研究中观察的PK数据。基于食蟹猴的体重和所估计的PK参数,使用异速生长缩放预测人PK参数。图25A-图25B描绘每四周(图25A)或每两周(图25B)重复IV给药后预测的人PK特征。基于预测的谷血清浓度确定最低临床剂量(8mg),并且在每四周静脉内给药后导致大于IC_{10}值(0.0087μg/mL)和小于IC_{50}值(0.078μg/mL)(图25A)或者在每两周静脉内给药后大于IC_{50}值(0.078μg/mL)和小于IC_{90}值(0.705μg/mL)(图25B)。

实施例13.在健康受试者中施用TACICRD2-Fc

[0554] 向健康成年受试者施用单剂量的示例性TACI CRD2-Fc即26TACI CRD2-Fc(如SEQ ID NO:167中所示)。评估融合蛋白的安全性、耐受性、药代动力学(PK)和药效学(PD)。TACI CRD2-Fc产品以100mg/mL液体配制品的形式提供,所述液体配制品具有以下赋形剂:乙酸盐、脯氨酸和聚山梨醇酯80。TACI CRD2-Fc以单次使用的2mL玻璃小瓶的形式提供,所述玻璃小瓶具有约0.8mL(80mg)的可提取体积。在使用之前,将TACI CRD2-Fc产品在-20℃下避光储存。

[0555] 将六十六名健康受试者(年龄18-65岁)分为7个静脉内(IV)队列和4个皮下(SC)队列,其中每个队列6名参与者。给药方案基于使用食蟹猴中的PK建模和来自PK数据的异速生长缩放得到的26TACI CRD2-Fc的预测人PK,并且预测人暴露的安全裕度基于大鼠和食蟹猴中的无明显损害作用水平(NOAEL)毒理学研究,如实施例11和12中所述。

[0556] 对于每个IV队列,将受试者1:1随机化以在第1天接受单次IV剂量(2.4mg)的26TACI CRD2-Fc或安慰剂(生理盐水,0.9%w/v无菌溶液形式的NaCl)。2.4mg IV的计划起始剂量是基于高细胞因子血症的可能性的最低预期生物效应水平(MABEL),如在TNFα的体外细胞因子释放测定中评估的。在从给药结束时观察约24小时后,将IV队列中的剩余4名参与者3:1随机化以分别接受26TACI CRD2-Fc或安慰剂。在以第一剂量水平向IV队列中的最后一名受试者给药后,在审查安全性数据后继续递增至下一剂量水平。向IV队列中的受试者经约30分钟施用以下剂量水平之一的单次静脉内输注:2.4mg、8mg、24mg、80mg、240mg、480mg和960mg。2.4mg IV的起始剂量比食蟹猴和大鼠中NOAEL的人等效剂量(HED)分别低1,780倍和923倍。在2.4mg IV的剂量下,预测的人Cmax和浓度时间曲线下面积(AUC)分别比在食蟹猴中150mg/kg的NOAEL下观察到的Cmax和AUC低5,430倍和2,980倍。960mg IV的最高剂量比食蟹猴和大鼠中NOAEL的HED分别低4.5倍和2.3倍。在960mg IV下,预测的人Cmax和AUC比食蟹猴中150mg/kg的NOAEL下观察到的Cmax和AUC低14倍和7.5倍。

[0557] 对于每个SC队列,将受试者4:2随机化以在第1天分别接受单次SC剂量(80mg)的26TACI CRD2-Fc或安慰剂。向皮下队列中的受试者施用以下剂量水平之一的单剂量或安慰剂:80mg、240mg、480mg和960mg。作为26TACI CRD2-Fc的药效学评估的一部分,每名受试者在施用26TACI CRD2-Fc后的第1天(IV组)或第2天(SC组)进一步接受单次SC注射1mg钥孔戚

血蓝蛋白(KLH)。

[0558] 在第1天给药前进行基线评估。给药后,对受试者进行安全性和PK/PD随访,持续29天,直到研究结束(EOS)。对在EOS时具有低于正常下限的定量免疫球蛋白G(IgG)的受试者进行定量Ig水平评估的随访,直到存在Ig产生恢复的证据。安全性基于不良事件的发生率、严重程度和严重性,包括体检结果、生命体征、实验室测试(血液学、血清化学、凝血和尿分析)和心电图的临床显著变化。

[0559] 随时间测量26TACI CRD2-Fc的血清浓度,并且估计PK终点,包括SC给药的最大观察浓度(Cmax)、达到最大观察浓度的时间(tmax)、浓度时间曲线下面积(AUC)和生物利用度。测量PD终点,并且包括(1)血清抗KLH免疫球蛋白(IgA、IgG和IgM)水平及其随时间相比于基线的相应变化;和(2)血清IgM、IgG(总计、IgG1、IgG2、IgG2和IgG4)、IgA(总计、IgA1和IgA2)和IgE水平及其随时间相比于基线的相应变化。评估抗药物抗体(ADA)的发生率、首次出现ADA的时间以及针对26TACI CRD2-Fc的ADA的滴度。测量探索性终点,包括循环B和T淋巴细胞(包括它们的亚型(如过渡性B细胞、滤泡B细胞、边缘区B细胞、浆母细胞和浆细胞))、平均血清水平和相关循环生物标记物随时间相比于基线的变化。

[0560] 结果证明,示例性TACI CRD2-Fc在所有IV和SC队列中被良好耐受。测量血清IgA、IgG、IgM水平及其随时间相比于基线的相应变化(图25C)。所有队列均展现对循环Ig水平的剂量依赖性PK和预期的PD效应,包括以8mg IV(约0.1mg/kg)开始的血清Ig的减少。在任何给药队列中都没有报告与治疗相关的严重不良事件、输液反应或安全性实验室参数的不良趋势。

[0561] 该研究的结果表明,示例性TACI CRD2-Fc显示出可接受的初步安全性和耐受性,并且对循环Ig和B细胞群体展现预期的PD效应。这些发现支持在患有SLE和/或其他B细胞和/或自身抗体相关疾病的患者中示例性TACI CRD2-Fc的未来临床开发。

实施例14.TACI抑制类别转换记忆B细胞、浆细胞和Ig分泌的评估.

[0562] 此实施例描述评估体外原代人B细胞分化和免疫球蛋白(Ig)分泌的研究。活性的评估包括如通过流式免疫分型评估的B细胞成熟以及培养上清液中分泌的Ig(包括IgA、IgM、IgG2)的测量。

[0563] 使用来自StemCell Technologies的阴性选择试剂盒从PBMC(N=7个供体)分离总CD19+B细胞。将分离的B细胞在补充有1X GlutaMAX、1X P/S和rhIL-21(50ng/mL)的X-VIVO 15™培养基中重悬至约2×10^6个细胞/mL。将CD40L以2nM的浓度添加到B细胞中,并将细胞铺板于12孔板(2mL/孔)中。根据分离的B细胞数量,每个供体铺板8×10^6-4.8×10^7个总B细胞。将细胞在37℃下与5% CO_2一起孵育3天。在第3天,从12孔板收获B细胞。将孔用1mL/孔PBS洗涤并用37℃维尔烯(1mL/孔)处理10min以去除粘附细胞。将洗涤并分离的细胞与对于每个相应供体的其他收获的细胞合并。将细胞离心并去除培养基。用5-25mL体积的DPBS洗涤细胞沉淀。将细胞悬浮于1-5mL DPBS中并计数。

[0564] 在DPBS中将激活的B细胞浓度调节至1×10^7/mL。将等体积的在DPBS中的CFSE(0.5μM)添加至细胞中(最终0.25μM)。将细胞在37℃下孵育10min。10min后,添加1-5mL FBS,并将细胞在37℃下孵育5min以淬灭标记。用5倍体积的X-VIVO 15™洗涤细胞两次。在第二次洗涤后,将细胞悬浮于1-2mL X-VIVO 15™中并计数。

[0565] 将B细胞(+/-CFSE)以0.3-1.0×10^6个细胞/mL(0.3-1.0×10^5/测试)悬浮于补充有

1X GlutaMAX、1X P/S和rhIL-21(20ng/mL)的37℃无血清X-VIVO 15™培养基中。在存在滴定的测试品Fc对照、抗APRIL mAb BION-1301(例如来自美国专利号10,377,830的SEQ ID NO:50和52)、贝利木单抗、26TACI CRD2-Fc(TACI vTD SEQ ID NO:26;Fc融合物SEQ ID NO:167)或者对应于阿塞西普(含有WT TACI 30-110SEQ ID NO:132;SEQ ID NO:130)或泰它西普(含有WT TACI 13-118,SEQ ID NO:131)的WT TACI-Fc序列的情况下,将100μL体积的B细胞添加至含有5APRIL和BAFF(10nM)的准备好的微板中。

[0566] 通过流式细胞术分析培养的细胞的CFSE,并用针对CD38、IgM、CD319、IgD和CD27的抗体染色。确定类别转换记忆B细胞(IgD-IgM-CD27^{+})和浆细胞(IgM-IgD-CD38^{+}CD319^{+})的百分比(%)。通过比较在存在测试品的情况下与不存在测试品的情况下的类别转换记忆B细胞(图26A)或浆细胞(图26B)的百分比,确定此类细胞的抑制百分比。显示了来自7个供体的数据,代表每种条件的3次重复实验的平均值(±SEM)。如图所示,在原代人B细胞中,26TACI CRD2-Fc比WT TACI-Fc更有效地抑制类别转换记忆B细胞和浆细胞。

[0567] 为了评估Ig分泌,收集来自培养物的上清液并通过多重分析定量Ig分泌。使用具有磁珠和对于检测可溶性IgM、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4和IgA具有特异性的抗体的免疫球蛋白MILLIPLEX®试剂盒(EMD Millipore,#HGAMMAG-301K)测定来自APRIL和/或BAFF调理的培养物的培养基。离心后收集B细胞培养上清液(CM),并将其1:10或1:20稀释至MILLIPLEX®试剂盒测定缓冲液中。将MILLIPLEX®试剂盒免疫球蛋白标准品溶解于500μL水中,并1:3连续稀释至试剂盒测定缓冲液中。将MILLIPLEX®映射(map)免疫球蛋白阳性对照溶解于250μL水中。将50μL标准品、阳性对照和稀释的CM铺板于96孔Bio-Plex Pro™平底板上。还添加单独的50μL测定缓冲液用于测定空白对照。对来自MILLIPLEX试剂盒的所有磁珠进行超声处理和涡旋。在试剂盒测定缓冲液中制备6种免疫球蛋白特异性磁珠的混合物。将制备的珠混合物(25μL)添加至所有孔中。将板密封并在25℃下以500rpm剧烈摇动1h,同时避光。孵育1h后,使用磁珠洗涤方案在具有制备的1X MILLIPLEX®试剂盒洗涤缓冲液的Cytek板洗涤器上洗涤具有珠的板。首先通过磁珠捕获用于检测可溶性IgA、IgM、IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的试剂盒抗体混合物(25μL/孔),然后将其添加至板中。将板密封并在25℃下以500rpm剧烈摇动30min,同时避光。30min后,以25μL/孔添加1X SA-PE,并将密封的板放回振荡器。在校准的LUMINEX®仪器上读取反应的磁珠及其荧光信号之前,将板固定在板磁体上1min。弹掉(flick off)检测试剂,并以150μL/孔添加MAGPIX®驱动液。LUMINEX®被编程为最少读取每种分析物的100个珠,并测量6个单独珠的PE荧光。使用GraphPad Prism生成每种分析物的标准品ng/mL浓度与平均荧光强度(MFI)的标准曲线。在GraphPad Prism中根据标准曲线内插CM中的分泌的Ig水平并反向计算其各自的稀释度。在GraphPad Prism中进一步分析这些结果以使用4参数曲线拟合计算IC_{50}。

[0568] 对于APRIL+BAFF培养物,使用下式确定Ig分泌的抑制百分比:([中值APRIL+BAFF Ig值-实验Ig值]/中值APRIL+BAFF Ig值)x100。相对于仅APRIL和仅BAFF的孔计算IgM(图26C)、IgA(图26D)和IgG2(图26E)的抑制百分比。数据表示每种条件的三次重复实验的平均值(±SEM)(*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001、****p<0.0001)。结果证明,在原代人B细胞中,26TACI CRD2-Fc比WT TACI-Fc更有效地抑制Ig分泌。对于其他IgG亚型(IgG1、IgG3和IgG4),观察到26TACI CRD2-Fc的相似抑制。不能分别计算贝利木单抗或BION-1301的IgG1

和IgG4的抑制百分比,因为多重试剂盒检测测试品中含有的Fc。

实施例15.TACI对小鼠和非人灵长类动物中浆细胞数量的抑制的评估.

[0569] 在小鼠和非人灵长类动物模型中评估命名为26TACI CRD2-Fc的示例性TACI-Fc对浆细胞数量的影响。

[0570] 为了在小鼠中评估,通过在第0天用牛胶原蛋白/CFA免疫并在第18天用牛胶原蛋白/CFA加强剂免疫,在雄性DBA/1小鼠中诱导胶原蛋白诱导的关节炎(CIA)。CIA由T细胞和抗体(B细胞)两者介导。

[0571] 用含有TACI结构域的分子26TACI CRD2-Fc(TACI vTD SEQ ID NO:26;Fc融合物SEQ ID NO:167)和TACI 13-118-Fc(对应于SEQ ID NO:131中所示的泰它西普中的TACI ECD部分与无效应子IgG1 Fc,SEQ ID NO:241;也参见美国专利8,193,316的SEQ ID NO:3)向小鼠给药。为了比较,还用mBAFF-R-Fc(UniProt Q9D8D0)和抗mAPRIL单克隆抗体(WO 2017/091683 A1 SEQ ID NO:161和162)向小鼠给药。小鼠每周接受6个剂量的每个测试品(10mg/kg)两次。处死小鼠,并分离其脾脏、骨髓和淋巴结以用于浆细胞的流式细胞术分析。

[0572] 然后对每个样品进行染色以供使用以下方法的免疫细胞子集的流式细胞术分析:将$1x10^6$个活细胞置于96孔板(Corning,目录号3797;用于B细胞特定检测组套)的孔中,以1500x g离心10秒,去除上清液,并用DPBS洗涤细胞沉淀两次。将沉淀重悬于100μL live-dead染色剂(LIVE/DEAD可固定浅绿色死细胞染色试剂盒,Life Technologies Corp.,1:1000稀释于DPBS中)中并在暗中在室温下孵育10min。在用流式细胞术缓冲液洗涤两次(每次175μL)后,将沉淀重悬于Mouse BD Fc Block(用流动缓冲液以1:50稀释)中,并在暗中在RT下再孵育5min。在不再进行任何洗涤的情况下,将50μL的以下流式细胞术抗体的混合物(稀释于流式细胞术缓冲液中)添加至B细胞检测组套的每个细胞孔中。对于B细胞组,将以下抗体组合用于混合剂:抗小鼠CD19 BUV395(克隆1D3,Becton-Dickinson;1:100)、抗小鼠CD138 BV421(克隆281-2,BioLegend Inc.;1:100,终浓度)、抗小鼠CD3εBV510(克隆17A2,BioLegend Inc.;1:100,终浓度)、抗小鼠IgD BV605(克隆11-26c.2a,BioLegend Inc.;1:100,终浓度)、抗小鼠B220 BV785(克隆RA3-6B2,BioLegend Inc.;1:100,终浓度)、抗小鼠CD95 FITC(克隆SA367H8,BioLegend Inc.;1:100,终浓度)、抗小鼠CD23 PerCP Cy5.5(克隆B3B4,BioLegend Inc.;1:100,终浓度)、抗小鼠GL7 PE(克隆GL7,BioLegend Inc.;1:100,终浓度)、抗小鼠Gr1 PE Cy7(克隆RB6-8C5,BioLegend Inc.;1:100,终浓度)、抗小鼠CD21 APC(克隆7E9,BioLegend Inc.;1:100,终浓度)以及抗小鼠IgM APC Cy7(克隆RMM-1,BioLegend Inc.;1:100,终浓度)。将所述细胞与抗体混合剂中的一种在暗中在冰上在温和混合下一起孵育45min,之后用流式细胞术缓冲液洗涤两次(每次洗涤175μL)。将细胞沉淀重悬于200μL流式细胞术缓冲液中并收集于LSRII流式细胞仪上。使用FlowJo软件10.2版(FlowJo LLC,美国)分析数据,并使用GraphPad Prism软件(8.1.2版)图形化。关键细胞子集鉴定分析包括:浆细胞($CD138^{高}TACI^{高}$)。

[0573] 如图27A-图27C所示,相对于Fc对照、WT TACI-Fc、mBAFF-R-Fc和/或抗mAPRIL单克隆抗体,TACI CRD2-Fc显著降低骨髓(图27A)、脾脏(图27B)和淋巴结(图27C)中的总浆细胞数量。

[0574] 对于非人灵长类动物GLP 1个月毒理学研究,如实施例17中所述,将26TACI CRD2-Fc(TACI vTD SEQ ID NO:26;Fc融合物SEQ ID NO:167)经由皮下注射以剂量水平25mg/kg、

75mg/kg或150mg/kg每周一次施用至食蟹猴,共连续五周;向对照动物注射媒介物(缓冲液),IV与SC施用途径交替进行。在低放大倍数(200X和400X)下检查骨髓涂片,以审查涂片的细胞性并定位可进行细胞计数的适当单层区域。用Unico®计数器在500X油浸下对浆细胞和其他有核细胞(使用两个键)进行计数以确定每500个总有核细胞的浆细胞数量;通过将浆细胞数量除以500来计算浆细胞的百分比,精确到小数点后一位。

[0575] 如图28所示,如所预期的,观察到低数量的浆细胞,并且在动物之间具有一些变化。相对于来自媒介物对照组的那些,在用26TACI CRD2-Fc给药的动物中观察到更低的浆细胞计数,其中在≥75mg/kg SC的情况下观察到统计学上显著的降低。这些更低的浆细胞计数与来自26TACI CRD2-Fc施用的效果是一致的。

实施例16.在Sprague Dawley大鼠中TACIvTC-Fc的多剂量毒理学研究.

[0576] 此实施例描述在Sprague Dawley(SD)中进行的命名为26TACI CRD2-Fc的示例性TACI vTD-Fc(SEQ ID NO:167)的1个月GLP毒理学研究,其中通过每周5个剂量的皮下注射或静脉内缓慢团注施用至SD大鼠,持续4周。

[0577] 将雄性和雌性SD大鼠分成五组(第1至5组)。第2至5组(终末群体)包括每组十只雄性和十只雌性,并且第4组和第5组(恢复群体)包括每组五只雄性和五只雌性。通过以下方式向动物给药:在第1、8、5、22和29天每周一次皮下注射至肩胛间区域(第1至4组),并且每周一次经由尾静脉经1min缓慢静脉内(IV)注射,持续五周,即在第1、8、15、22和29天(第1组和第5组)。对于对照动物,将在皮下注射后进行缓慢IV注射。使用临时导管和注射筒施用剂量配制品。向10只雄性和10只雌性Sprague Dawley大鼠(第1组;终末群体)以及5只雄性和5只雌性(第1组;恢复群体)施用媒介物对照品,10mM乙酸盐、3%脯氨酸、0.015%聚山梨醇酯80(pH 5.2)。将单独的群体分配到研究中以进行毒物动力学评估,所述单独的群体包括第1组中的3只雄性和3只雌性Sprague Dawley大鼠,以及第2至5组中的9只雄性和9只雌性Sprague Dawley大鼠。经由皮下(SC)注射向第2至4组中的动物给药,并且经由缓慢静脉内(IV)注射在第1、8、15、22和29天向第5组中的动物每周给药一次。第1组动物经由SC注射然后缓慢IV注射接受对照品。第2至5组分别以25、75、200mg/kg SC和200mg/kg IV的剂量水平接受26TACI CRD2-Fc。基于用于在第1天和第29天给药的制剂的分析结果,准确地制备剂量配制品。在第30天进行终末群体的尸检,并且在127天进行恢复群体的尸检。

[0578] 安全性终点包括临床观察、详细检查、食物消耗评价、体重、眼科学、血液学、凝血、血清化学、血清免疫球蛋白、尿分析和抗药物抗体(ADA)。在多个时间点收集血液以表征随时间而变的26TACI CRD2-Fc血清浓度。在结束时,记录大体观察结果和器官重量,并收集组织以用于显微镜评价。

[0579] 将对于26TACI CRD2-Fc(浓度和时间)的毒物动力学参数输入Phoenix WinNonlin软件(Pharsight Corp/Certara)。使用标称收集时间和标称给药时间对平均复合血清浓度应用非房室分析。

[0580] 在施用≥25mg/kg的雄性和雌性大鼠中26TACI CRD2-Fc相关血清化学变化包括在第30天最低限度地更低的球蛋白浓度和最低限度地更高的白蛋白与球蛋白(A/G)比率。免疫球蛋白IgA和IgM浓度在第8天低于适应值,并且在第15天和第29天中等至显著地低于对照值,这导致总体较低的球蛋白浓度。在雄性和雌性动物中,皮下施用25mg/kg至200mg/kg 26TACI CRD2-Fc在第8天导致暂时较低的IgG浓度;静脉内施用200mg/kg 26TACI CRD2-Fc

导致持续较低的IgG浓度直到第29天。在所有处理组中注意到平均脾脏重量的显著降低。在第30天,在脾脏、淋巴结和注射部位观察到26TACI CRD2-Fc相关显微镜发现。在经由SC或IV注射施用200mg/kg的动物中,注意到脾脏和淋巴结中的淋巴细胞的细胞性减少。脾脏中减少的细胞性与减少的脾脏重量相关。在通过SC或IV注射用200mg/kg 26TACI CRD2-Fc处理的动物中,还观察到淋巴结(肠系膜和下颌)中减少的滤泡淋巴细胞的细胞性的发生率和严重程度增加。与对照品注射部位处的皮下炎性变化相比,在接受200mg/kg的动物中的SC注射部位处的皮下炎性变化(单个核细胞浸润和/或纤维增生)略有增加,这被认为是通常观察到的程序相关变化的加剧。

[0581] 总之,通过以25、75、200mg/kg SC和200mg/kg IV持续4周向Sprague Dawley大鼠皮下注射或静脉内注射而施用的26TACI CRD2-Fc导致更低的血清球蛋白,其归因于减少的免疫球蛋白(IgA、IgM和IgG)浓度以及脾脏和淋巴结中减少的淋巴细胞的细胞性,这全部与26TACI CRD2-Fc的作用机制一致。由于这些作用中没有一种被认为是不利的,因此将NOAEL(无可见有害作用水平)确定为皮下或静脉内注射200mg/kg。

实施例17.食蟹猴中TACIvTD-Fc的多剂量1个月GLP毒理学研究.

[0582] 此实施例描述在食蟹猴中的1个月GLP毒理学研究,以检查命名为26TACI CRD2-Fc的示例性TACI vTD-Fc(SEQ ID NO:167)在通过每周一次皮下注射持续4周(总共5个剂量)施用至食蟹猴时的作用。

[0583] 将雄性和雌性食蟹猴分组。在第1、8、15、22和29天,通过皮下注射(第1至4组)每周向动物给药一次,共连续五周。第1组动物接受媒介物对照(10mM乙酸盐、3%脯氨酸、0.015%聚山梨醇酯80,pH 5.2)。分别以25、75或150mg/kg的剂量水平向第2至4组动物施用26TACI CRD2-Fc(SEQ ID NO:167)。经由静脉内输注以150mg/kg的剂量水平向另外第5组中的动物施用26TACI CRD2-Fc(SEQ ID NO:167)。

[0584] 将对于26TACI CRD2-Fc(浓度和时间)的毒物动力学参数输入Phoenix WinNonlin软件(Pharsight Corp/Certara)以进行分析。使用标称收集时间和标称剂量水平对单独受试者血清浓度应用非房室分析。在该模型中观察到的剂量依赖性PK示于图29A中。计算的另外的参数是150mg/kg下的生物利用度87.4%(F%)和约2.9天的消除半衰期($T_{1/2}$)。

[0585] 对在第-8、8、15、22和29天收集的对照动物(第1组)外周血样品以及对用25mg/kg SC(第2组)、75mg/kg SC(第3组)、150mg/kg SC(第4组)和150mg/kg IV(第5组)26TACI CRD2-Fc(SEQ ID NO:167)处理的动物在给药前第-8天(基线)和给药后第8、15、22和29天收集的外周血样品进行流式细胞术分析。对收集的外周血进行细胞免疫分型,并对CD3-CD20+(总B细胞)、CD3-CD20+CD21+CD27-(幼稚B细胞)和CD3-CD20+CD21+CD27+(记忆B细胞)的群体进行相对百分比和绝对计数分析。为了确定TACI相关的变化,将给药后每组的相对百分比和绝对计数值的平均值与各自处理组的基线值(第-8天)和对照第1组中观察到的趋势进行比较。流式细胞术分析表明施用26TACI CRD2-Fc后CD3-CD20+B细胞和子集的绝对计数和相对百分比的值的多个变化(图29B)。所有观察到的变化的特征在于相对百分比或绝对计数的减少。由于在多个B细胞子集中以及在雄性和雌性中都观察到这些减少,因此这些结果与26TACI CRD2-Fc施用的效果是一致的。对于CD3-CD20+CD21+和CD3-CD20+CD21+CD27-群体,在雄性和雌性处理组中均观察到与基线和第15天开始的第1组值相比,绝对计数中度(两倍)减少。

[0586] 还测量血清细胞因子作为本研究中的非GLP探索性终点。在给药前(第1天)、然后在第一剂量的26TACI CRD2-Fc后2小时(第1天)、6小时(第1天)和24小时(第2天)收集的冷冻血清样品以在干冰上冷冻的形式提供。将血清样品(来自42只动物,N＝总共168个样品)解冻,涡旋30秒,然后在测定前在4℃下储存。将样品铺板于重复的孔(25μL/孔)中,并使用Millipore Milliplex NHP细胞因子测定试剂盒(目录号PRCYTA-40K;批号3739326)测量一组细胞因子的浓度,并用具有xPONENT®4.2软件的Luminex 200®系统(EMD Millipore,马萨诸塞州伯灵顿)分析。与来自媒介物处理的对照动物的样品和动物内给药前测量值相比,26TACI CRD2-Fc处理未诱导所评价的任何细胞因子(IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IFNγ或TNFα)的显著变化。

[0587] 总之,通过皮下注射或静脉内注射以25、75和150mg/kg SC或150mg/kg IV持续4周向食蟹猴施用26TACI CRD2-Fc导致无损害的更低的平均总蛋白和球蛋白值。在所有剂量水平下都观察到减少的血清球蛋白(继发于减少的IgA、IgM和IgG)浓度,这可能与骨髓中更低的B细胞群体和浆细胞计数有关并与26TACI CRD2-Fc的作用机制一致(图30)。因此,NOAEL(无可见有害作用水平)被认为是皮下注射150mg/kg。

实施例18.在狼疮的慢性移植物抗宿主病(cGVHD)模型中TACIvTD-Fc的评价.

[0588] 此实施例描述当在bm12-to-C57BL/6NJ小鼠可诱导SLE模型中使用重复给药方案施用时对命名为26TACI CRD2-Fc的TACI vTD-Fc(SEQ ID NO:167)相比于含有可介导效应子功能的野生型Fc的WT TACI(13-118)Fc(SEQ ID NO:240)的体内活性的评价。在该模型中,将来自雌性I-A^{bm12}B6(C)-H2-$Ab1^{bm12}$/KhEgJ(“bm12”)小鼠的脾细胞悬浮液经由腹膜内递送过继转移至雌性C57BL/6NJ接受者小鼠中。H2-$Ab1^{bm12}$与H2-$Ab1^{b}$相差3个核苷酸,导致MHC II类I-A分子的β链中3个氨基酸的改变。受体抗原呈递细胞对供体bm12 CD4+T细胞的同种激活导致慢性GVHD,其症状与SLE非常相似,包括自身抗体产生、免疫细胞子集的变化以及轻度肾脏疾病。脾细胞转移后约1-2周,发生血清IgG和抗dsDNA增加。具有免疫复合物沉积的肾小球肾炎在所述模型中较晚出现(转移后12-14周),主要由与IgG1、IgG2b、IgG2c和IgG3抗体结合的自身抗原构成。本研究的终点包括脾脏中的免疫细胞子集组成和肾脏中的肾IgG免疫复合物沉积。

[0589] 为了开始研究,将来自40只bm12小鼠的脾脏和来自其中20只小鼠的腹股沟淋巴结无菌处理成在RPMI培养基中的单细胞悬浮液,并经由腹膜内(IP)递送注射至39只C57BL/6“接受者”小鼠(第1-4组),如表E37所示。制备总共8mL合并的淋巴结细胞/脾细胞,并且39只接受者小鼠中的每只接受0.2mL合并的bm12细胞。C57BL/6“接受者”小鼠通过IP注射接受3个测试品中的1个(第1-4组),其中第一剂量在bm12脾细胞转移后5天施用;最后一个剂量在结束之前6天施用(第14周期间的最后一个剂量)。在研究过程中,保留六只C57BL/6和5只bm12小鼠用作未处理(naive、untreated)对照。

表E37. 测试品描述和给药方案

组号	小鼠数量	测试品(多个)	剂量水平(μg)	给药时间表(D＝研究天数)	递送途径
1	13	Fc对照	80*	每周2次, D5开始	IP
2	13	26 TACI CRD2-Fc	200	每周2次, D5开始	IP
3	13	WT TACI (13-118) Fc	240	每周2次, D5开始	IP
4	6	无(未处理BL/6)	N/A	N/A	N/A

*与Fc对照匹配的摩尔

N/A＝不适用

[0590] 每1-2周收集血液并处理得到血清,并测量测试品浓度以确认预期的暴露。在第14周处死小鼠,并在异氟烷麻醉下最终收集血液。在结束时从每只小鼠收集脾脏,称重并处理成单细胞悬浮液以用于通过流式细胞术进行免疫分型。在Cellometer(Nexcelom Bioscience)上获得总细胞计数。

[0591] 如图31中所示,与对照处理的小鼠相比,施用WT TACI-Fc和26TACI CRD2-Fc显著降低脾脏重量以及脾细胞总数。通过流式细胞术对脾细胞进行的免疫分型揭示在WT TACI-Fc和26TACI CRD2-Fc处理组中$CD45^+$和$B220^+$的数量的高度显著降低(图32)。在两个处理组中还观察到$CD3^+$T细胞数量的适度降低。

[0592] 如图33中所示,WT TACI-Fc和26TACI CRD2-Fc显著减少脾脏中$CD4^+$和$CD8^+$T细胞的数量和百分比。此外,两个测试品降低在抗体介导的疾病中重要的$CD4^+$T细胞子集(图34)。观察到调节性T(Treg)细胞数量的轻度降低;然而,由于WT TACI-Fc和26TACI CRD2-Fc两者均显著减少滤泡T辅助(Tfh)细胞的数量,因此用每个测试品处理也增加Treg与Tfh细胞的比率(图34)。

[0593] 如图35A中所示,WT TACI-Fc和26TACI CRD2-Fc显著减少B细胞数量,包括$CD1d^{高}$ $CD5^+$B-1细胞的数量。26TACI CRD2-Fc对过渡-1(T1)B细胞的数量具有极小的影响,但显著降低过渡-2(T2)B细胞的数量,如基于T-1发育阶段以外的B细胞对BAFF和APRIL的存活依赖性所预期的(图35B)。因此,WT TACI-Fc和26TACI CRD2-Fc也显著减少滤泡和边缘区(MZ)B细胞(图36A)、生发中心(GC)B细胞和浆细胞(图36B)的数量。26TACI CRD2-Fc(以及WT TACI-Fc,不那么显著)显著减少各种分泌免疫球蛋白的B细胞的数量,包括早期浆细胞、浆母细胞和长寿命浆细胞(LL-PC)(图37)。

[0594] 对于图38,在结束时从每只小鼠收集肾脏,并将其在最适切割温度(OCT)复合块(compound block)中冷冻,然后切片并用对小鼠IgG具有特异性的荧光标记的抗体进行免疫组织化学(IHC)染色。与Fc对照相比,26TACI CRD2-Fc处理导致高度显著减少的肾IgG免疫复合物沉积(图38)。此外,在第8周和第13周,与Fc对照相比,WT TACI-Fc和26TACI CRD2-Fc显著降低抗dsDNA自身抗体的血清滴度(图39)。

[0595] 结果证明,26TACI CRD2-Fc显著降低在cGVHD模型和抗体介导的疾病中关键的脾Tfh、GC B细胞和PC群体。26TACI CRD2-Fc还显著降低血清中的抗dsDNA抗体,并抑制IgG免疫复合物在肾脏中的沉积。

实施例19.在$H\text{-}2^{bm12}$小鼠自身抗体相关肾小球肾炎模型中对TACIvTD-Fc的评价

[0596] 此实施例描述在bm12小鼠慢性GVHD模型中对命名为26TACI CRD2-Fc的TACI vTD-Fc(SEQ ID NO:167)相比于Fc对照的活性的评价。GVHD模型中供体T细胞的同种激活导致类似多种系统性自身免疫性疾病(包括自身抗体相关肾小球肾炎)的临床、血清学和组织病理学表现。

[0597] 为了开始研究,每周两次用TACI-Fc或Fc对照向小鼠给药,持续12.5周。包括未处理C57BL/6NJ小鼠作为对照动物。评价的终点包括抗双链(ds)DNA抗体、脾免疫细胞子集的分析以及经由免疫组织化学的肾IgG沉积。结果证明,与Fc对照相比,26TACI CRD2-Fc处理显著降低抗dsDNA自身抗体(图40)、肾小球IgG免疫沉积(图41)。脾细胞的免疫分型证明,

26TACI CRD2-Fc处理导致包括生发中心(GC)、边缘区(MZ)、成熟T2和滤泡B细胞,产生抗体的浆细胞和浆细胞子集在内的关键免疫细胞子集显著降低。也观察到CD4+滤泡辅助T细胞、调节性T细胞、CD4+效应记忆T细胞以及CD4+和CD8+中枢记忆T细胞的显著降低。26TACI CRD2-Fc还显著降低IgA、IgM、IgG1、IgG2b和IgG3的血清水平(图42)。

[0598] 结果证明,与Fc对照处理相比,26TACI CRD2-Fc显著抑制自身抗体的形成并显著降低肾小球IgG沉积;以及抑制关键B和T细胞子集的扩增。

实施例20.TACIvTD-Fc在性成熟食蟹猴中的多剂量26周毒理学研究

[0599] 此实施例描述在性成熟的食蟹猴中进行的毒理学研究,以评价命名为26TACI CRD2-Fc(SEQ ID NO:167)的TACI vTD-Fc在通过每周一次静脉内输注施用26周(26个剂量)然后恢复12周时的潜在毒性。

[0600] 实验研究设计示于表E38中。

表E38.实验研究设计

组	测试材料	剂量水平 (mg/kg)	结束 (雄性)	结束 (雌性)	恢复 (雄性)	恢复 (雌性)
1	对照	0	4	4	2	2
2	26 TACI CRD2-Fc	25	4	4	2	2
3	26 TACI CRD2-Fc	75	4	4	2	2

[0601] TACI-Fc被所有存活到预先安排的尸检的动物良好耐受。未观察到在临床体征、生命体征、体重、月经周期、睾丸体积、精液、眼科学、凝血、尿分析、解剖和大体病理学、器官重量和组织病理学方面的TACI-Fc相关变化。

[0602] 与26TACI CRD2-Fc的预期效果一致,观察到免疫球蛋白和骨髓浆细胞的变化。在最终尸检时在25和75mg/kg剂量组的大多数动物的骨髓涂片中观察到更低的浆细胞。与浆细胞观察结果相关,在施用26TACI CRD2-Fc的动物中观察到统计学上显著的血清化学变化,包括从第29天到第183天IgG、IgM和IgA值的轻度、中度和/或显著的、通常渐进的、剂量依赖性降低。在施用26TACI CRD2-Fc的动物中免疫球蛋白变化与从第29天至第183天球蛋白和总蛋白浓度平均值的统计学上显著的、最小至轻度减少以及平均白蛋白/球蛋白(A/G)比率的最小至轻度增加有关。未观察到所评估的血液学参数的其他TACI-Fc相关变化,但在183天在75mg/kg雄性(归因于两只动物)中的在健康食蟹猴的正常范围内最低程度地较低的平均淋巴细胞计数除外。

[0603] 通过免疫分型注意到总B细胞(CD3-CD20+)的统计学上显著的变化,并且可能归因于26TACI CRD2-Fc施用。另外,在所评价的其他细胞群体中没有TACI-Fc施用的效果的证据。观察到NOAEL为75mg/kg/天。

实施例21.在患有自身抗体相关肾小球疾病的受试者中施用TACI-Fc融合蛋白

[0604] 向诊断为自身抗体相关肾小球疾病的成人施用含有命名为26TACI CRD2-Fc的TACI vTD-Fc融合蛋白(SEQ ID NO:167中所示的Fc融合蛋白)的组合物。TACI vTD-Fc融合蛋白组合物被配制成在可提取体积为0.8mL/小瓶(80mg/小瓶)的单次使用的玻璃小瓶中的100mg/mL液体。评估施用TACI vTD-Fc融合蛋白的安全性和对其的反应。该研究是正在进行的临床试验研究的一部分。

受试者和治疗

[0605] 选择一组成年受试者在3个递增剂量队列之一中施用一定剂量的TACI vTD-Fc融

合蛋白。募入诊断为包括免疫球蛋白(Ig)A肾病(IgAN)、狼疮性肾炎(LN)、原发性膜性肾病(pMN)或肾抗嗜中性粒细胞胞质抗体(ANCA)相关血管炎(AAV)在内的自身抗体相关肾小球疾病的受试者。

[0606] 受试者的纳入标准包括以下类型之一的自身抗体相关肾小球疾病:a)免疫球蛋白(Ig)A肾病(IgAN),其中i)在筛选开始之前≤3年内经活检确诊,和ii)在筛选时升高的半乳糖缺陷型igA1(GdIgA1)抗体;b)狼疮性肾炎(LN),其中i)在筛选开始之前≤1年内经活检确诊(肾活检显示根据国际肾脏病学会/肾脏病理学会(ISN/RPS)标准的活动性、增殖性III类或IV类LN的证据;除III类或IV类疾病外,受试者还可能同时展现V类疾病),ii)在筛选时升高的抗双链DNA(抗dsDNA),和iii)在筛选时呈抗核抗体(ANA)阳性且滴度≥1:80;c)原发性膜性肾病(pMN),其中i)在筛选开始之前≤3年内经活检确诊,和ii)在筛选时呈抗磷脂酶A2受体(抗PLA2R1)抗体和/或含抗血小板反应蛋白1型结构域的7A蛋白(抗THSD7A)抗体阳性;以及d)肾抗嗜中性粒细胞胞质抗体(ANCA)相关血管炎(AAV),其中i)在筛选开始之前≤2年内经活检确诊,并且具有肾ANCA相关血管炎的证据,ii)在筛选时呈抗蛋白酶3(PR3)或抗髓过氧化物酶(MPO)抗体阳性,和iii)持续的免疫活性,如通过在筛选开始之前≤6个月内(筛选与历史ANCA结果之间的最短时间≥14天)明确记录的阳性PR3或MPO抗体证明。在任何上述类型中,如果未在指定的时间范围内进行活检或报告不可用,则在符合所有其他资格标准之后在筛选期间进行活检。另外的纳入标准包括:1)持续蛋白尿,测量为尿蛋白/肌酐比率(UPCR)≥0.75g/g,其中第一次评估使用24小时尿液或现场尿液收集来确定(第1次访视),并且第二次评估(≥14±3天后在第2次访视时)使用24小时尿液收集来确定;以及2)静息收缩压<150mm Hg并且静息舒张压<90mm Hg。

[0607] 成年受试者排除标准包括:另一种肾病的先前诊断或诊断标准,所述另一种肾病包括但不限于糖尿病性肾病、C3肾小球肾病、局灶性节段性肾小球硬化症、薄基底膜疾病、奥尔波特病、IgA血管炎、微小变化疾病、感染后肾小球肾炎、继发性膜性肾病(不包括合并II或IV类的V类LN)或继发性IgAN,包括但不限于乳糜泻、克罗恩病、HIV或肝硬化;在第1天之前的所述时间段内有以下治疗史:利妥昔单抗或直接耗尽B淋巴细胞的其他药剂(48周),贝利木单抗或直接抑制B细胞激活因子(BAFF)和/或增殖诱导配体(APRIL)的其他药剂(24周),静脉内Ig、阿巴西普、阿尼鲁单抗、贝拉西普、阿达木单抗、英夫利昔单抗(inflizimab)、赛妥珠单抗、依那西普、戈利木单抗、阿那白滞素、卡那单抗、托珠单抗、萨瑞鲁单抗、沙妥珠单抗或其他市售生物治疗剂(8周),环磷酰胺(8周),任何非生物研究药剂(8周或5个半衰期)以及其他生物研究药剂(5个半衰期)。其他排除因素在熟练的临床医生的水平之内。

[0608] 每2周一次(Q2W)以80mg、160mg或240mg的剂量向受试者施用TACI vTD-Fc融合蛋白的皮下注射。可以考虑每4周一次(Q4W)静脉内输注。治疗时间段持续长达48周。在一些情况下,可以每隔一周(Q2W)向受试者施用剂量(例如80mg),或以更低的剂量每周施用一次(Q1W),共3-4个剂量,然后可以在治疗时间段内Q4W施用该剂量或更高的剂量。在治疗后,可以例如针对安全性监测受试者。

安全性和功效终点

[0609] 监测治疗期间出现的不良事件(TEAE)、严重不良事件(SAE)和目的不良事件、剂量限制性毒性和治疗期间出现的临床显著异常的发生率。

[0610] 监测免疫应答,包括患有LN的受试者中抗dsDNA、患有IgAN的受试者中的半乳糖缺陷型(Gd)IgA1和抗GdIgA1、以及患有pMN的受试者中的抗PLA2R1和抗THSD7A、以及患有肾AAV的受试者中的抗MPO、抗PR-3的循环水平随时间相比于基线的变化。还监测补体组分(C3、C4、CH50)随时间相比于基线的变化。

[0611] 还监测受试者的与患有自身抗体相关肾小球疾病的受试者的疾病活动性相关的一种或多种免疫指标;通过蛋白尿、估计肾小球滤过率(eGFR)和相关的复合肾功能终点随时间相比于基线的变化评估的TACI-Fc融合蛋白的功效;以及在成年受试者中对TACI-Fc融合蛋白的免疫原性、药代动力学、药效学的评估。

[0612] 在受试者中监测的临床反应还包括通过24小时尿液和/或现场尿液评估的尿蛋白:肌酸比率(UPCR)随时间相比于基线的变化;估计肾小球滤过率(eGFR;例如基于胱抑素C计算,Inker,2021中描述的独立于种族的方程和慢性肾脏疾病流行病学合作研究所CKD-EPI的方程)随时间相比于基线的变化;在第24周和第48周时的肾反应(仅LN和pMN受试者),使用胱抑素C、独立于种族的方程(Inker,2021)确定eGFR;医生整体评估(PGA)随时间相比于基线的变化,以及患者整体评估(PtGA)随时间相比于基线的变化。对于LN受试者,还监测SLE疾病活动性指标(例如混合SELENA-SLEDAI和SLICC损伤指数得分)随时间相比于基线的变化。对于肾AAV受试者,监测AAV疾病活动性指标(例如使用伯明翰血管炎活动性评分(BVAS)和血管炎损伤指数(VDI)评分)随时间相比于基线的变化。

[0613] 在施用的剂量下评估药代动力学(PK)和药效学(PD)终点。评估药效学(PD)终点,包括血清Ig同种型(IgM、IgA、总IgG、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4和IgGE)随时间相比于基线的变化以及外周血淋巴细胞和子集随时间相比于基线的变化。此外,监测与肾脏炎症/损害、狼疮活动性和通过可溶性分析物(例如,BAFF、APRIL、sTACI、sBCMA、sBAFF-R)介导的免疫途径相关的生物标记物的变化。估计药代动力学(PK)终点,包括TACI-Fc融合蛋白随时间而变的血清和尿液水平。监测针对TACI-Fc融合蛋白的抗药物抗体(ADA)的发生率和滴度。

[0614] 本发明并不旨在限于具体公开的实施方案的范围,所提供的实施例例如是为了说明本发明的各个方面。根据本文的描述和传授,对组合物和方法的各种修改将变得清楚。可以在不背离本公开文本的真实范围和精神的情况下实践此类变化,并且所述变化旨在落入本公开文本的范围内。

[0615] 本公开涉及下述实施方案:

1.一种治疗有需要的受试者的炎性或自身免疫性疾病或障碍的方法,所述方法包括向所述受试者施用TACI-Fc融合蛋白,所述TACI-Fc融合蛋白是式TACI-接头-Fc的两个多肽的同二聚体,其中TACI是包含SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列中的氨基酸取代K77E、F78Y和Y102D的变体TACI多肽,其中将所述TACI-Fc融合蛋白以从为或约2.4mg至为或约960mg的剂量每周施用一次直到每三个月施用一次。

2.根据项1所述的方法,其中将所述TACI-Fc融合蛋白的剂量每三个月施用一次。

3.根据项1所述的方法,其中将所述TACI-Fc融合蛋白的剂量每月施用一次(Q4W)。

4.根据项1所述的方法,其中将所述TACI-Fc融合蛋白的剂量每隔一周施用一次(Q2W)。

5.根据项1所述的方法,其中将所述TACI-Fc融合蛋白的剂量每周施用一次(Q1W)。

6.根据项1-5中任一项所述的方法,其中所述TACI-Fc融合蛋白的剂量是从为或约

8mg至960mg。

7.根据项1-6中任一项所述的方法,其中所述TACI-Fc融合蛋白的剂量是从为或约80mg至960mg。

8.根据项1-7中任一项所述的方法,其中所述TACI-Fc融合蛋白的剂量是从为或约80mg至为或约720mg、从为或约160mg至为或约560mg或从为或约240mg至为或约480mg。

9.根据项1-7中任一项所述的方法,其中所述TACI-Fc融合蛋白的剂量是从为或约24mg至为或约480mg,任选地从为或约40mg至为或约480mg、从为或约80mg至为或约320mg或从为或约80mg至为或约120mg。

10.根据项1-9中任一项所述的方法,其中所述TACI-Fc融合蛋白的剂量是从为或约240mg至为或约480mg或80mg至为或约120mg。

11.根据项1-10中任一项所述的方法,其中所述TACI-Fc融合蛋白的剂量是为或约80mg、为或约160mg或为或约240mg。

12.根据项1-11中任一项所述的方法,其中所述施用是经由静脉内施用。

13.根据项1-11中任一项所述的方法,其中所述施用是经由皮下施用。

14.根据项1-13中任一项所述的方法,其中所述变体TACI多肽示于SEQ ID NO:26中。

15.根据项1-14中任一项所述的方法,其中所述接头选自GSGGS(SEQ ID NO:76)、GGGGS(G4S;SEQ ID NO:77)、GSGGGGS(SEQ ID NO:74)、GGGGSGGGGS(2xGGGGS;SEQ ID NO:78)、GGGGSGGGGSGGGGS(3xGGGGS;SEQ ID NO:79)、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(4xGGGGS;SEQ ID NO:84)、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(5XGGGGS;SEQ ID NO:91)、GGGGSSA(SEQ ID NO:80)、或GSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:194)或其组合。

16.根据项1-15中任一项所述的方法,其中所述接头示于SEQ ID NO:74中。

17.根据项1-16中任一项所述的方法,其中所述Fc是IgG1 Fc结构域。

18.根据项1-17中任一项所述的方法,其中所述Fc是变体IgG1 Fc,与野生型IgG1 Fc结构域相比,其展现对Fc受体的降低的结合亲和力和/或降低的效应子功能。

19.根据项18所述的方法,其中所述变体IgG1 Fc结构域包含选自以下的一个或多个氨基酸取代:L234A、L234V、L235A、L235E、G237A、S267K、R292C、N297G和V302C,根据EU编号。

20.根据项18或项19所述的方法,其中所述变体IgG1 Fc包含氨基酸取代L234A、L235E和G237A,根据EU编号。

21.根据项17-20中任一项所述的方法,其中所述Fc包含氨基酸取代C220S,其中所述残基根据Kabat的EU索引编号。

22.根据项17-21中任一项所述的方法,其中所述Fc缺乏铰链序列EPKSS或EPKSC。

23.根据项17-22中任一项所述的方法,其中所述Fc区包含K447del,其中所述残基根据Kabat的EU索引编号。

24.根据项1-21和23所述的方法,其中所述Fc包含SEQ ID NO:73中所示的氨基酸序列。

25.根据项1-21、23和24中任一项所述的方法,其中所述TACI-Fc融合蛋白示于SEQ ID NO:167中。

26.根据项1-17、21-25所述的方法,其中所述Fc包含SEQ ID NO:81中所示的氨基酸序列。

27.根据项1-17、21-25和26中任一项所述的方法,其中所述TACI-Fc融合蛋白示于SEQ ID NO:168中。

28.根据项1-27中任一项所述的方法,其中所述受试者中的B细胞免疫应答或活性降低。

29.根据项1-28中任一项所述的方法,其中所述受试者中的成熟B细胞和总循环B细胞的数量减少。

30.根据项1-29中任一项所述的方法,其中所述受试者中的循环血清免疫球蛋白减少。

31.根据项1-30中任一项所述的方法,其中B细胞成熟、分化和/或增殖中的一种或多种被降低或抑制。

32.根据项1-31中任一项所述的方法,其中所述受试者中的APRIL或BAFF蛋白的循环水平降低,任选地其中所述APRIL或BAFF蛋白是APRIL同三聚体、BAFF同三聚体、APRIL/BAFF异三聚体或BAFF 60聚体。

33.根据项1-32中任一项所述的方法,其中所述疾病或障碍是B细胞介导的疾病或障碍。

34.根据项1-33中任一项所述的方法,其中所述疾病或障碍是自身免疫性疾病、和炎性病症、B细胞癌、抗体介导的病状、肾病、移植物排斥、移植物抗宿主病或病毒感染。

35.根据项1-34中任一项所述的方法,其中所述疾病或障碍选自系统性红斑狼疮(SLE)、狼疮性肾炎、皮肤红斑狼疮、舍格伦综合征、硬皮病(系统性硬化)、多发性硬化、糖尿病(例如I型糖尿病)、多发性肌炎、原发性胆汁性肝硬化、IgG4相关疾病、IgA肾病、IgA血管炎、ANCA血管炎(显微镜下多血管炎、肉芽肿病伴多血管炎[韦格纳肉芽肿病]、嗜酸性肉芽肿病伴多血管炎[查格-施特劳斯])、冷球蛋白血症、冷凝集素或温凝集素疾病、免疫性血小板减少性紫癜、视神经炎、淀粉样变性、抗磷脂抗体综合征(APS)、自身免疫性多内分泌腺综合征II型(APS II)、自身免疫性甲状腺疾病(AITD)、格雷夫斯病、自身免疫性肾上腺炎、寻常型天疱疮、大疱性类天疱疮、重症肌无力、移植物抗宿主病(GVHD)、移植、类风湿性关节炎、急性狼疮性肾炎、肌萎缩侧索硬化、视神经脊髓炎、横贯性脊髓炎、拉斯穆森脑炎、CNS自身免疫、格林-巴利综合征、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病、神经囊尾蚴病、结节病、抗磷脂抗体综合征、IgG4相关疾病、桥本甲状腺炎、免疫性血小板减少症、艾迪生病、皮肌炎。

36.根据项1-34中任一项所述的方法,其中所述疾病或障碍是自身抗体相关肾小球疾病。

37.根据项36所述的方法,其中所述自身抗体相关肾小球疾病是免疫球蛋白(Ig)A肾病(IgAN)、狼疮性肾炎(LN)、原发性膜性肾病(pMN)或肾抗嗜中性粒细胞胞质抗体(ANCA)相关血管炎(AAV)。

38.根据项1-34中任一项所述的方法,其中所述疾病或障碍是B细胞癌。

39.根据项38所述的方法,其中所述B细胞癌是骨髓瘤、B细胞慢性淋巴细胞白血病、华氏巨球蛋白血症或非霍奇金淋巴瘤。

40.根据项1-39中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

41.根据项1-40中任一项所述的方法,其中所述TACI-Fc融合蛋白提供于配制品中,所述配制品包含pH从约4.0至约6.0的乙酸缓冲液、浓度从为或约1％至约10％的脯氨酸和浓度从约0.005％至约0.05％(w/v)的表面活性剂。

42.根据项41所述的方法,其中所述配制品的pH是约5.2。

43.根据项41或项42所述的方法,其中所述乙酸缓冲液包含浓度从为或约5mM至为或约15mM的乙酸盐。

44.根据项41-43中任一项所述的方法,其中所述乙酸缓冲液包含浓度为或约10mM的乙酸盐。

45.根据项41-44中任一项所述的方法,其中所述脯氨酸的浓度是约2％至约5％。

46.根据项41-44中任一项所述的方法,其中所述脯氨酸的浓度是为或约3％。

47.根据项41-46中任一项所述的方法,其中所述表面活性剂的浓度是从约0.01％至约0.025％(w/v),任选地为或约0.015％(w/v)。

48.根据项41-47中任一项所述的方法,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯80。

49.根据项41-48中任一项所述的方法,其中所述配制品中TACI-Fc融合蛋白的量是从约50mg至约100mg。

50.根据项41-49中任一项所述的方法,其中所述配制品中TACI-Fc融合蛋白的量是为或约80mg。

51.根据项41-50中任一项所述的方法,其中所述TACI-Fc融合蛋白的浓度在约50mg/mL与约200mg/mL之间。

52.根据项41-47中任一项所述的方法,其中所述TACI-Fc融合蛋白的浓度是为或约100mg/mL。

53.一种配制品,所述配制品包含TACI-Fc融合蛋白、pH从约4.0至约6.0的乙酸缓冲液、浓度从为或约1％至约10％的脯氨酸和浓度从约0.005％至约0.05％(w/v)的表面活性剂,其中所述TACI-Fc融合蛋白是式TACI-接头-Fc的两个多肽的同二聚体,其中TACI是包含SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列中的氨基酸取代K77E、F78Y和Y102D的变体TACI多肽。

54.根据项53所述的配制品,其中所述变体TACI多肽示于SEQ ID NO:26中。

55.根据项53或项54所述的配制品,其中所述接头选自GSGGS(SEQ ID NO:76)、GGGGS(G4S;SEQ ID NO:77)、GSGGGGS(SEQ ID NO:74)、GGGGSGGGGS(2xGGGGS;SEQ ID NO:78)、GGGGSGGGGSGGGGS(3xGGGGS;SEQ ID NO:79)、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(4xGGGGS;SEQ ID NO:84)、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(5XGGGGS;SEQ ID NO:91)、GGGGSSA(SEQ ID NO:80)、或GSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:194)或其组合。

56.根据项53-55中任一项所述的配制品,其中所述接头示于SEQ ID NO:74中。

57.根据项53-56中任一项所述的配制品,其中所述Fc是IgG1 Fc结构域。

58.根据项53-57中任一项所述的配制品,其中所述Fc是变体IgG1 Fc,与野生型IgG1 Fc结构域相比,其展现对Fc受体的降低的结合亲和力和/或降低的效应子功能。

59.根据项58所述的配制品,其中所述变体IgG1 Fc结构域包含选自以下的一个或多个氨基酸取代:L234A、L234V、L235A、L235E、G237A、S267K、R292C、N297G和V302C,根据EU编号。

60.根据项58或项21所述的配制品,其中所述变体IgG1 Fc包含氨基酸取代L234A、

L235E和G237A,根据EU编号。

61.根据项58-60中任一项所述的配制品,其中所述Fc包含氨基酸取代C220S,其中所述残基根据Kabat的EU索引编号。

62.根据项58-61中任一项所述的配制品,其中所述Fc缺乏铰链序列EPKSS或EPKSC。

63.根据项58-62中任一项所述的配制品,其中所述Fc区包含K447del,其中所述残基根据Kabat的EU索引编号。

64.根据项53-61和63中任一项所述的配制品,其中所述Fc包含SEQ ID NO:73中所示的氨基酸序列。

65.根据项53-61、63和64中任一项所述的配制品,其中所述TACI-Fc融合蛋白示于SEQ ID NO:167中。

65.根据项53-57和61-63中任一项所述的配制品,其中所述Fc包含SEQ ID NO:81中所示的氨基酸序列。

66.根据项53-57、61-63和65中任一项所述的配制品,其中所述TACI-Fc融合蛋白示于SEQ ID NO:168中。

67.根据项53-66中任一项所述的配制品,其中所述配制品的pH是约5.2。

68.根据项53-67中任一项所述的配制品,其中所述乙酸缓冲液包含浓度从为或约5mM至为或约15mM的乙酸盐。

69.根据项53-68中任一项所述的配制品,其中所述乙酸缓冲液包含浓度为或约10mM的乙酸盐。

70.根据项53-69中任一项所述的配制品,其中所述脯氨酸的浓度是约2%至约5%。

71.根据项53-70中任一项所述的配制品,其中所述脯氨酸的浓度是为或约3%。

72.根据项53-71中任一项所述的配制品,其中所述表面活性剂的浓度是从约0.01%至约0.025%(w/v),任选地为或约0.015%(w/v)。

73.根据项53-72中任一项所述的配制品,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯80。

74.根据项53-72中任一项所述的配制品,其中所述配制品中TACI-Fc融合蛋白的量是从约50mg至约100mg。

75.根据项53-74中任一项所述的配制品,其中所述配制品中TACI-Fc融合蛋白的量是为或约80mg。

76.根据项53-75中任一项所述的配制品,其中所述TACI-Fc融合蛋白的浓度在约50mg/mL与约200mg/mL之间。

77.根据项53-76中任一项所述的配制品,其中所述TACI-Fc融合蛋白的浓度是为或约100mg/mL。

78.根据项53-77中任一项所述的配制品,所述配制品是液体。

79.根据项53-78中任一项所述的配制品,其中所述配制品的体积是0.5mL至2.0mL。

80.根据项53-79中任一项所述的配制品,其中所述配制品的体积是为或约0.8mL。

81.一种容器,所述容器包含根据项53-80中任一项所述的配制品。

82.根据项81的容器,其中所述容器是小瓶或预填充注射筒。

83.根据项81或项82所述的容器,所述容器是小瓶,其中所述小瓶是玻璃的。

84.根据项81-83中任一项所述的容器,其中所述容器容纳多达为或约5mL的体积。

85.根据项81-84中任一项所述的容器,其中所述容器容纳多达为或约2mL的体积,任选地其中所述容器是2mL玻璃小瓶。

86.一种降低受试者中的免疫应答的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的根据项53-80中任一项所述的配制品。

87.根据项86所述的方法,其中所述受试者中的B细胞免疫应答降低,由此B细胞成熟、分化和/或增殖被降低或抑制。

88.根据项86或项87所述的方法,其中所述受试者中的APRIL、BAFF或APRIL/BAFF异三聚体的循环水平降低。

89.根据项86-88中任一项所述的方法,其中降低所述免疫应答治疗所述受试者的疾病、障碍或病症。

90.一种降低受试者中APRIL、BAFF或APRIL/BAFF异三聚体的循环水平的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据项53-80中任一项所述的配制品。

91.一种治疗受试者的疾病、障碍或病症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的根据项53-80中任一项所述的配制品。

92.根据项90或项91所述的方法,其中所述疾病、障碍或病症是自身免疫性疾病、和炎性病症、B细胞癌、抗体介导的病状、肾病、移植物排斥、移植物抗宿主病或病毒感染。

93.根据项91或项92所述的方法,其中所述疾病、障碍或病症选自:系统性红斑狼疮(SLE);舍格伦综合征、硬皮病、多发性硬化、糖尿病、多发性肌炎、原发性胆汁性肝硬化、IgA肾病、IgA血管炎、视神经炎、淀粉样变性、抗磷脂抗体综合征(APS)、自身免疫性多内分泌腺综合征II型(APS II)、自身免疫性甲状腺疾病(AITD)、格雷夫斯病、自身免疫性肾上腺炎、寻常型天疱疮。

94.根据项91或项92所述的方法,其中所述疾病或障碍是自身抗体相关肾小球疾病。

95.根据项94所述的方法,其中所述自身抗体相关肾小球疾病是免疫球蛋白(Ig)A肾病(IgAN)、狼疮性肾炎(LN)、原发性膜性肾病(pMN)或肾抗嗜中性粒细胞胞质抗体(ANCA)相关血管炎(AAV)。

96.根据项91或项92所述的方法,其中所述疾病、障碍或病症是B细胞癌并且所述癌症是骨髓瘤。

97.根据项53-80中任一项所述的药物组合物,所述药物组合物用于降低受试者中的免疫应答。

98.根据项53-80中任一项所述的配制品在制造用于降低受试者中的免疫应答的药剂中的用途。

99.根据项97所述的用于所述用途的配制品或根据项98所述的用途,其中所述免疫应答是B细胞免疫应答,其中降低所述免疫应答降低或抑制B细胞成熟、分化和/或增殖。

100.根据项97-99中任一项所述的用于所述用途的配制品或用途,其中降低所述免疫应答降低所述受试者的APRIL、BAFF或APRIL/BAFF异三聚体的循环水平。

101.根据项98-100中任一项所述的用于所述用途的配制品或用途,其中降低所述免疫应答治疗所述受试者的疾病、障碍或病症。

102.根据项53-80中任一项所述的配制品,所述配制品用于治疗受试者的疾病、障碍或病症。

103.根据项53-80中任一项所述的配制品在制造用于治疗受试者的疾病、障碍或病症的药剂中的用途。

104.根据项102所述的配制品或根据项103所述的用途,其中所述疾病、障碍或病症是自身免疫性疾病、炎性病症、B细胞癌、抗体介导的病状、肾病、移植物排斥、移植物抗宿主病或病毒感染。

105.根据项102-104中任一项所述的用于所述用途的配制品或用途,其中所述疾病、障碍或病症选自:系统性红斑狼疮(SLE);舍格伦综合征、硬皮病、多发性硬化、糖尿病、多发性肌炎、原发性胆汁性肝硬化、IgA肾病、IgA血管炎、视神经炎、淀粉样变性、抗磷脂抗体综合征(APS)、自身免疫性多内分泌腺综合征II型(APS II)、自身免疫性甲状腺疾病(AITD)、格雷夫斯病、自身免疫性肾上腺炎和寻常型天疱疮。

106.根据项102-104中任一项所述的用于所述用途的配制品或用途,其中所述疾病或障碍是自身抗体相关肾小球疾病。

107.根据项106所述的用于所述用途的配制品或用途,其中所述自身抗体相关肾小球疾病是免疫球蛋白(Ig)A肾病(IgAN)、狼疮性肾炎(LN)、原发性膜性肾病(pMN)或肾抗嗜中性粒细胞胞质抗体(ANCA)相关血管炎(AAV)。

108.根据项102-104中任一项所述的用于所述用途的配制品或用途,其中所述疾病、障碍或病症是B细胞癌并且所述癌症是骨髓瘤。

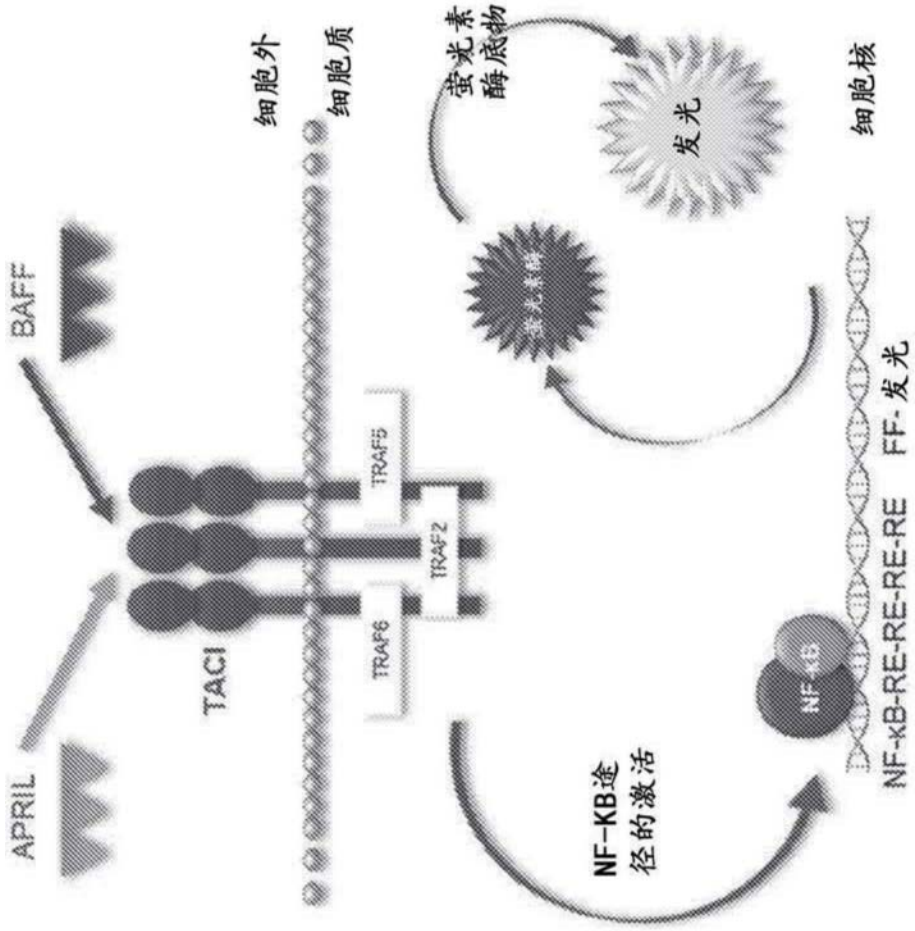

细胞外
细胞质
BAFF
APRIL
TACI
TRAF6
TRAF2
TRAF5
NF-KB途
径的激活
NF-kB
NF-kB-RE-RE-RE-RE-RE
FF-发光
细胞核
发光
萤光素
酶底物

图1

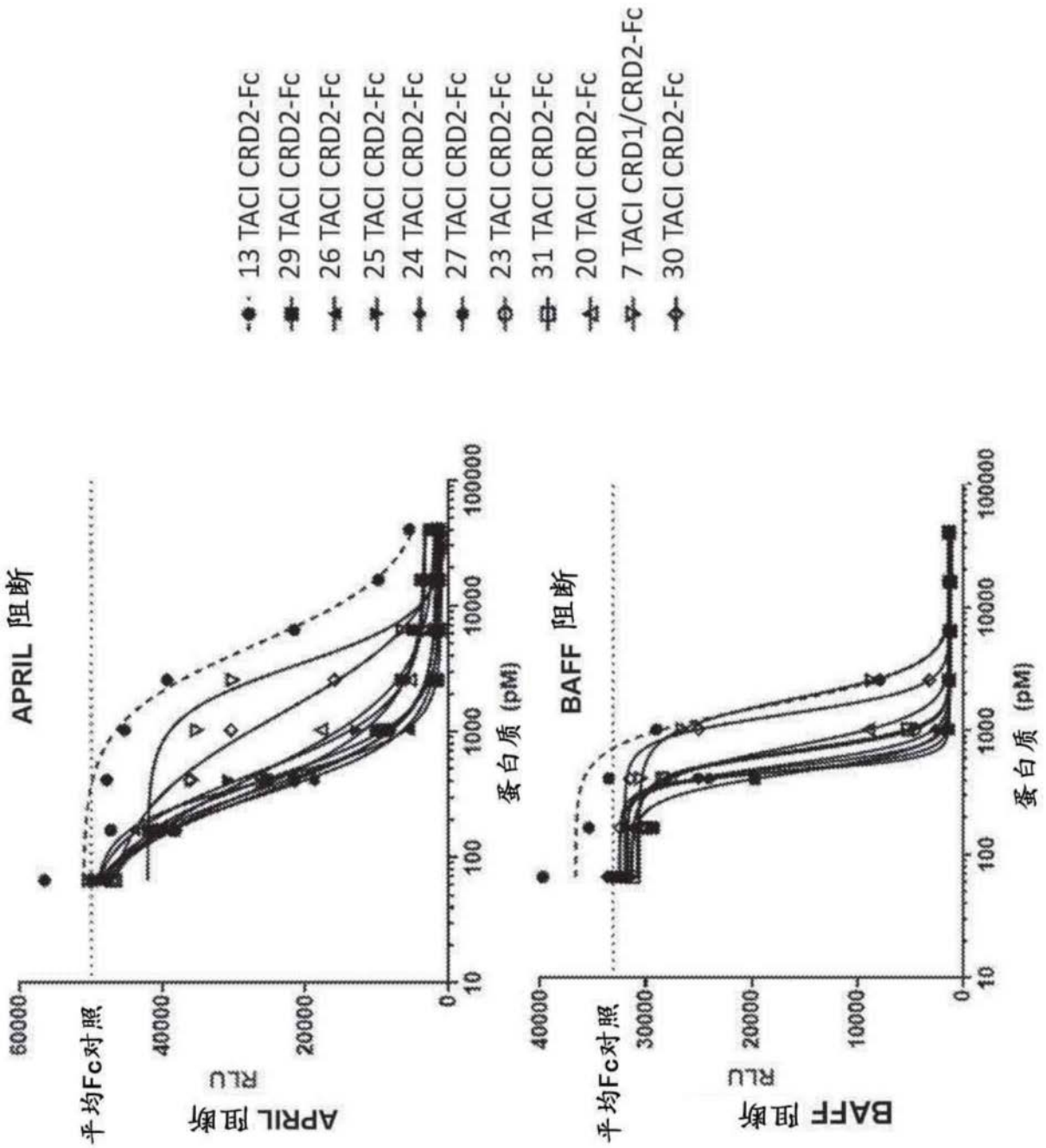

13 TACI CRD2-Fc
29 TACI CRD2-Fc
26 TACI CRD2-Fc
25 TACI CRD2-Fc
24 TACI CRD2-Fc
27 TACI CRD2-Fc
23 TACI CRD2-Fc
31 TACI CRD2-Fc
20 TACI CRD2-Fc
7 TACI CRD1/CRD2-Fc
30 TACI CRD2-Fc
APRIL 阻断
APRIL 阻断
RLU
平均Fc对照
60000
40000
20000
0
10
100
1000
10000
100000
蛋白质 (pM)
BAFF 阻断
BAFF 阻断
RLU
平均Fc对照
40000
30000
20000
10000
0
10
100
1000
10000
100000
蛋白质 (pM)

图2

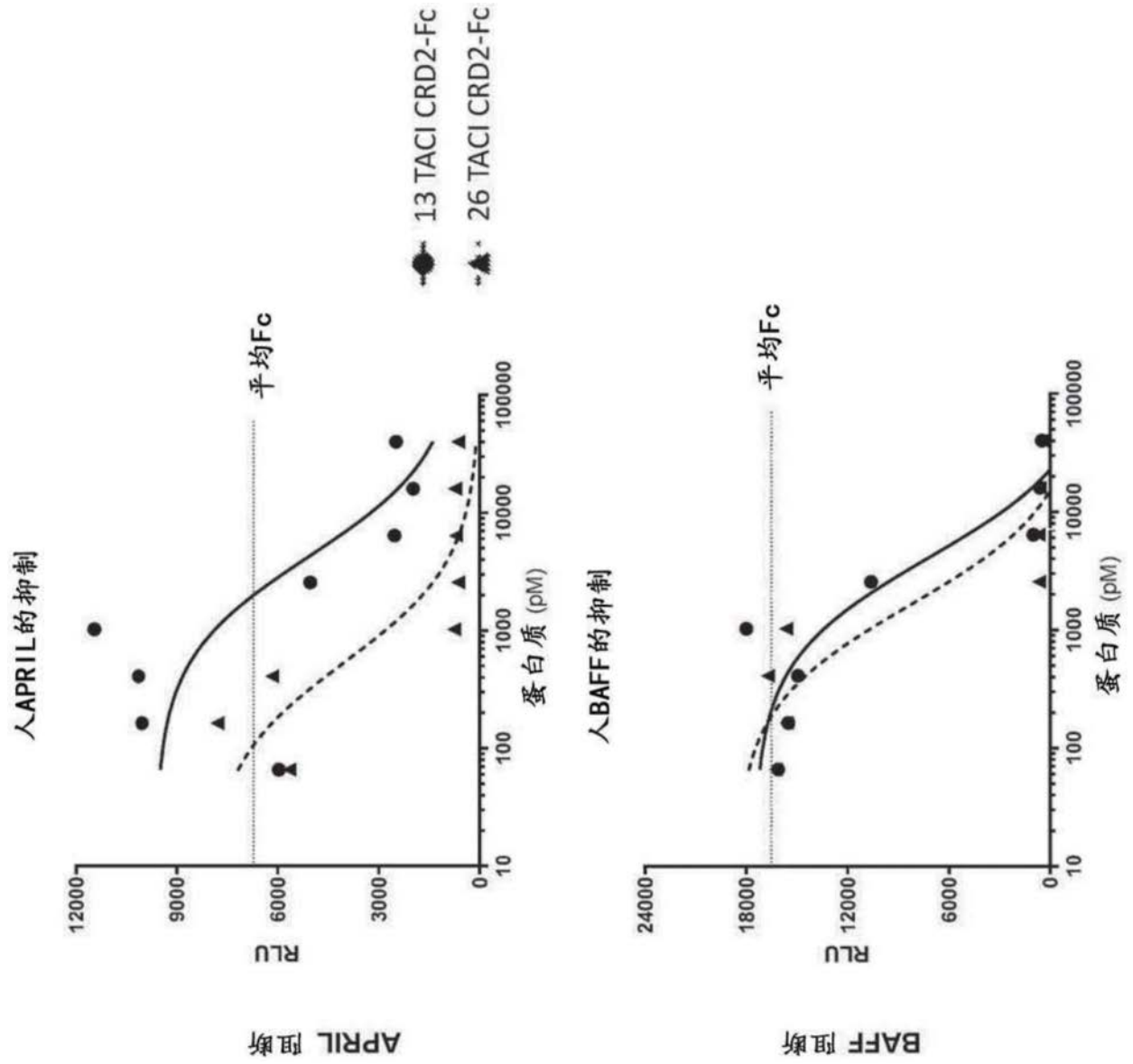

APRIL 阻断
BAFF 阻断
RLU
蛋白质 (pM)
人APRIL的抑制
人BAFF的抑制
平均Fc
13 TACI CRD2-Fc
26 TACI CRD2-Fc
12000
9000
6000
3000
0
24000
18000
12000
6000
10
100
1000
10000
100000

图3A

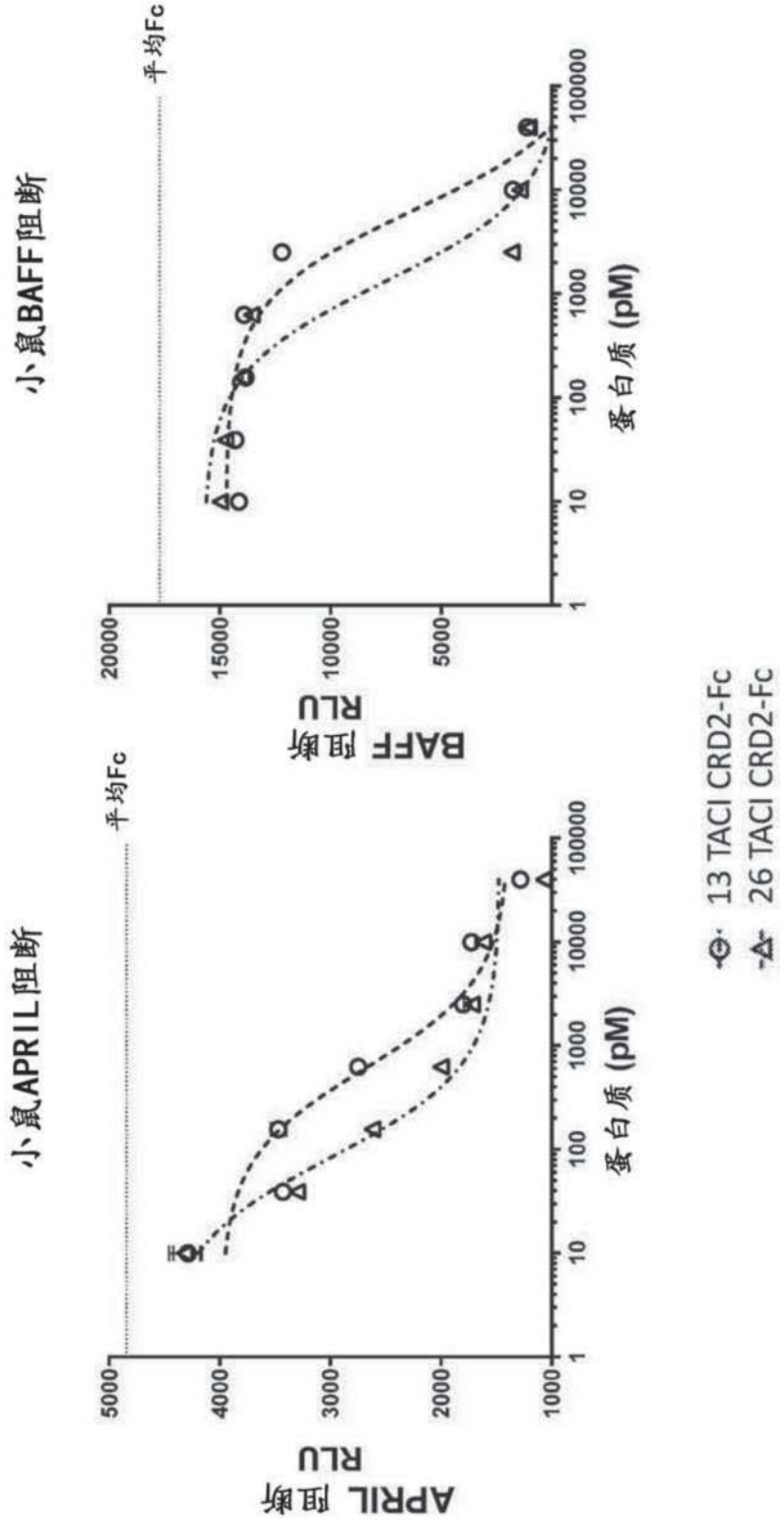

小鼠APRIL阻断
平均Fc
APRIL 阻断 RLU
蛋白质 (pM)
小鼠BAFF阻断
平均Fc
BAFF 阻断 RLU
蛋白质 (pM)
13 TACI CRD2-Fc
26 TACI CRD2-Fc

图3B

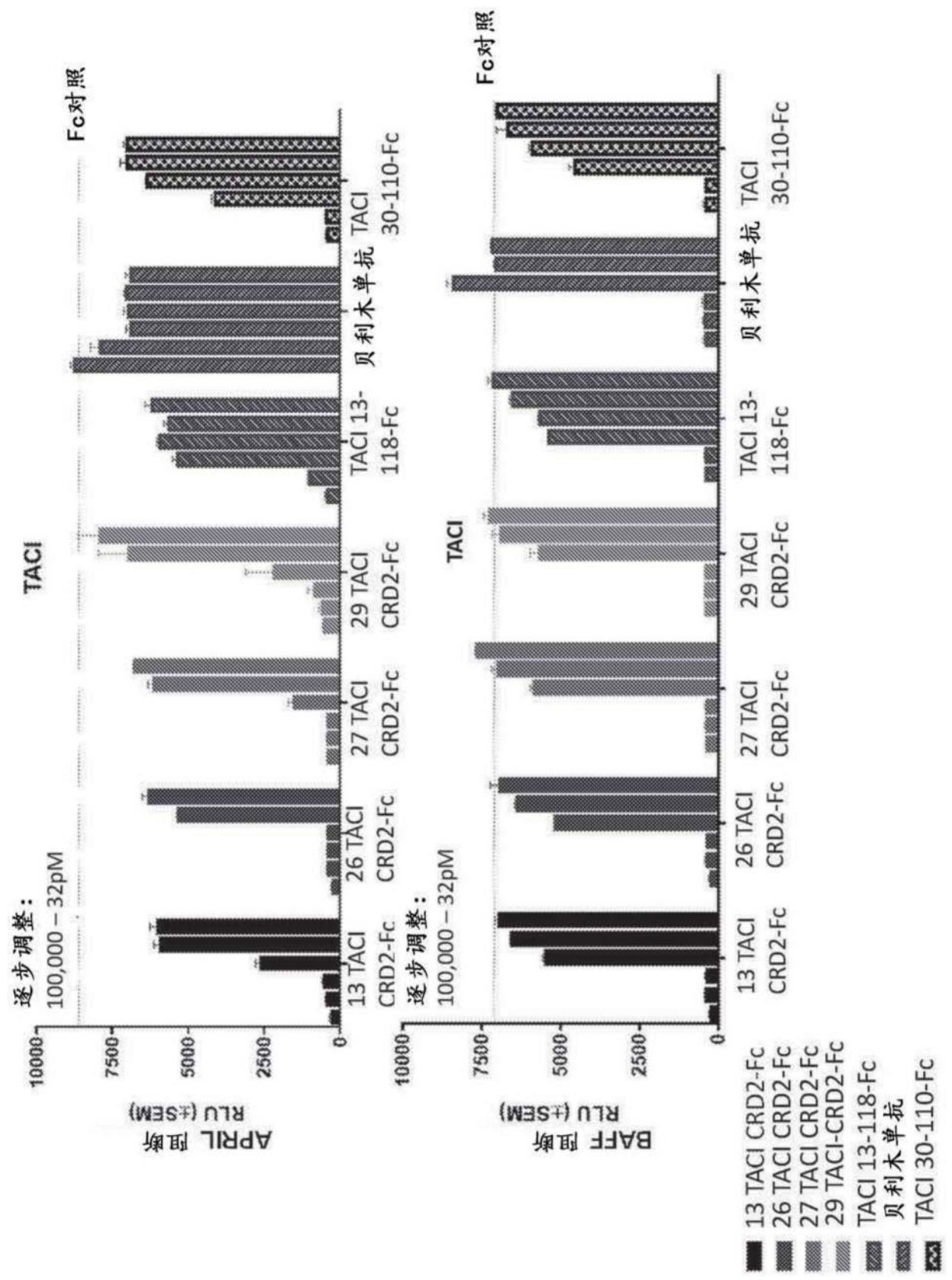
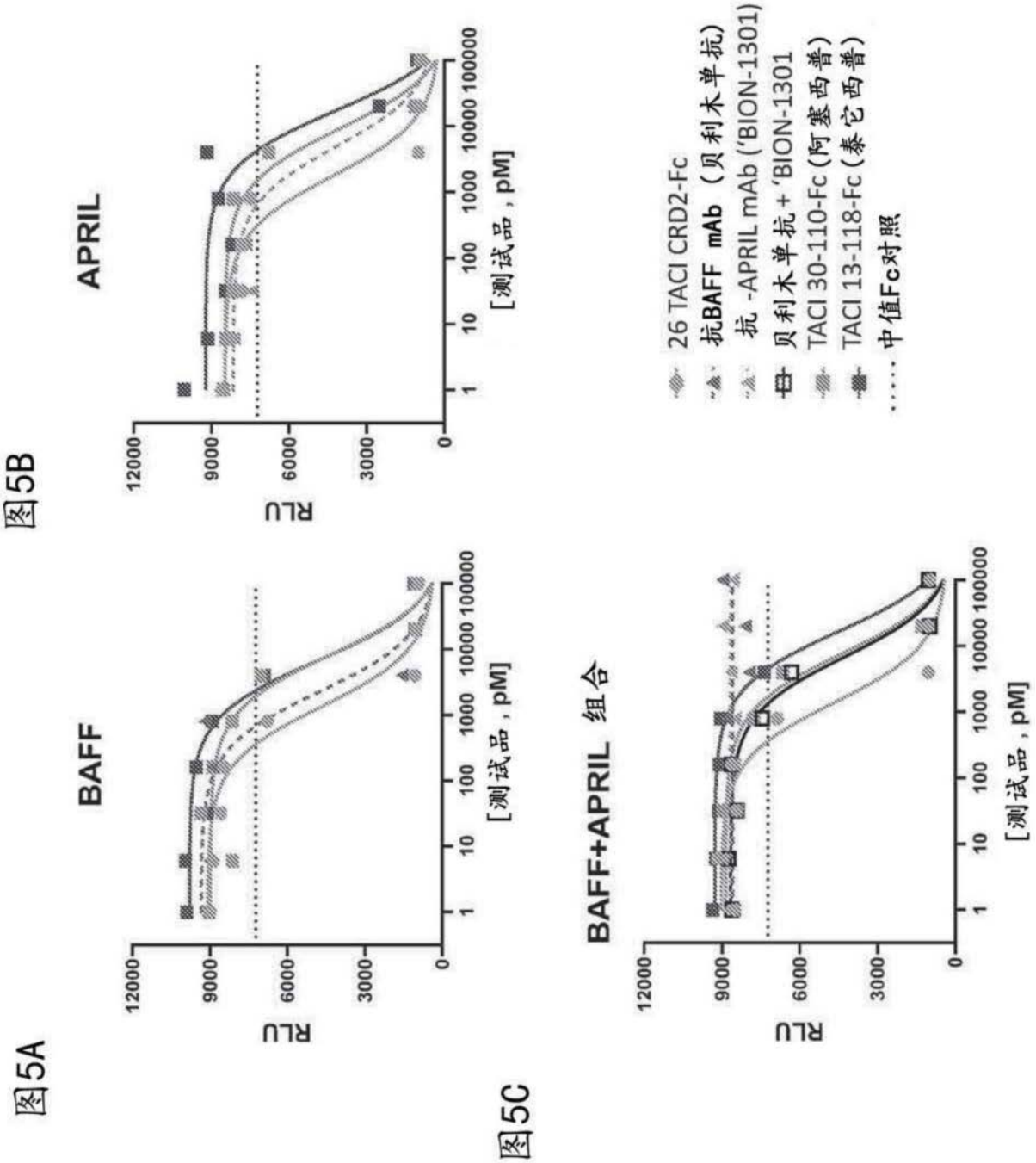

APRIL 阻断
RLU (±SEM)
逐步调整：
100,000 – 32pM
TACI
Fc对照
13 TACI CRD2-Fc
26 TACI CRD2-Fc
27 TACI CRD2-Fc
29 TACI CRD2-Fc
TACI 13-118-Fc
贝利木单抗
TACI 30-110-Fc
BAFF 阻断
RLU (±SEM)
逐步调整：
100,000 – 32pM
TACI
Fc对照
13 TACI CRD2-Fc
26 TACI CRD2-Fc
27 TACI CRD2-Fc
29 TACI-CRD2-Fc
TACI 13-118-Fc
贝利木单抗
TACI 30-110-Fc

图4


图5A
BAFF
RLU
12000
9000
6000
3000
0
1
10
100
1000
10000
100000
[测试品，pM]
图5B
APRIL
图5C
BAFF+APRIL 组合
26 TACI CRD2-Fc
抗BAFF mAb（贝利木单抗）
抗 -APRIL mAb ('BION-1301)
贝利木单抗+ 'BION-1301
TACI 30-110-Fc (阿塞西普)
TACI 13-118-Fc (泰它西普)
中值Fc对照

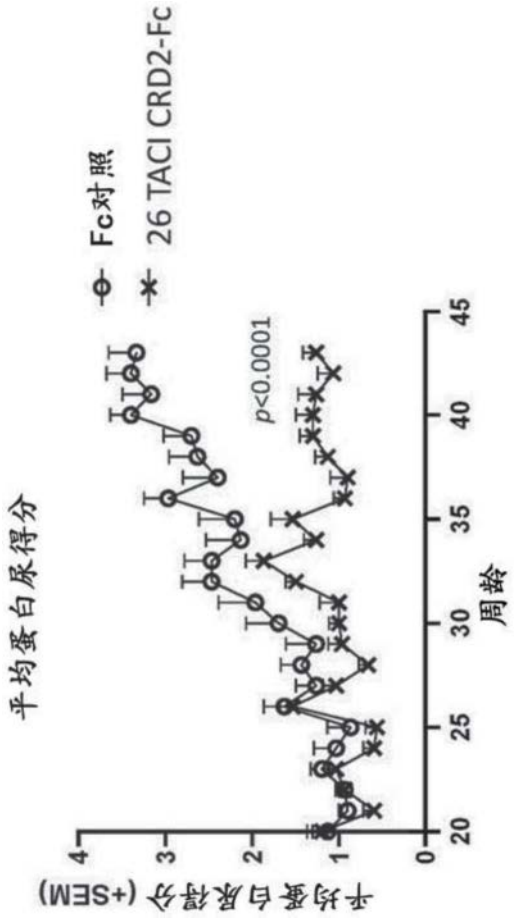

Fc对照
26 TACI CRD2-Fc
p<0.0001
平均蛋白尿得分
平均蛋白尿得分 (+SEM)
周龄
0
1
2
3
4
20
25
30
35
40
45

图6A

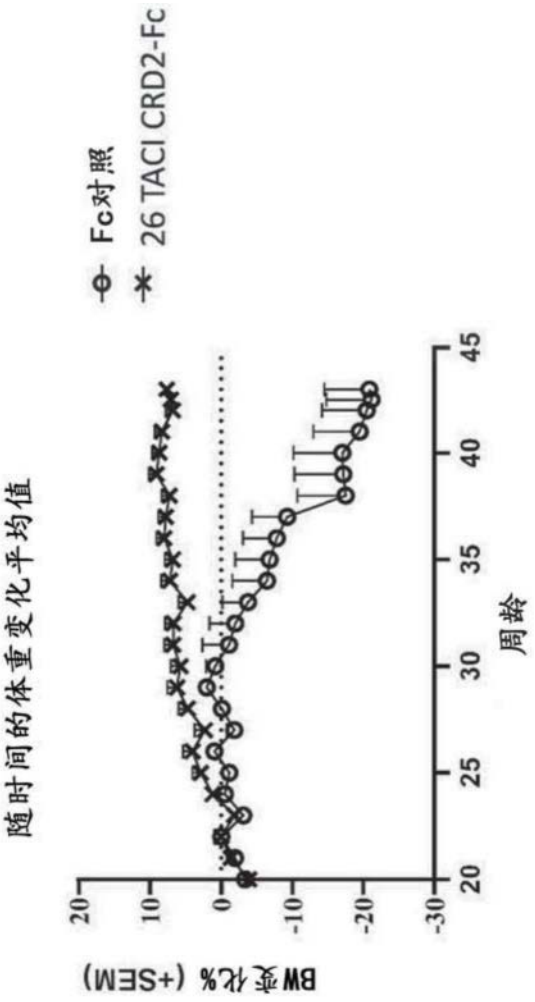

Fc对照
26 TACI CRD2-Fc
随时间的体重变化平均值
BW变化% (+SEM)
20
10
0
-10
-20
-30
20
25
30
35
40
45
周龄

图6B

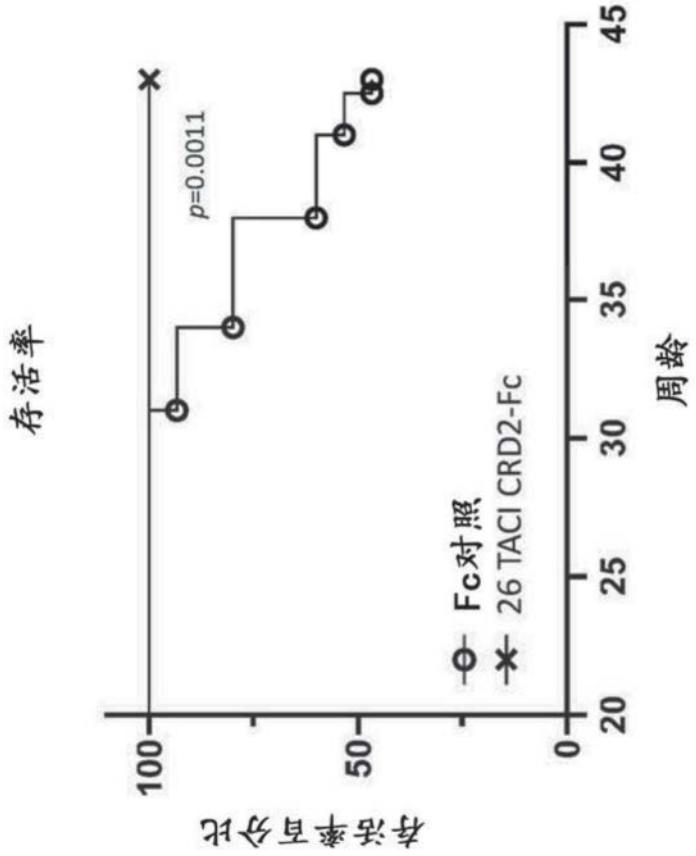

存活率
p=0.0011
Fc对照
26 TACI CRD2-Fc
周龄
存活率百分比
100
50
0
20
25
30
35
40
45

图6C

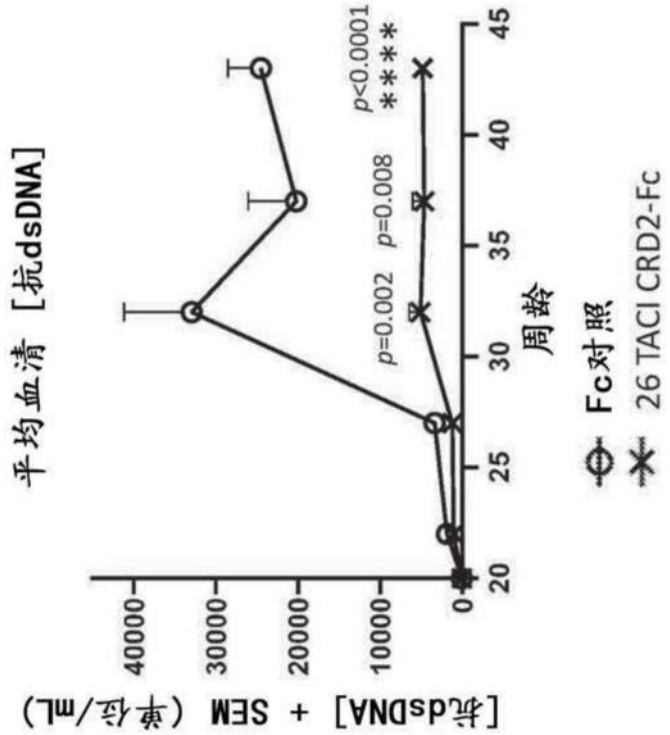

平均血清 [抗dsDNA]
p=0.002
p=0.008
p<0.0001
****
Fc对照
26 TACI CRD2-Fc
周龄
[抗dsDNA] + SEM (单位/mL)
40000
30000
20000
10000
0
20
25
30
35
40
45

图6D

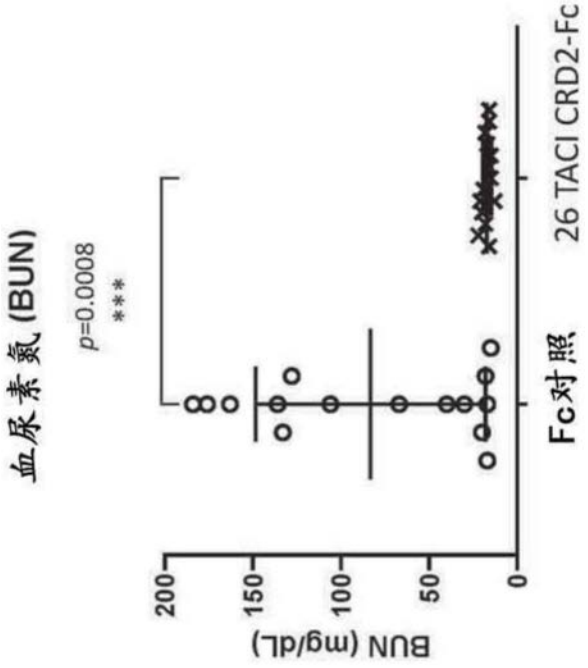


图6E

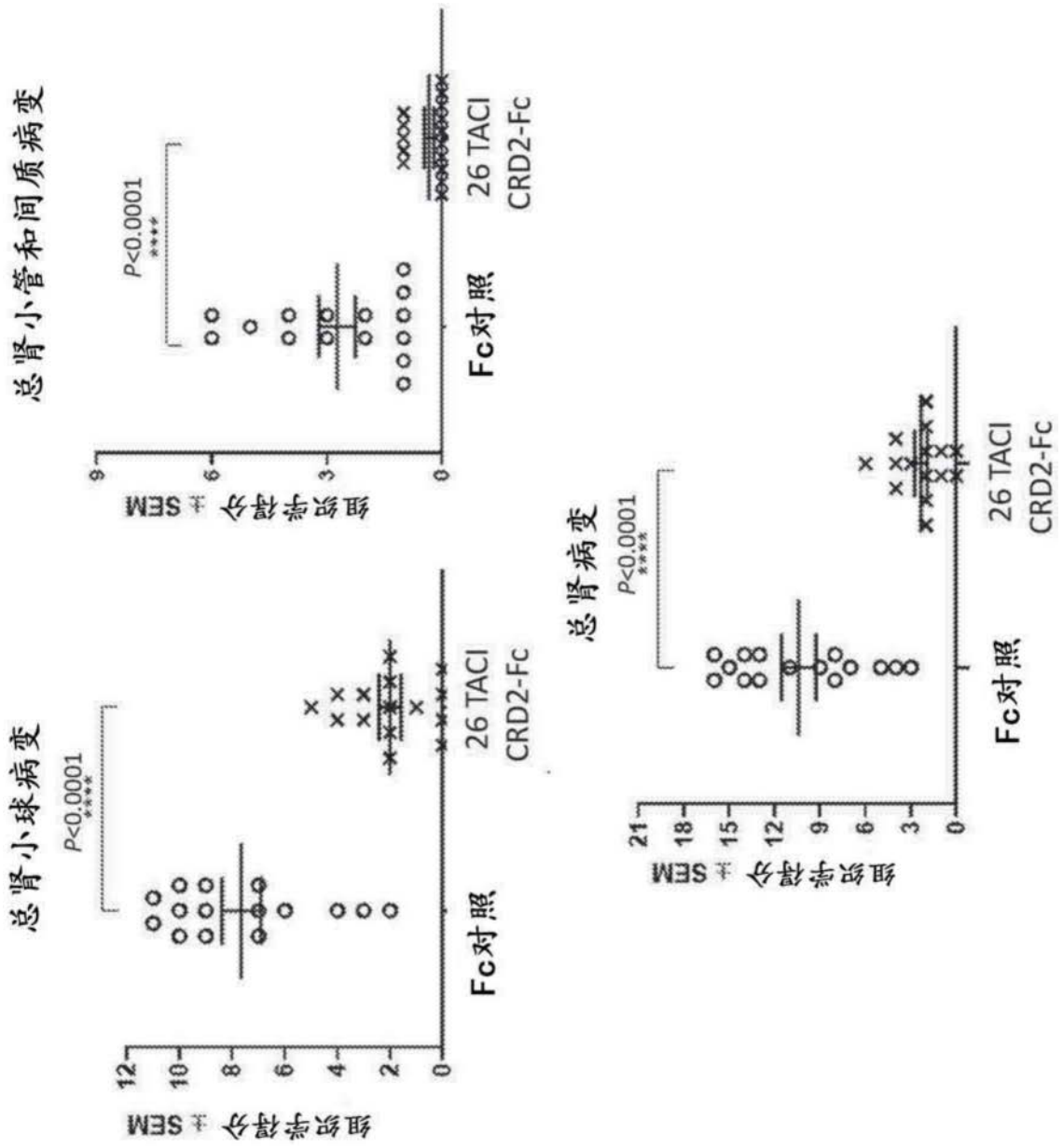

总肾小球病变
P<0.0001
****
组织学得分 ± SEM
Fc对照
26 TACI
CRD2-Fc
总肾小管和间质病变
P<0.0001
****
组织学得分 ± SEM
Fc对照
26 TACI
CRD2-Fc
总肾病变
P<0.0001
****
组织学得分 ± SEM
Fc对照
26 TACI
CRD2-Fc

图6F

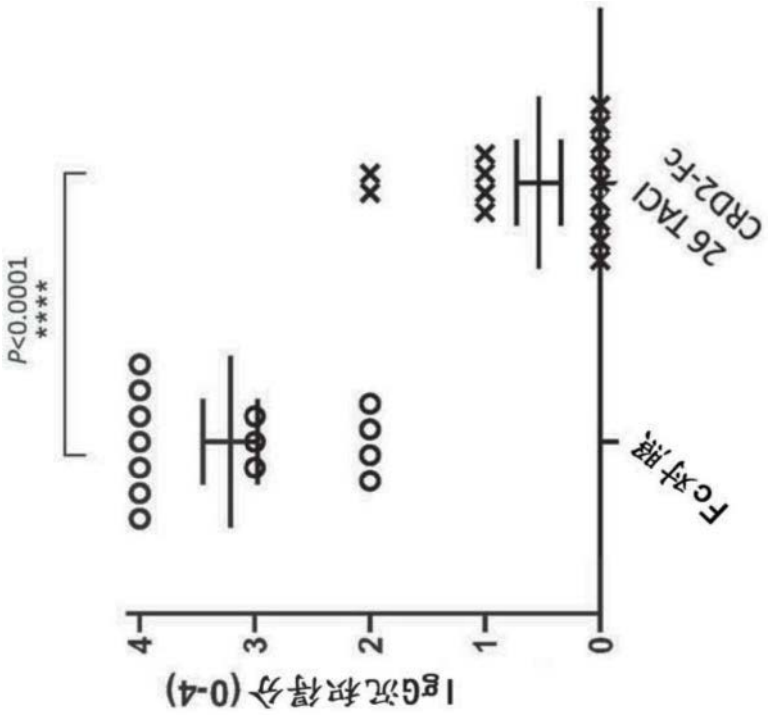

IgG沉积得分(0-4)
0
1
2
3
4
Fc对照
26 TACI CRD2-Fc
P<0.0001
****

图6G

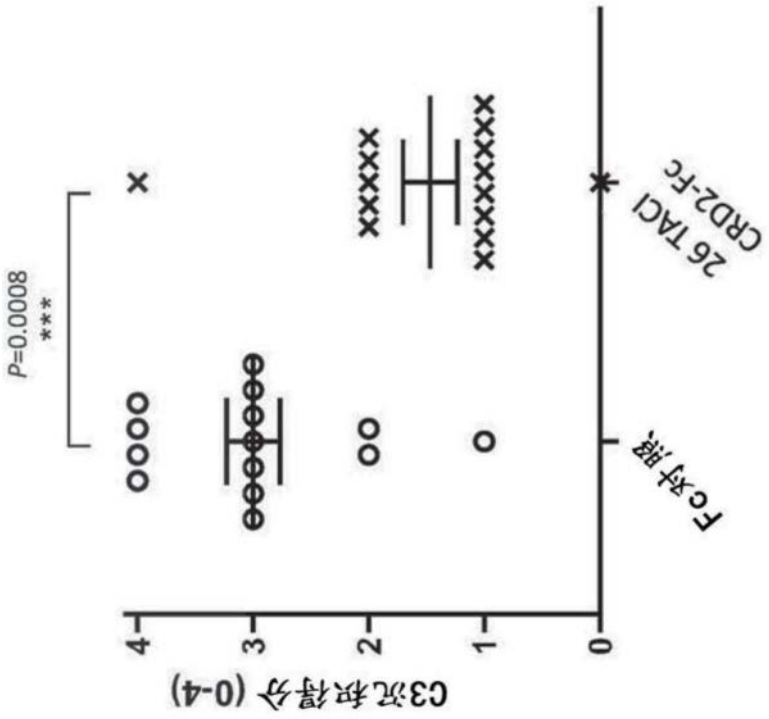

C3沉积得分(0-4)
0
1
2
3
4
Fc对照
26 TACI CRD2-Fc
P=0.0008
***

图6H

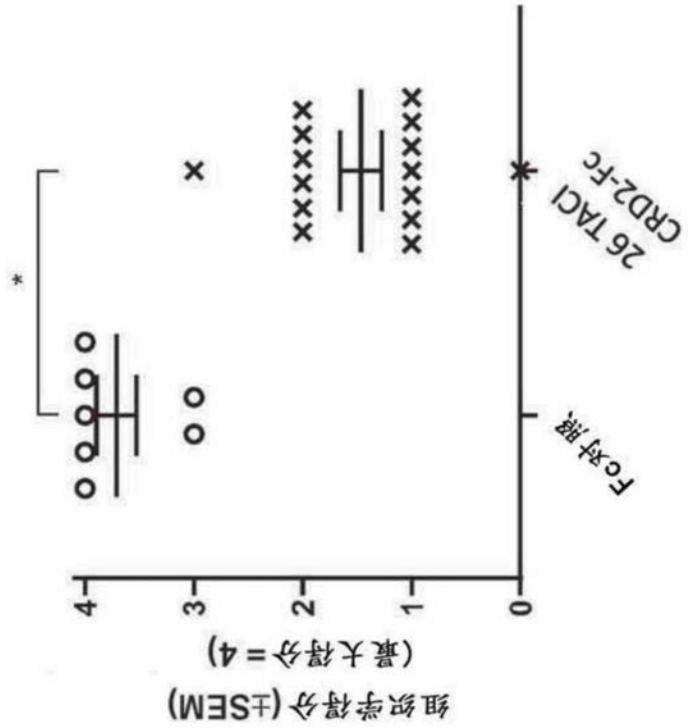

组织学得分(±SEM)
(最大得分=4)
0
1
2
3
4
Fc对照
26 TACI CRD2-Fc
*

图6I

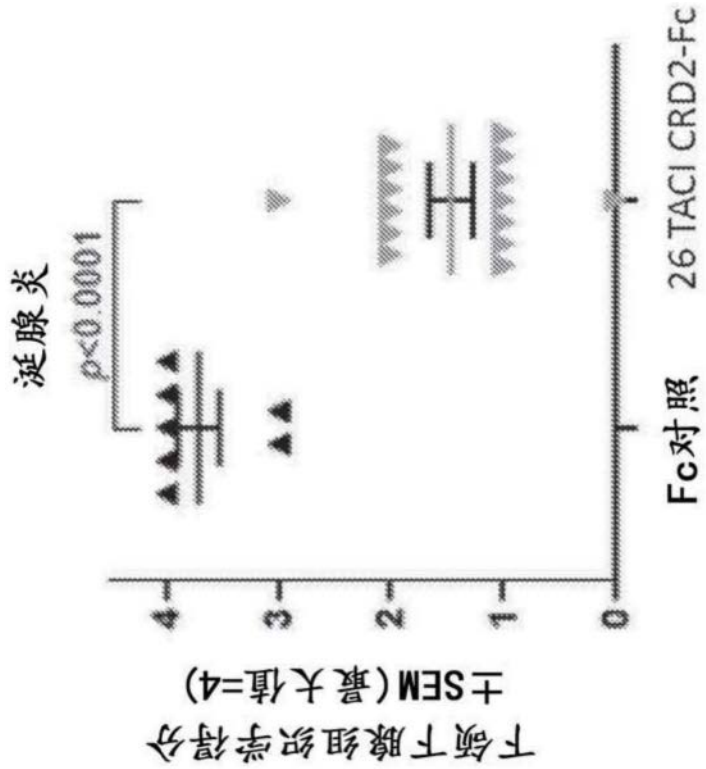

下颌下腺组织学得分
±SEM(最大值=4)
0
1
2
3
4
Fc对照
26 TACI CRD2-Fc
涎腺炎
p<0.0001

图6J

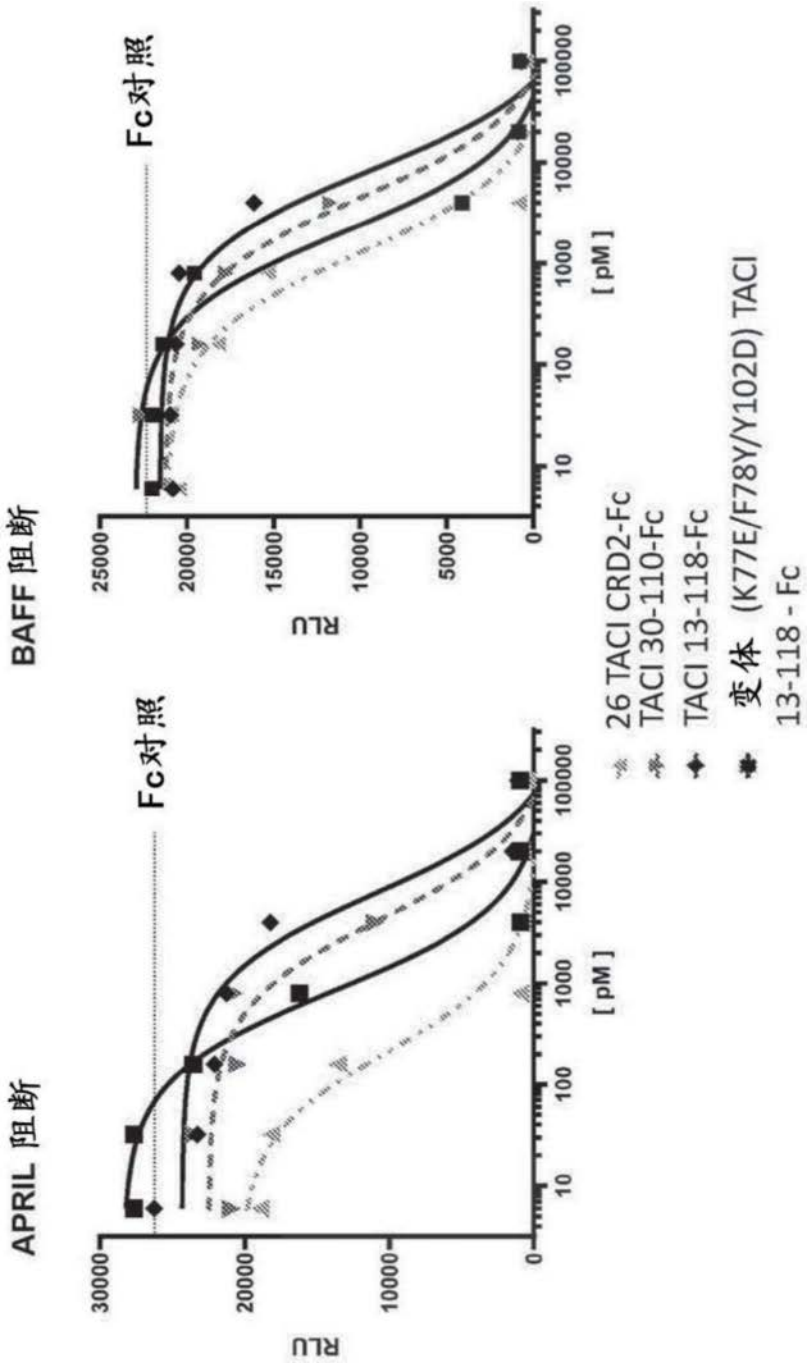

BAFF 阻断
APRIL 阻断
Fc对照
Fc对照
RLU
RLU
[pM]
[pM]
26 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110-Fc
TACI 13-118-Fc
变体 (K77E/F78Y/Y102D) TACI 13-118 - Fc

图7

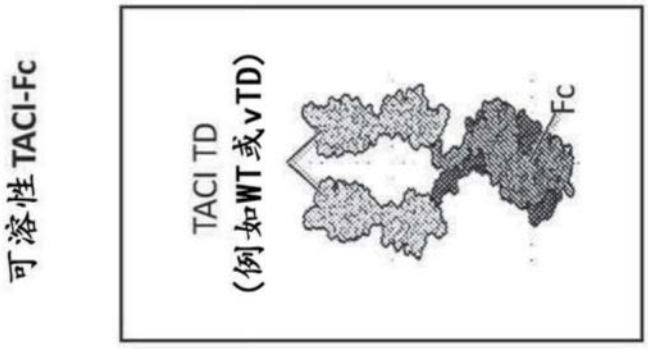

可溶性 TACI-Fc
TACI TD
(例如WT或vTD)
Fc

图8A

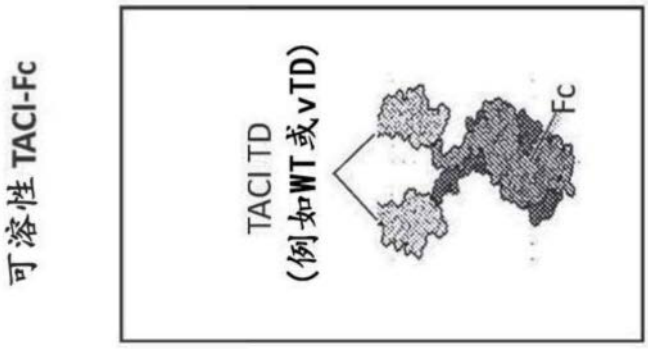

可溶性 TACI-Fc
TACI TD
(例如WT或vTD)
Fc

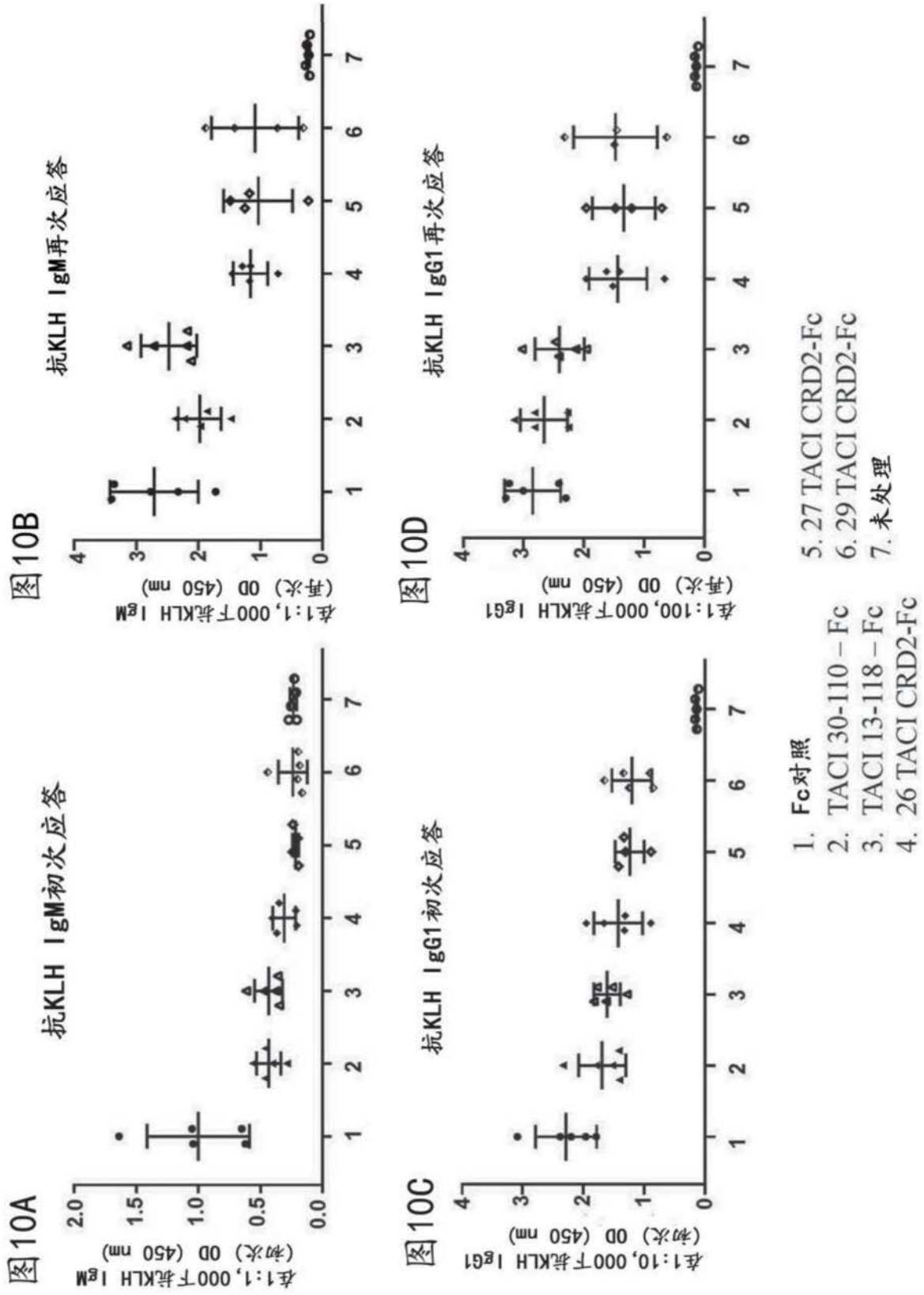
图8B

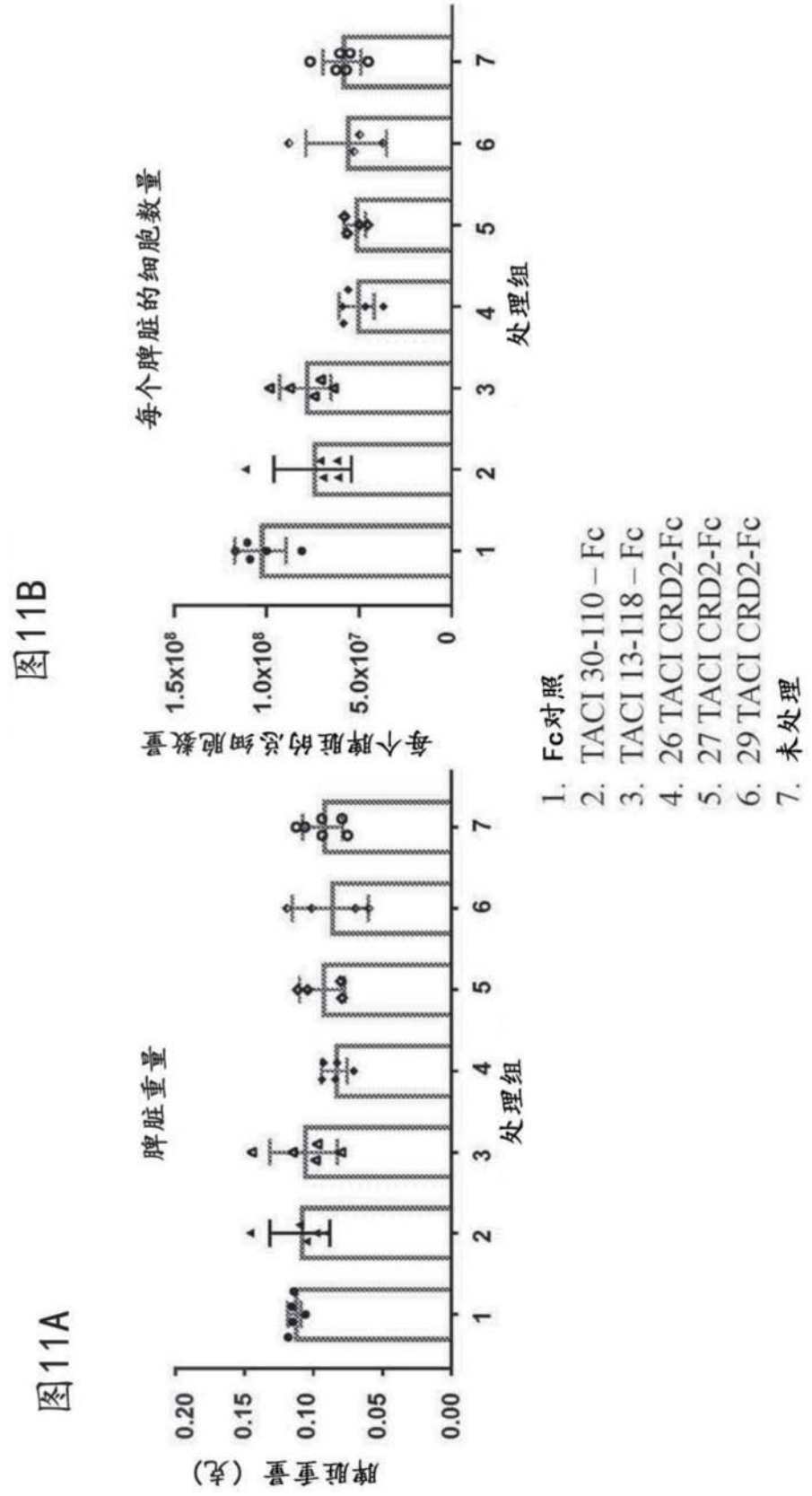
```
TACI 122  MSGLGRSRRGGRSRVDQEERFPQGLWTGVAMRSCPEEQYWDPLLGTCMSCKTICNHQSQR  60
TACI 13   ------------------------------------------------------------  0

TACI 122  TCAAFCRSLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPVNLPPELRR  120
TACI 13   ------SLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRS----------  43
                 ************************************

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

图9


图10A
抗KLH IgM初次应答
在1:1,000下抗KLH IgM
(初次) OD (450 nm)
图10B
抗KLH IgM再次应答
在1:1,000下抗KLH IgM
(再次) OD (450 nm)
图10C
抗KLH IgG1初次应答
在1:10,000下抗KLH IgG1
(初次) OD (450 nm)
图10D
抗KLH IgG1再次应答
在1:100,000下抗KLH IgG1
(再次) OD (450 nm)
1. Fc对照
2. TACI 30-110 – Fc
3. TACI 13-118 – Fc
4. 26 TACI CRD2-Fc
5. 27 TACI CRD2-Fc
6. 29 TACI CRD2-Fc
7. 未处理


图11A
脾脏重量
脾脏重量（克）
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
1
2
3
4
5
6
7
处理组
图11B
每个脾脏的细胞数量
每个脾脏的细胞数量
1.5x10⁸
1.0x10⁸
5.0x10⁷
0
1
2
3
4
5
6
7
处理组
1. Fc对照
2. TACI 30-110 – Fc
3. TACI 13-118 – Fc
4. 26 TACI CRD2-Fc
5. 27 TACI CRD2-Fc
6. 29 TACI CRD2-Fc
7. 未处理

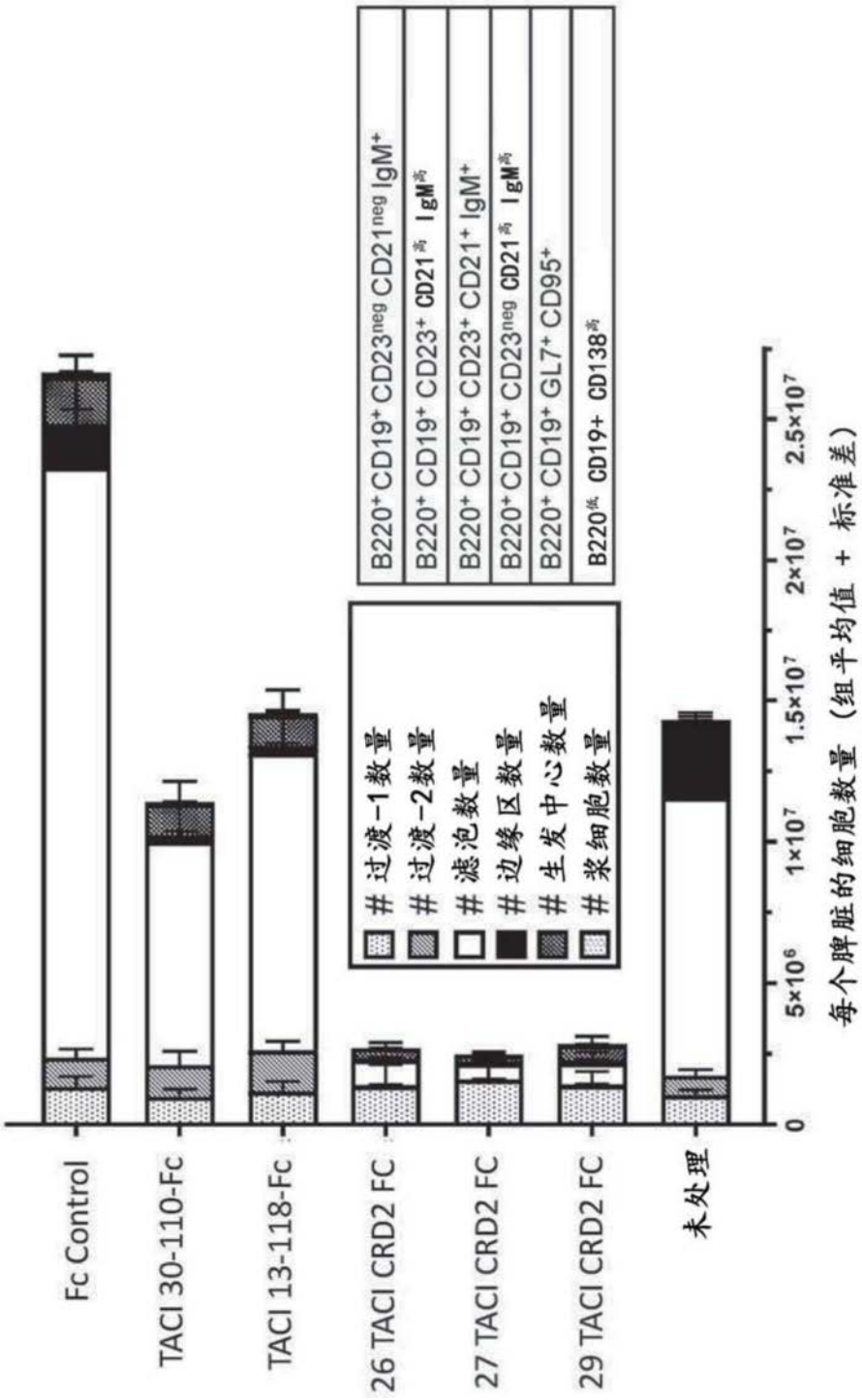

Fc Control
TACI 30-110-Fc
TACI 13-118-Fc
26 TACI CRD2 FC
27 TACI CRD2 FC
29 TACI CRD2 FC
未处理
0
5×10⁶
1×10⁷
1.5×10⁷
2×10⁷
2.5×10⁷
每个脾脏的细胞数量（组平均值 + 标准差）
过渡-1数量
过渡-2数量
滤泡数量
边缘区数量
生发中心数量
浆细胞数量
B220⁺CD19⁺CD23^neg CD21^neg IgM⁺
B220⁺ CD19⁺ CD23⁺ CD21^高 IgM^高
B220⁺ CD19⁺ CD23⁺ CD21⁺ IgM⁺
B220⁺CD19⁺ CD23^neg CD21^高 IgM^高
B220⁺ CD19⁺ GL7⁺ CD95⁺
B220^低 CD19+ CD138^高

图12

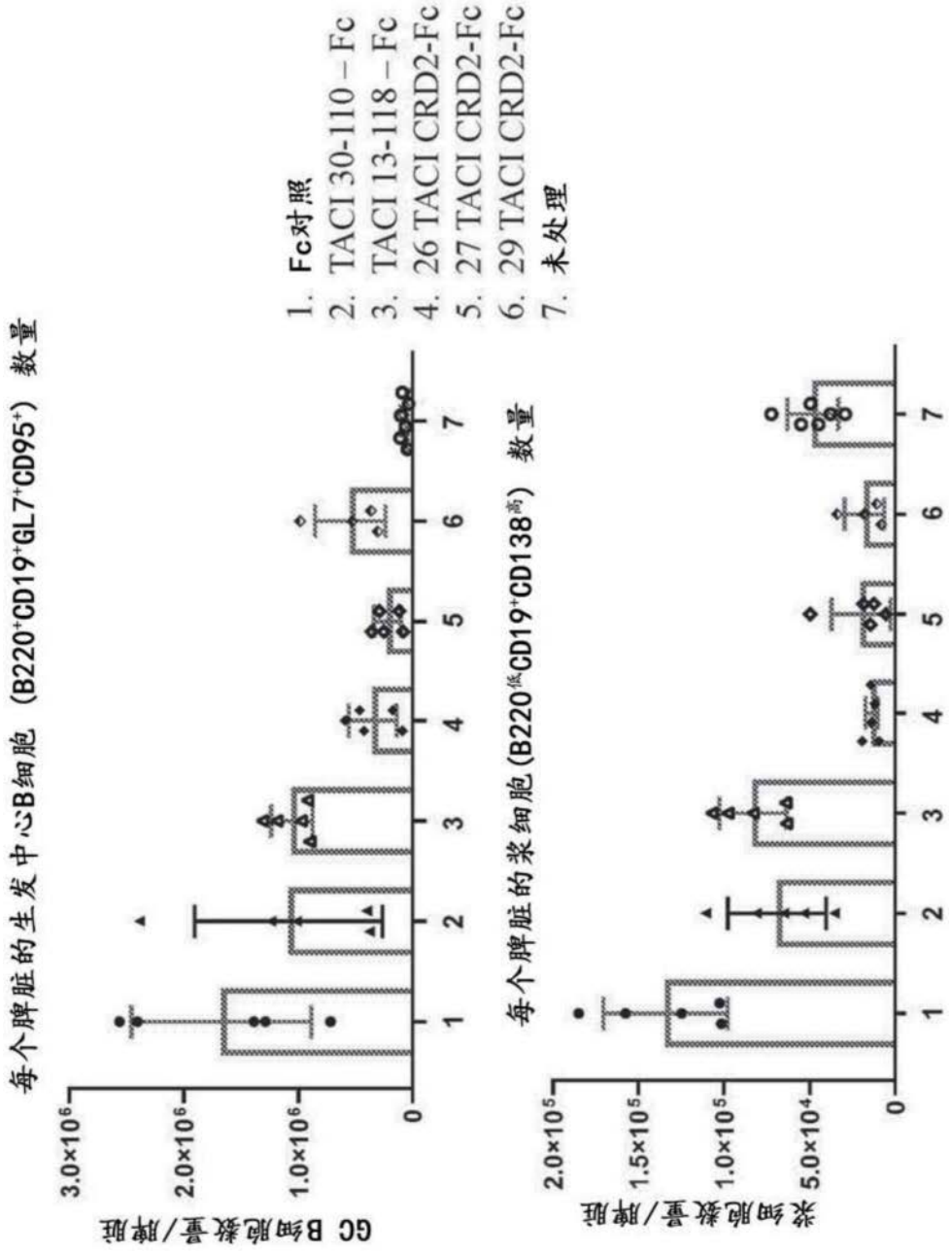
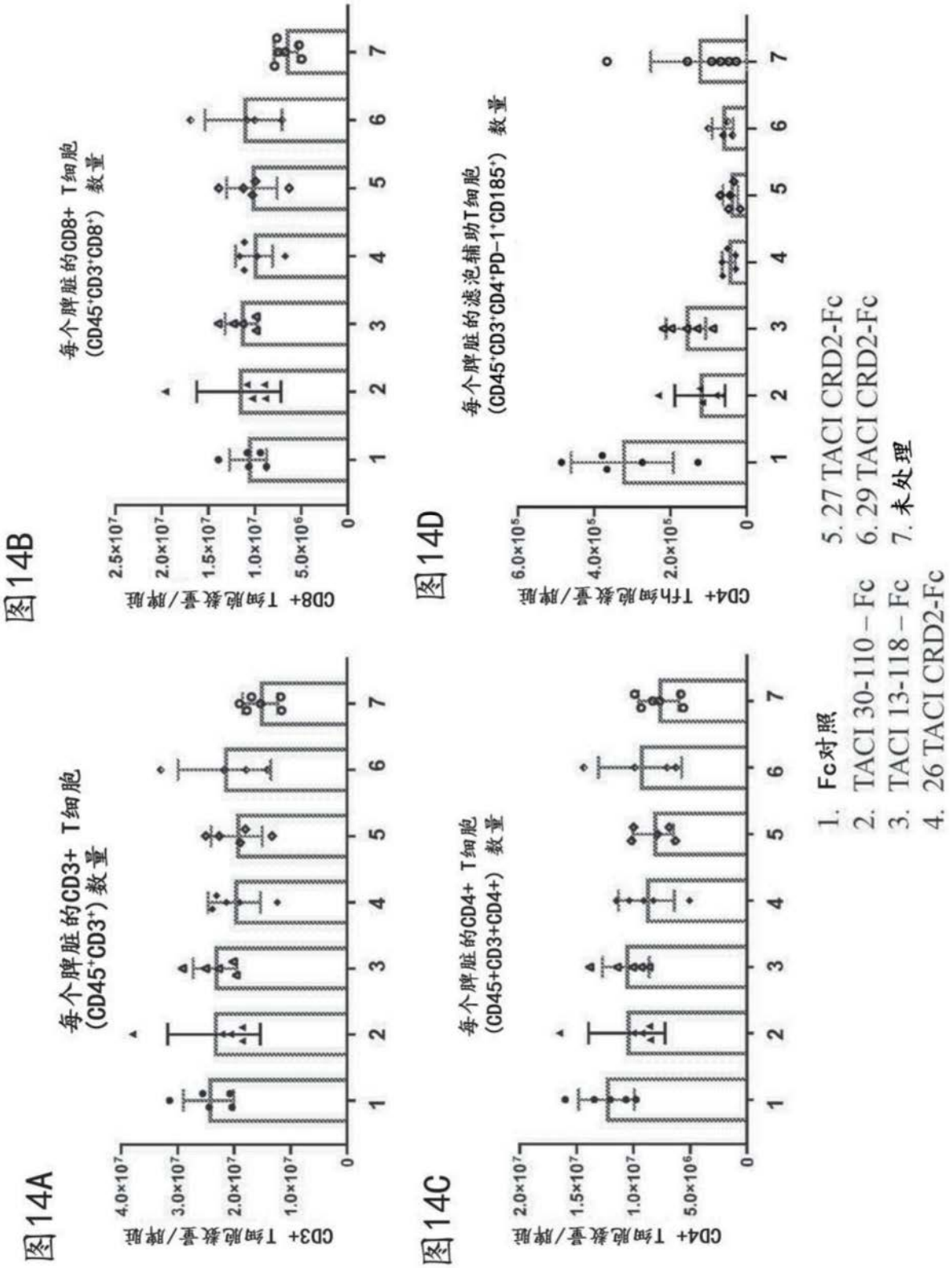

每个脾脏的生发中心B细胞 (B220+CD19+GL7+CD95+) 数量
GC B细胞数量/脾脏
3.0×10^6
2.0×10^6
1.0×10^6
0
1 2 3 4 5 6 7
每个脾脏的浆细胞 (B220低CD19+CD138高) 数量
浆细胞数量/脾脏
2.0×10^5
1.5×10^5
1.0×10^5
5.0×10^4
0
1 2 3 4 5 6 7
1. Fc对照
2. TACI 30-110 – Fc
3. TACI 13-118 – Fc
4. 26 TACI CRD2-Fc
5. 27 TACI CRD2-Fc
6. 29 TACI CRD2-Fc
7. 未处理

图13


图14A
每个脾脏的CD3+ T细胞
(CD45+CD3+)数量
CD3+ T细胞数量/脾脏
4.0×10^7
3.0×10^7
2.0×10^7
1.0×10^7
0
1 2 3 4 5 6 7
图14B
每个脾脏的CD8+ T细胞
(CD45+CD3+CD8+)数量
CD8+ T细胞数量/脾脏
2.5×10^7
2.0×10^7
1.5×10^7
1.0×10^7
5.0×10^6
0
1 2 3 4 5 6 7
图14C
每个脾脏的CD4+ T细胞
(CD45+CD3+CD4+)数量
CD4+ T细胞数量/脾脏
2.0×10^7
1.5×10^7
1.0×10^7
5.0×10^6
0
1 2 3 4 5 6 7
图14D
每个脾脏的滤泡辅助T细胞
(CD45+CD3+CD4+PD-1+CD185+)数量
CD4+ Tfh细胞数量/脾脏
6.0×10^5
4.0×10^5
2.0×10^5
0
1 2 3 4 5 6 7
1. Fc对照
2. TACI 30-110 – Fc
3. TACI 13-118 – Fc
4. 26 TACI CRD2-Fc
5. 27 TACI CRD2-Fc
6. 29 TACI CRD2-Fc
7. 未处理

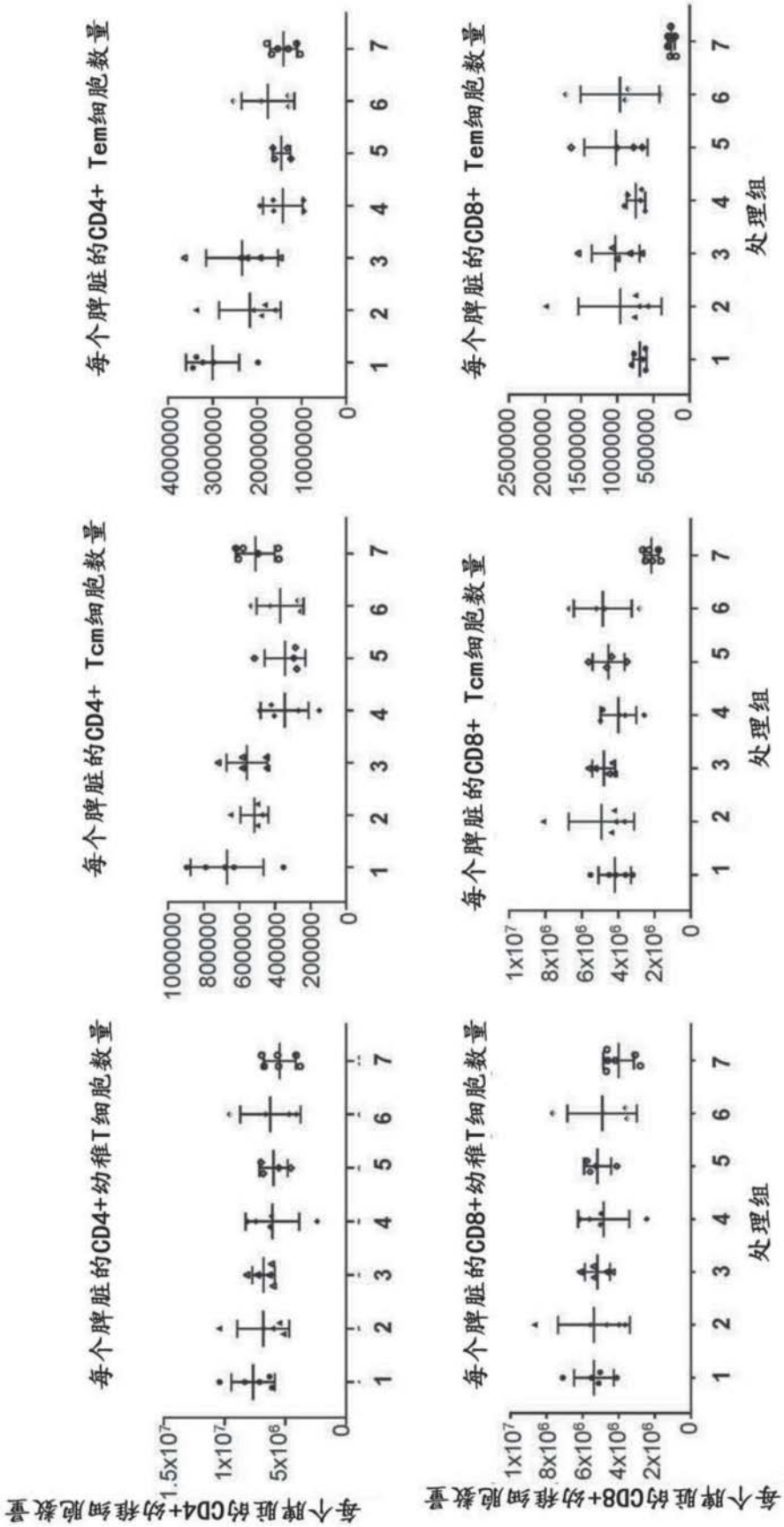

每个脾脏的CD4+幼稚T细胞数量
每个脾脏的CD4+ Tcm细胞数量
每个脾脏的CD4+ Tem细胞数量
每个脾脏的CD8+幼稚T细胞数量
每个脾脏的CD8+ Tcm细胞数量
每个脾脏的CD8+ Tem细胞数量
处理组
1. Fc对照
2. TACI 30-110 – Fc
3. TACI 13-118 – Fc
4. 26 TACI CRD2-Fc
5. 27 TACI CRD2-Fc
6. 29 TACI CRD2-Fc
7. 未处理

图15

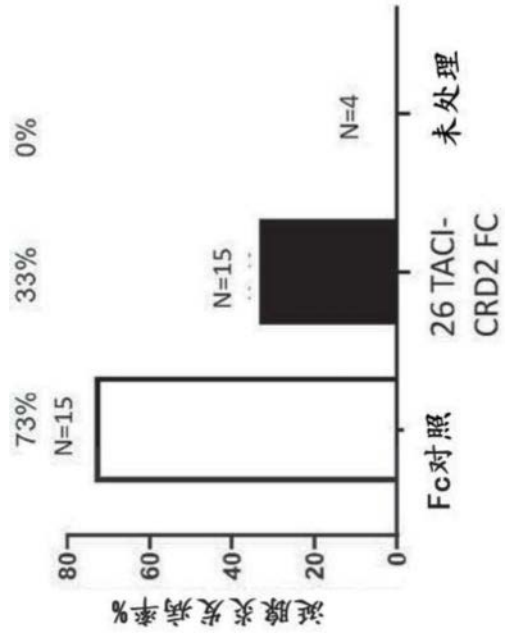

73%
N=15
33%
N=15
0%
N=4
Fc对照
26 TACI-CRD2 FC
未处理
0
20
40
60
80

图16A

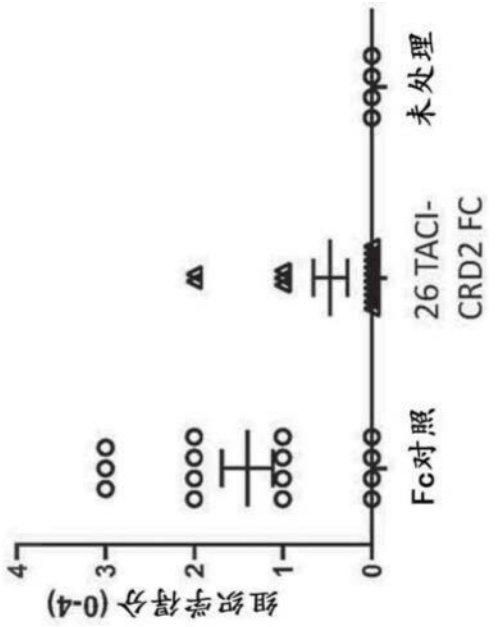

Fc对照
26 TACI-CRD2 FC
未处理
0
1
2
3
4

图16B

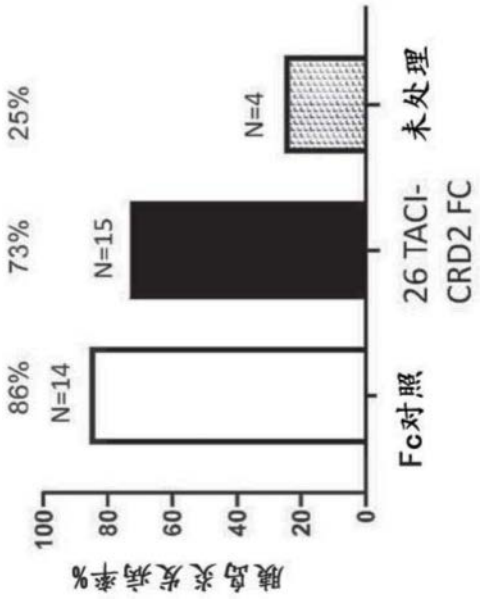

患病关节炎评分
100
80
60
40
20
0
86%
N=14
73%
N=15
25%
N=4
Fc对照
26 TACI-CRD2 FC
未处理

图17A

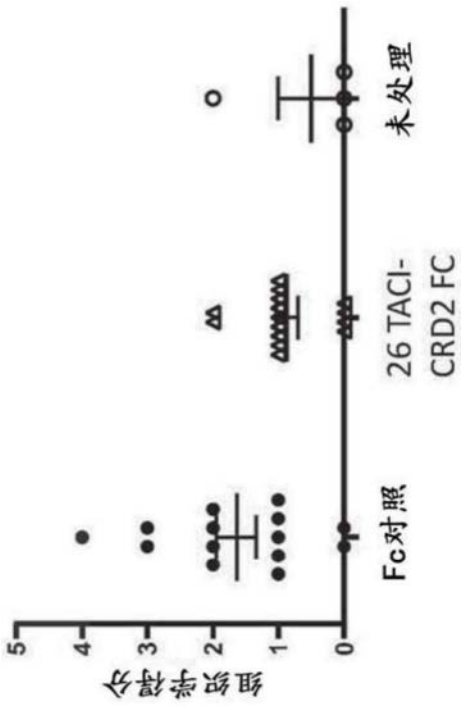

组织学得分
5
4
3
2
1
0
Fc对照
26 TACI-CRD2 FC
未处理

图17B

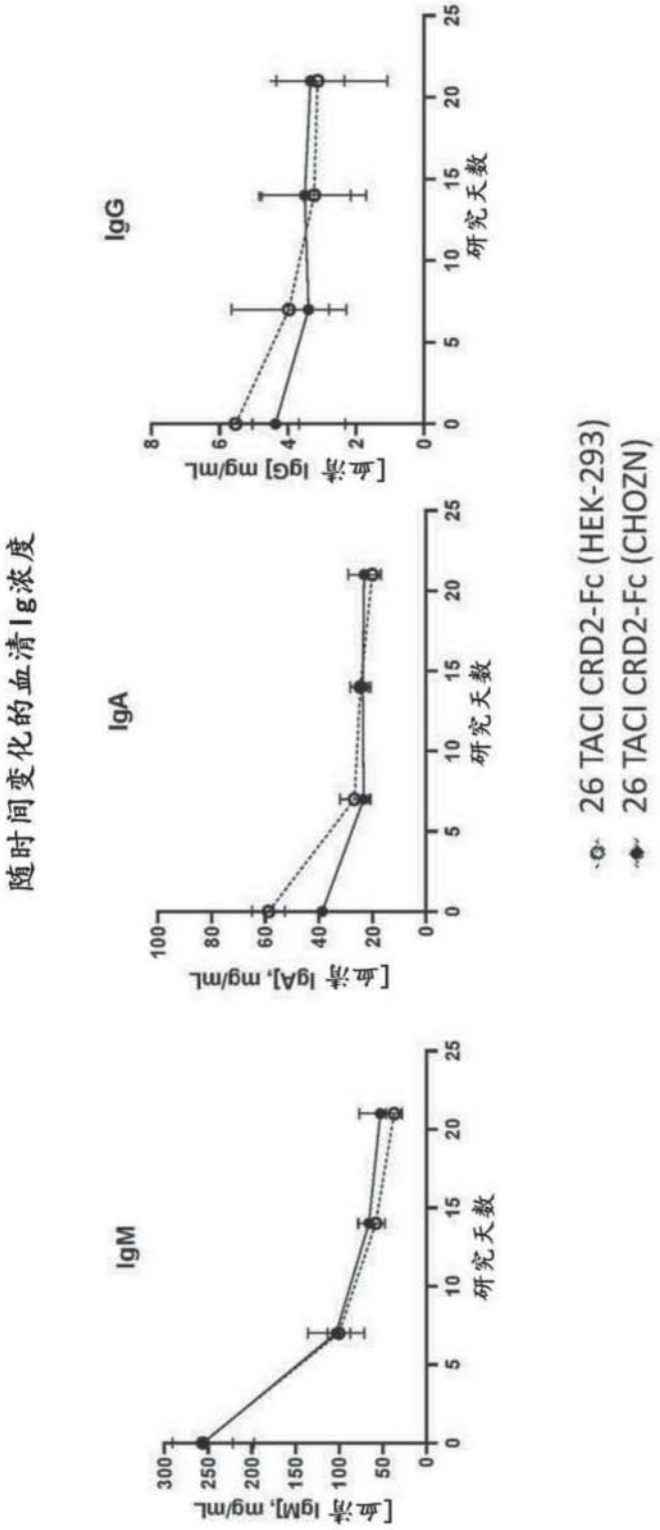

随时间变化的血清Ig浓度
IgM
IgA
IgG
[血清 IgM], mg/mL
[血清 IgA], mg/mL
[血清 IgG] mg/mL
研究天数
26 TACI CRD2-Fc (HEK-293)
26 TACI CRD2-Fc (CHOZN)

图18

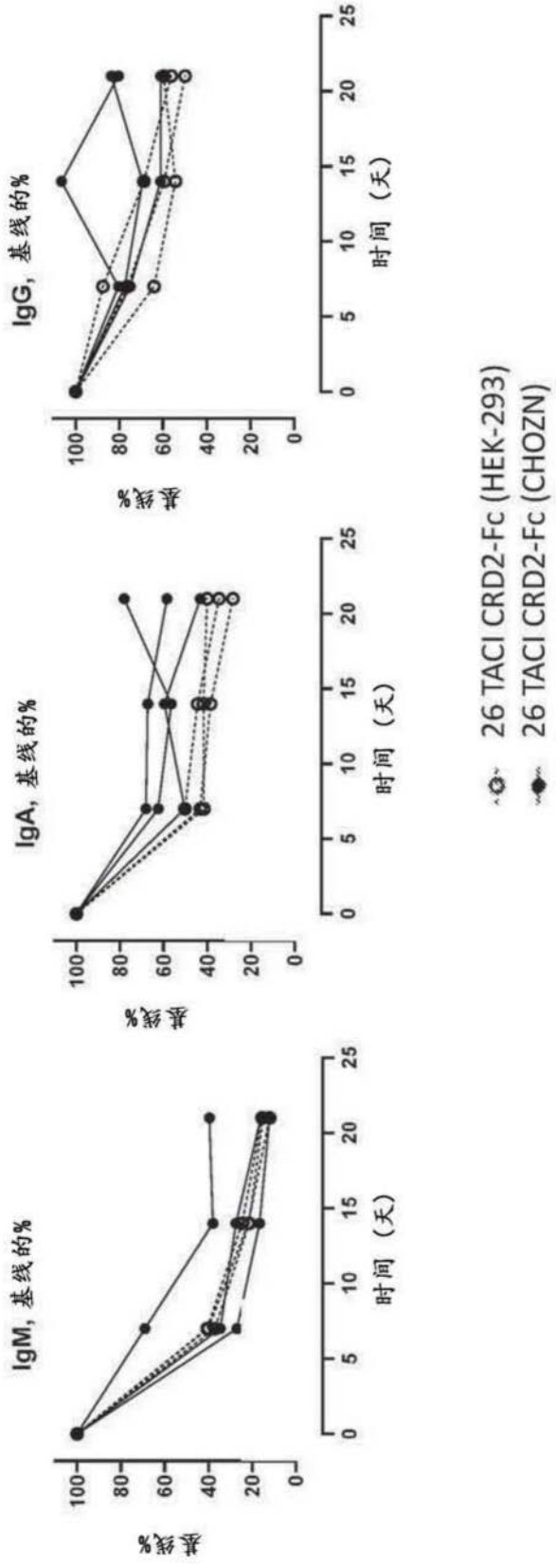

IgG, 基线的%
IgA, 基线的%
IgM, 基线的%
基线%
时间（天）
0
5
10
15
20
25
20
40
60
80
100
26 TACI CRD2-Fc (HEK-293)
26 TACI CRD2-Fc (CHOZN)

图19

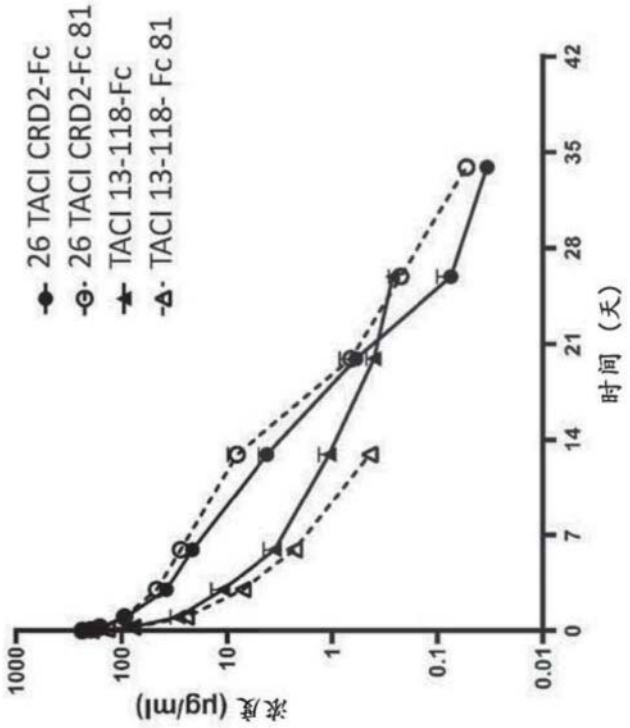

26 TACI CRD2-Fc
26 TACI CRD2-Fc 81
TACI 13-118-Fc
TACI 13-118- Fc 81
浓度 (μg/ml)
1000
100
10
1
0.1
0.01
0
7
14
21
28
35
42
时间（天）

图20A

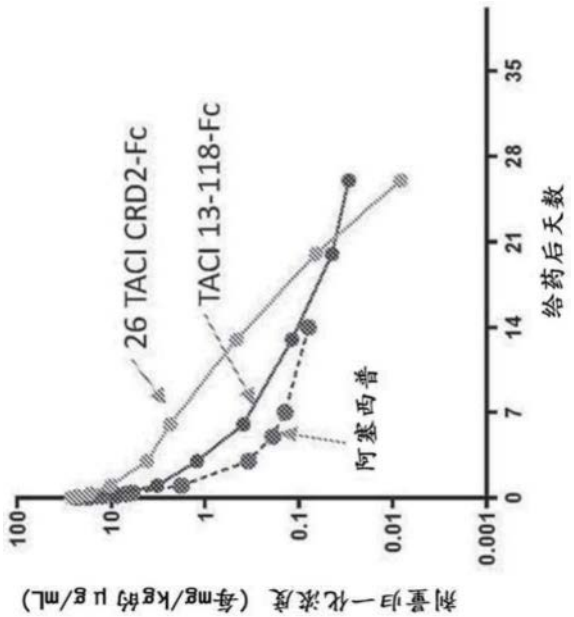

26 TACI CRD2-Fc
TACI 13-118-Fc
阿塞西普
测量的一代浓度（每mg/kg的μg/mL）
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0
7
14
21
28
35
给药后天数

图20B

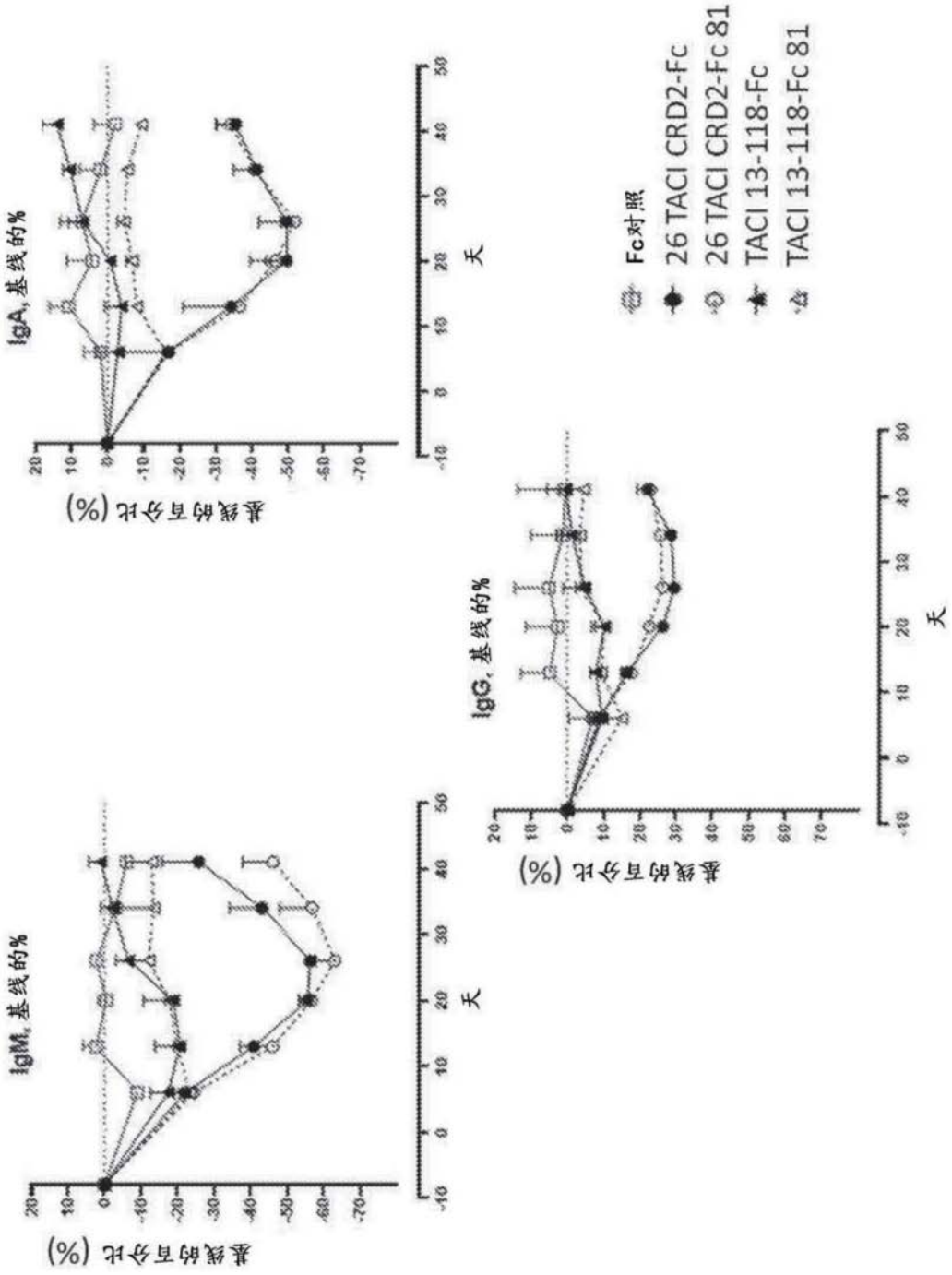

IgA, 基线的%
基线的百分比 (%)
天
IgM, 基线的%
基线的百分比 (%)
天
IgG, 基线的%
基线的百分比 (%)
天
Fc对照
26 TACI CRD2-Fc
26 TACI CRD2-Fc 81
TACI 13-118-Fc
TACI 13-118-Fc 81

图21

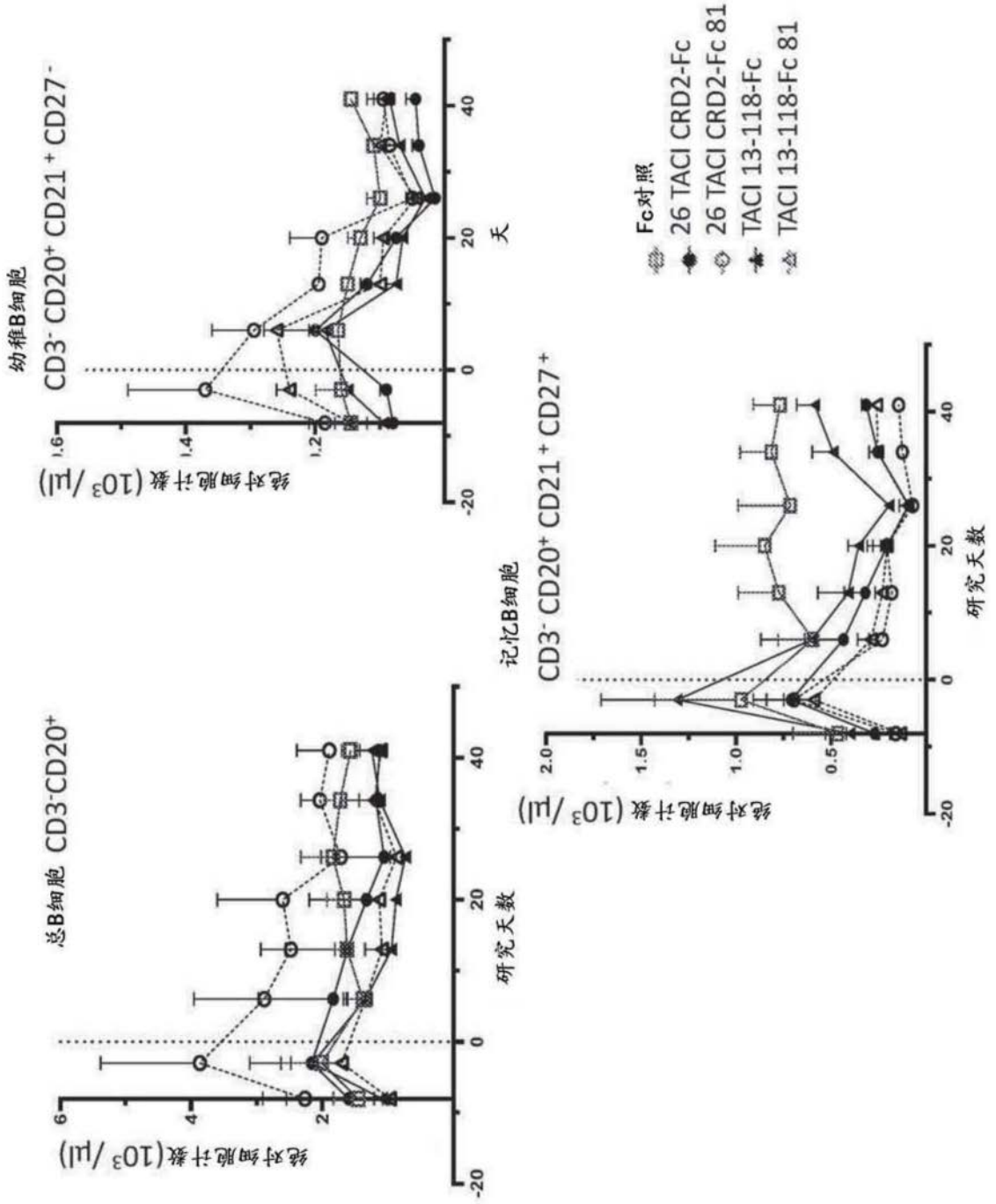

幼稚B细胞
CD3- CD20+ CD21+ CD27-
绝对细胞计数 (10³/μl)
天
总B细胞 CD3-CD20+
绝对细胞计数(10³/μl)
研究天数
记忆B细胞
CD3- CD20+ CD21+ CD27+
绝对细胞计数 (10³/μl)
研究天数
Fc对照
26 TACI CRD2-Fc
26 TACI CRD2-Fc 81
TACI 13-118-Fc
TACI 13-118-Fc 81

图22

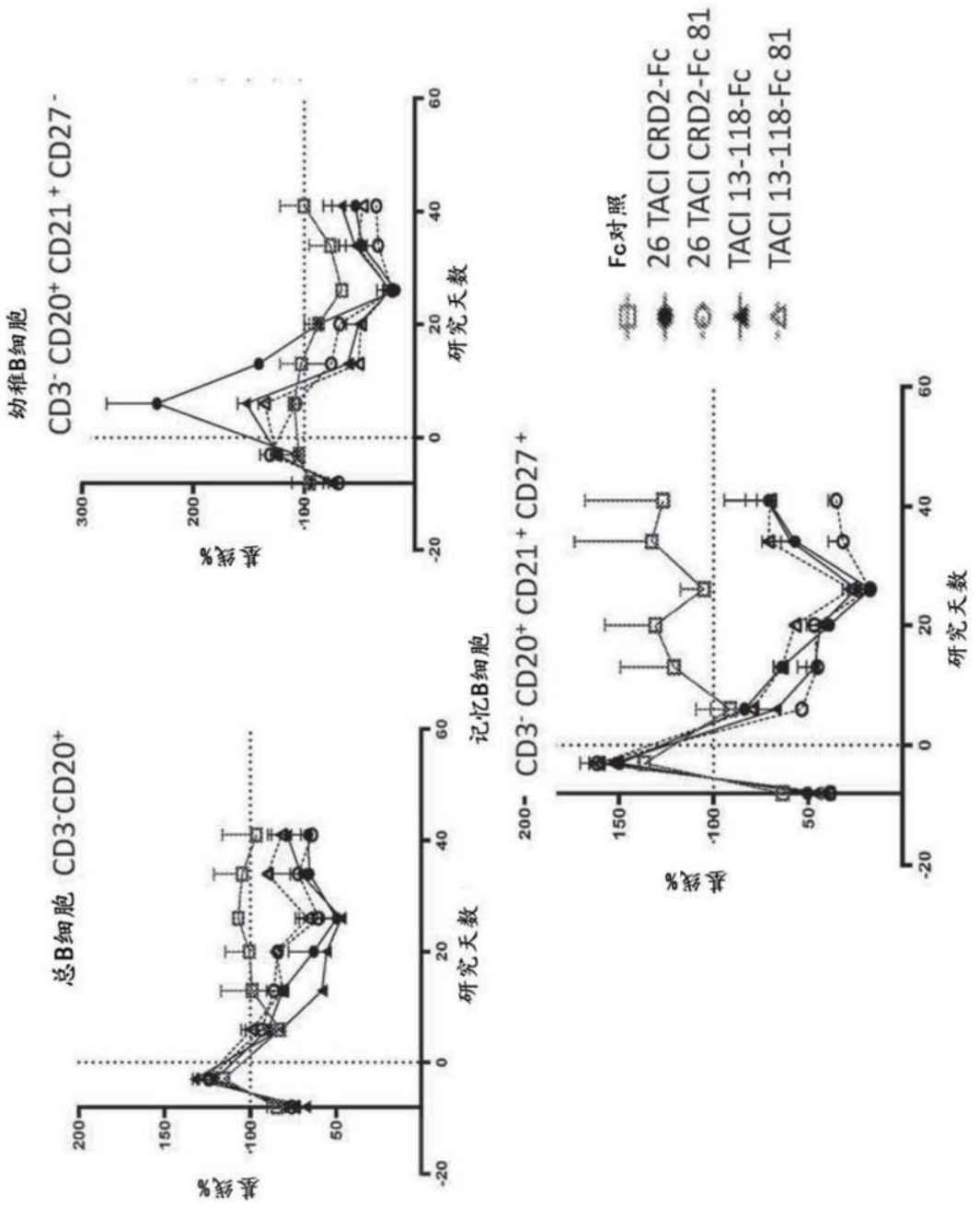

幼稚B细胞
CD3⁻ CD20⁺ CD21⁺ CD27⁻
基线%
研究天数
总B细胞 CD3⁻CD20⁺
记忆B细胞
CD3⁻ CD20⁺ CD21⁺ CD27⁺
Fc对照
26 TACI CRD2-Fc
26 TACI CRD2-Fc 81
TACI 13-118-Fc
TACI 13-118-Fc 81

图23

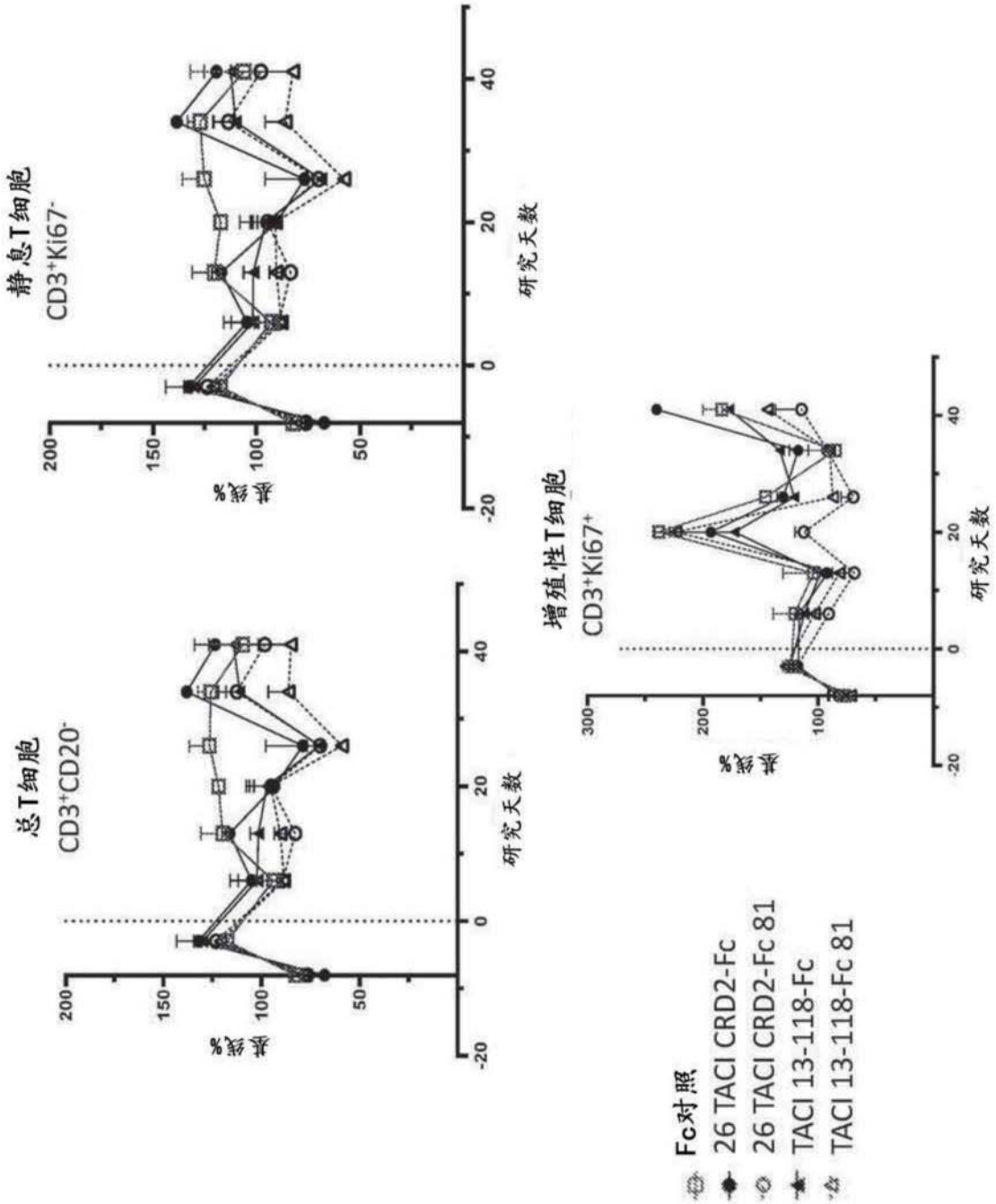

静息T细胞
CD3+Ki67-
总T细胞
CD3+CD20-
增殖性T细胞
CD3+Ki67+
研究天数
Fc对照
26 TACI CRD2-Fc
26 TACI CRD2-Fc 81
TACI 13-118-Fc
TACI 13-118-Fc 81

图24

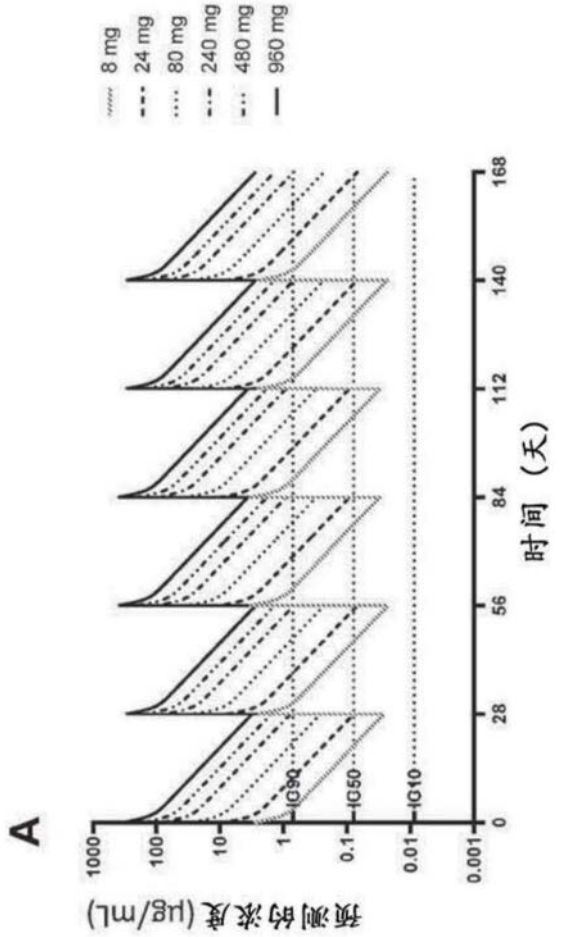

A
8 mg
24 mg
80 mg
240 mg
480 mg
960 mg
IC90
IC50
IC10
预测的浓度 (μg/mL)
1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0
28
56
84
112
140
168
时间（天）

图25A

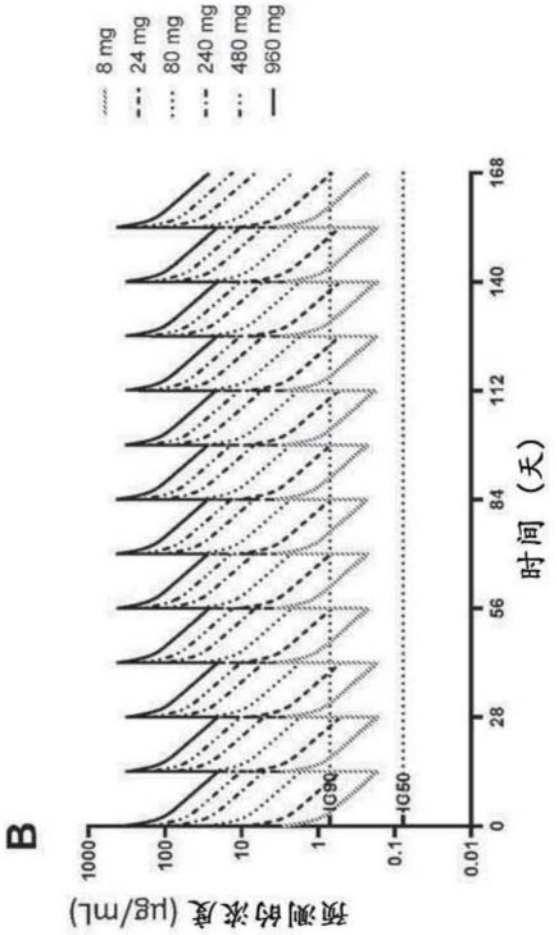

B
8 mg
24 mg
80 mg
240 mg
480 mg
960 mg
1000
100
10
1
0.1
0.01
IC90
IC50
0
28
56
84
112
140
168
时间（天）
预测的浓度 (μg/mL)

图25B

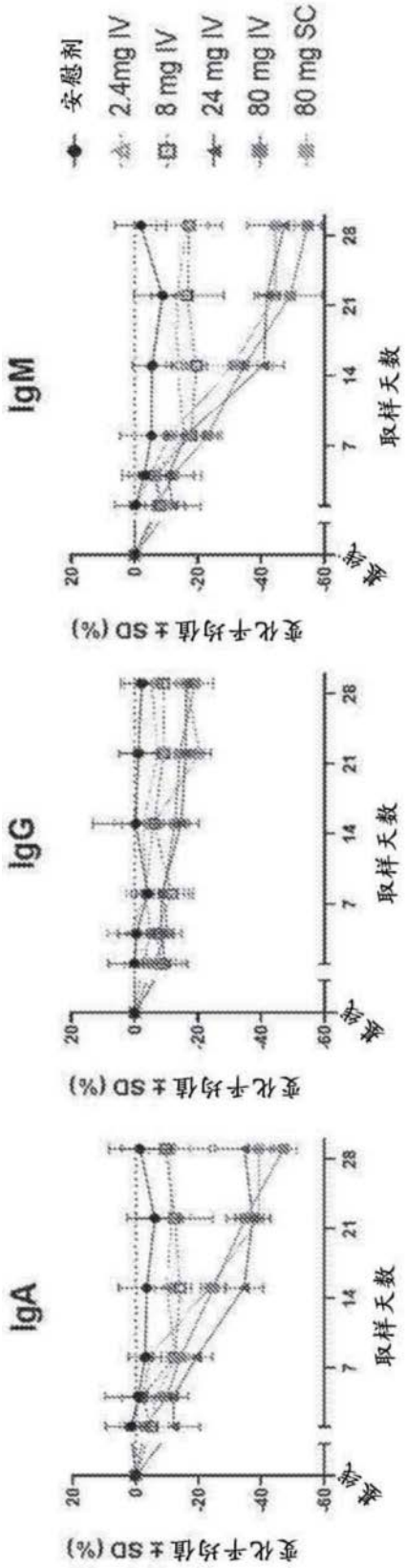
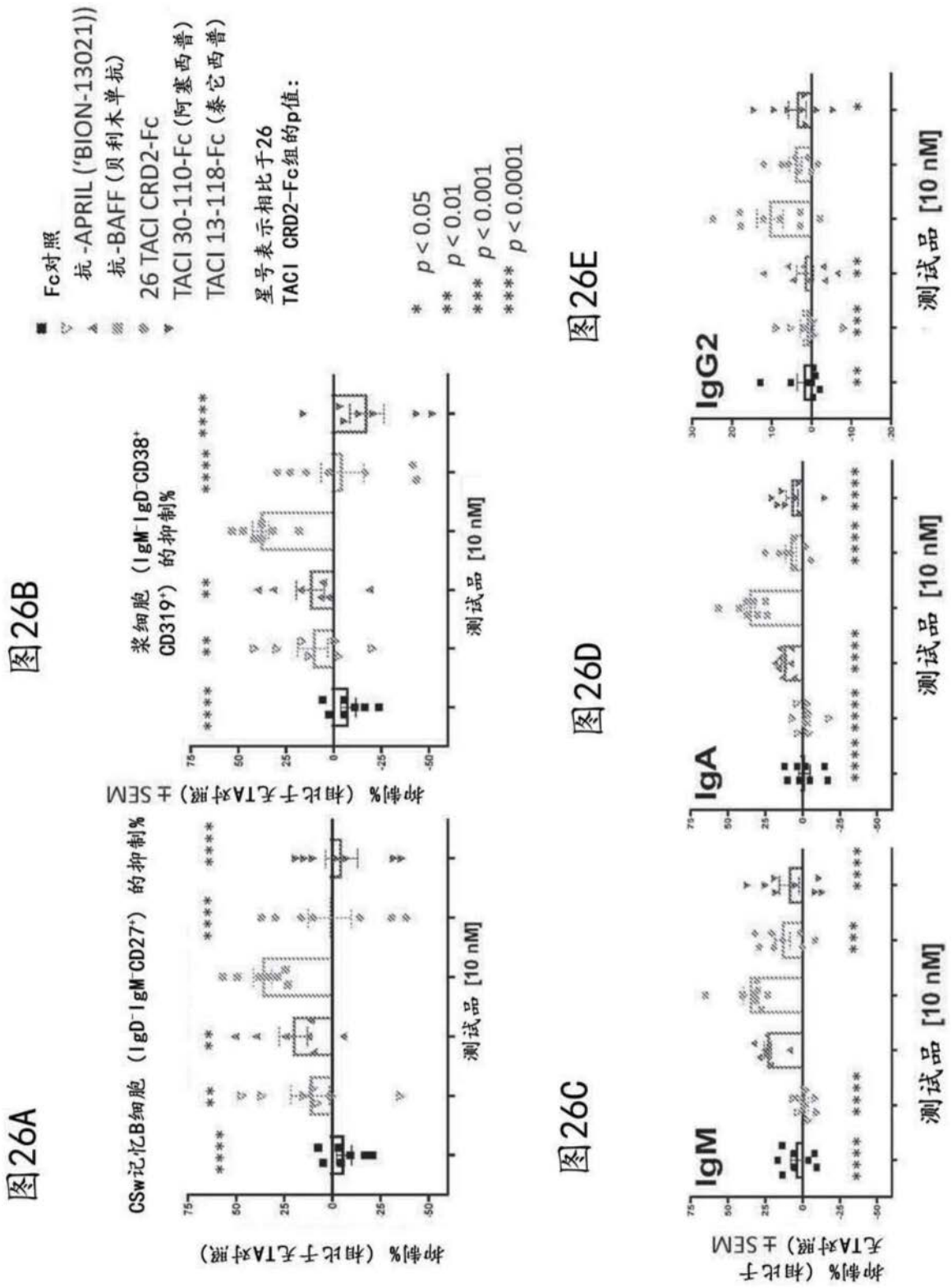

安慰剂
2.4mg IV
8 mg IV
24 mg IV
80 mg IV
80 mg SC
IgM
IgG
IgA
变化平均值 ± SD (%)
取样天数
20
0
-20
-40
-60
1
7
14
21
28

图25C


图26A
CSw记忆B细胞（IgD⁻IgM⁻CD27⁺）的抑制%
抑制%（相比于无TA对照）
测试品 [10 nM]
图26B
浆细胞（IgM⁻IgD⁻CD38⁺CD319⁺）的抑制%
抑制%（相比于无TA对照）±SEM
测试品 [10 nM]
Fc对照
抗-APRIL（'BION-13021)）
抗-BAFF（贝利木单抗）
26 TACI CRD2-Fc
TACI 30-110-Fc（阿塞西普）
TACI 13-118-Fc（泰它西普）
星号表示相比于26 TACI CRD2-Fc组的p值：
* p < 0.05
** p < 0.01
*** p < 0.001
**** p < 0.0001
图26C
IgM
抑制%（相比于无TA对照）±SEM
测试品 [10 nM]
图26D
IgA
测试品 [10 nM]
图26E
IgG2
测试品 [10 nM]

PC = CD138高 TACI高
Fc对照
26 TACI CRD2-Fc
WT TACI-Fc†
mBAFF-R-Fc
抗-mAPRIL mAb†
图27A
每个股骨的总PC数量
1.2×10⁴
1×10⁴
8×10³
6×10³
4×10³
2×10³
0
****
****
****
图27B
每个脾脏的总PC数量
8×10⁴
6×10⁴
4×10⁴
2×10⁴
0
***
*
****
图27C
每个淋巴结的总PC数量
2.5×10⁴
2×10⁴
1.5×10⁴
1×10⁴
5×10³
0
**
***
† 小鼠每周两次接受6个剂量的每种测试品（10 mg/kg）

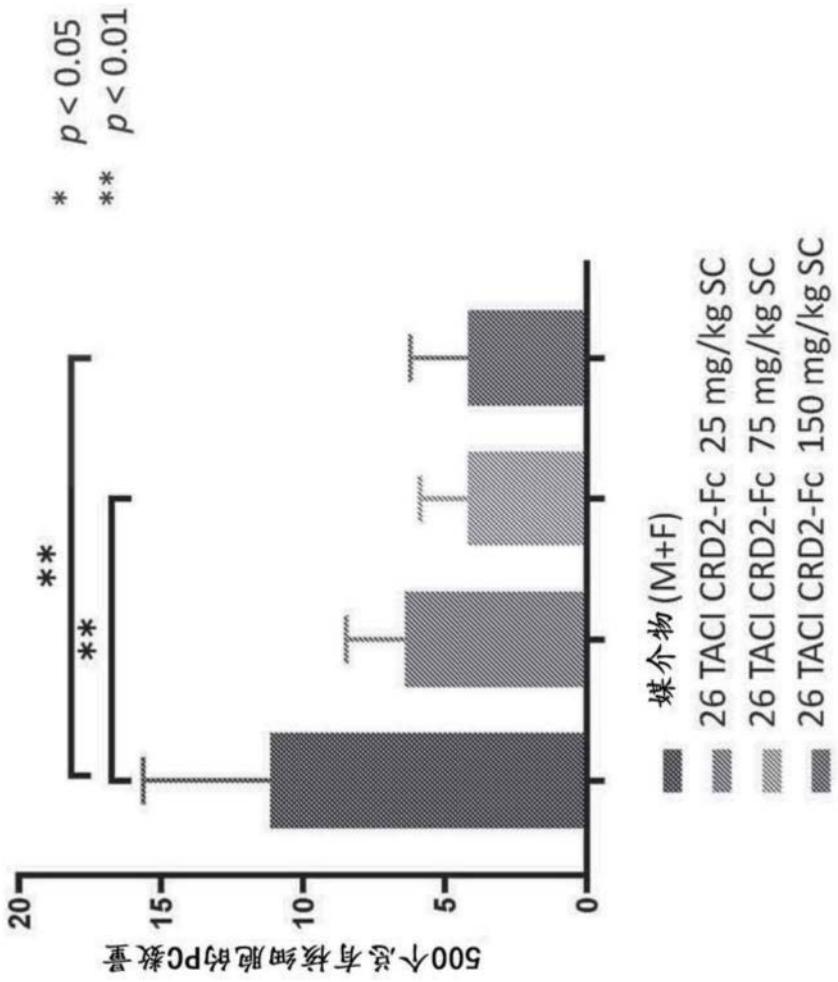

* p < 0.05
** p < 0.01
500个总有核细胞的PC数量
0
5
10
15
20
**
**
媒介物 (M+F)
26 TACI CRD2-Fc 25 mg/kg SC
26 TACI CRD2-Fc 75 mg/kg SC
26 TACI CRD2-Fc 150 mg/kg SC

图28

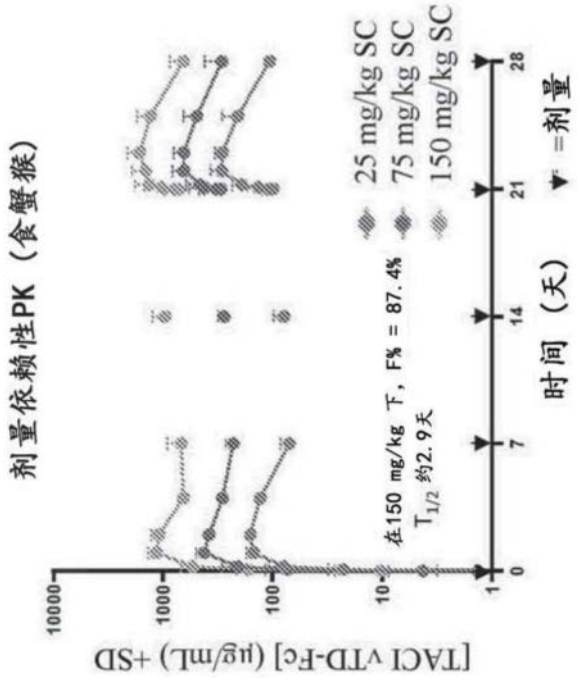

剂量依赖性PK（食蟹猴）
[TACI vTD-Fc] (μg/mL) +SD
10000
1000
100
10
1
0
7
14
21
28
时间（天）
▼=剂量
25 mg/kg SC
75 mg/kg SC
150 mg/kg SC
在150 mg/kg 下，F% = 87.4%
T1/2 约2.9天

图29A

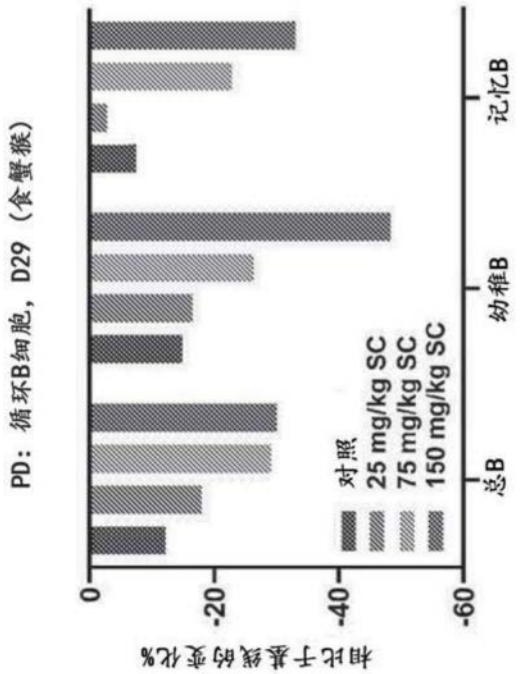

PD：循环B细胞，D29（食蟹猴）
相比于基线的变化%
0
-20
-40
-60
对照
25 mg/kg SC
75 mg/kg SC
150 mg/kg SC
总B
幼稚B
记忆B

图29B

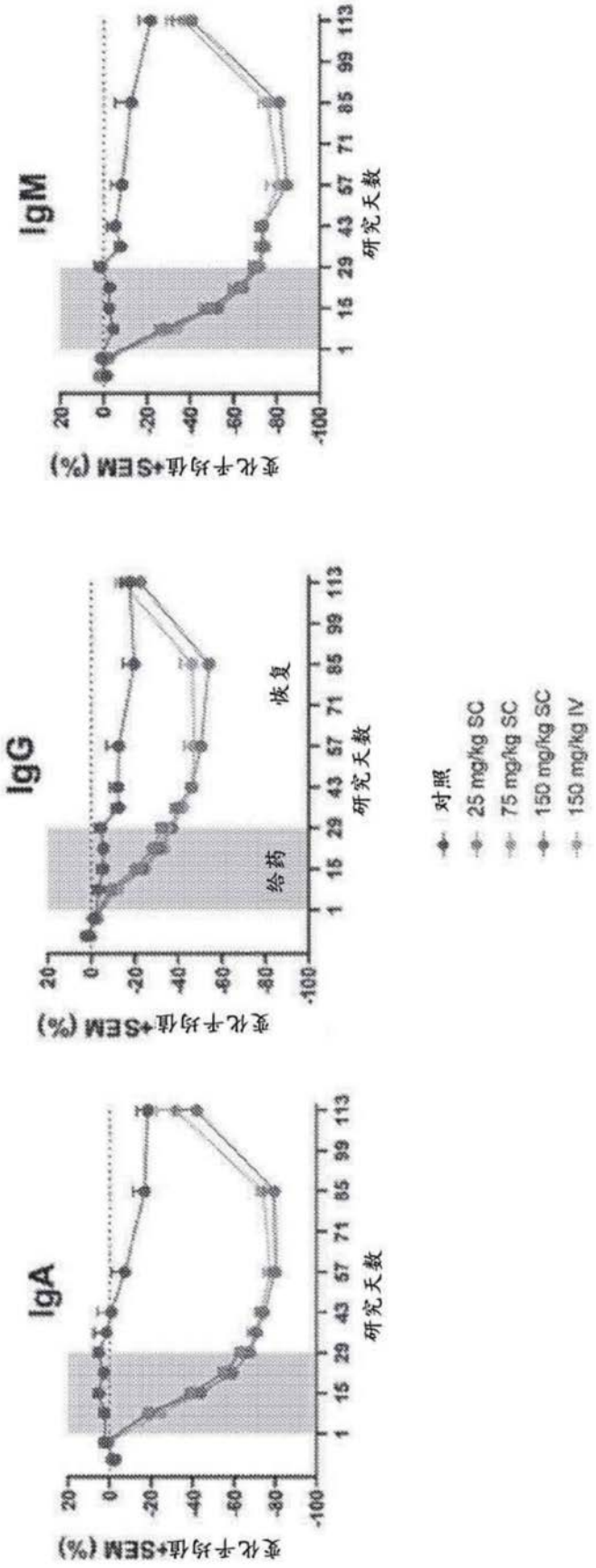

IgM
IgG
IgA
变化平均值+SEM (%)
研究天数
给药
恢复
对照
25 mg/kg SC
75 mg/kg SC
150 mg/kg SC
150 mg/kg IV

图30

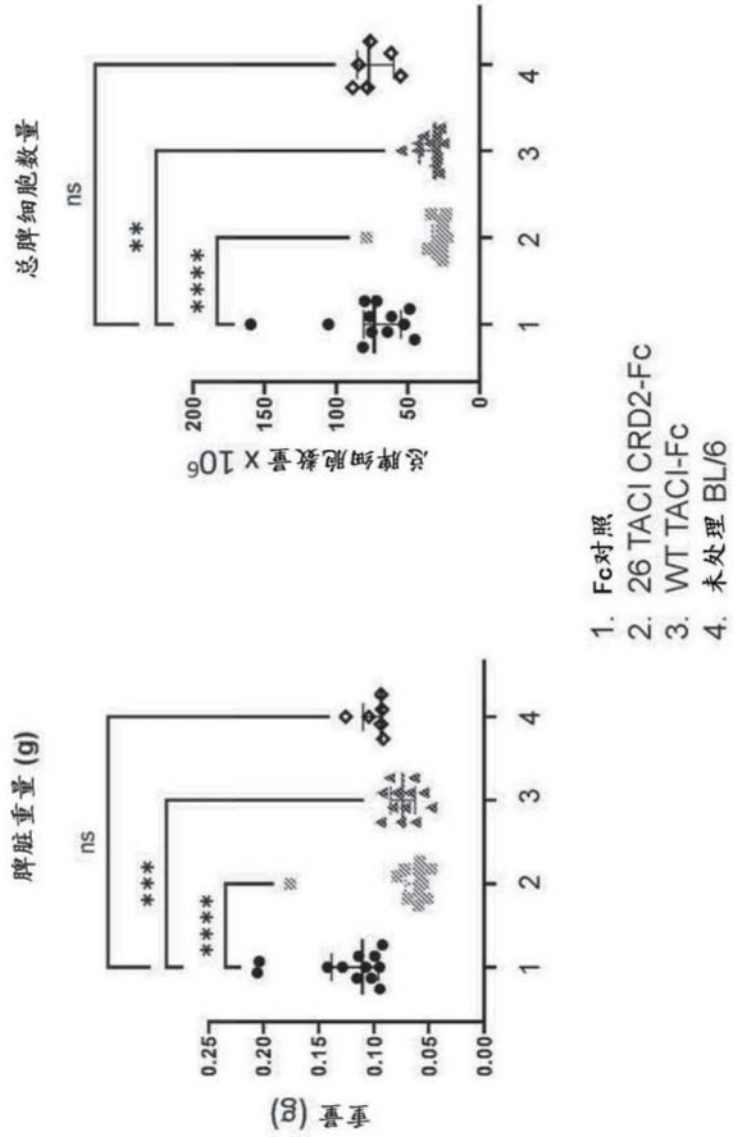

脾脏重量 (g)
ns
***
****
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
1
2
3
4
重量 (g)
总脾细胞数量
ns
**
****
200
150
100
50
0
1
2
3
4
总脾细胞数量 x 10⁶
1. Fc对照
2. 26 TACI CRD2-Fc
3. WT TACI-Fc
4. 未处理 BL/6

图31

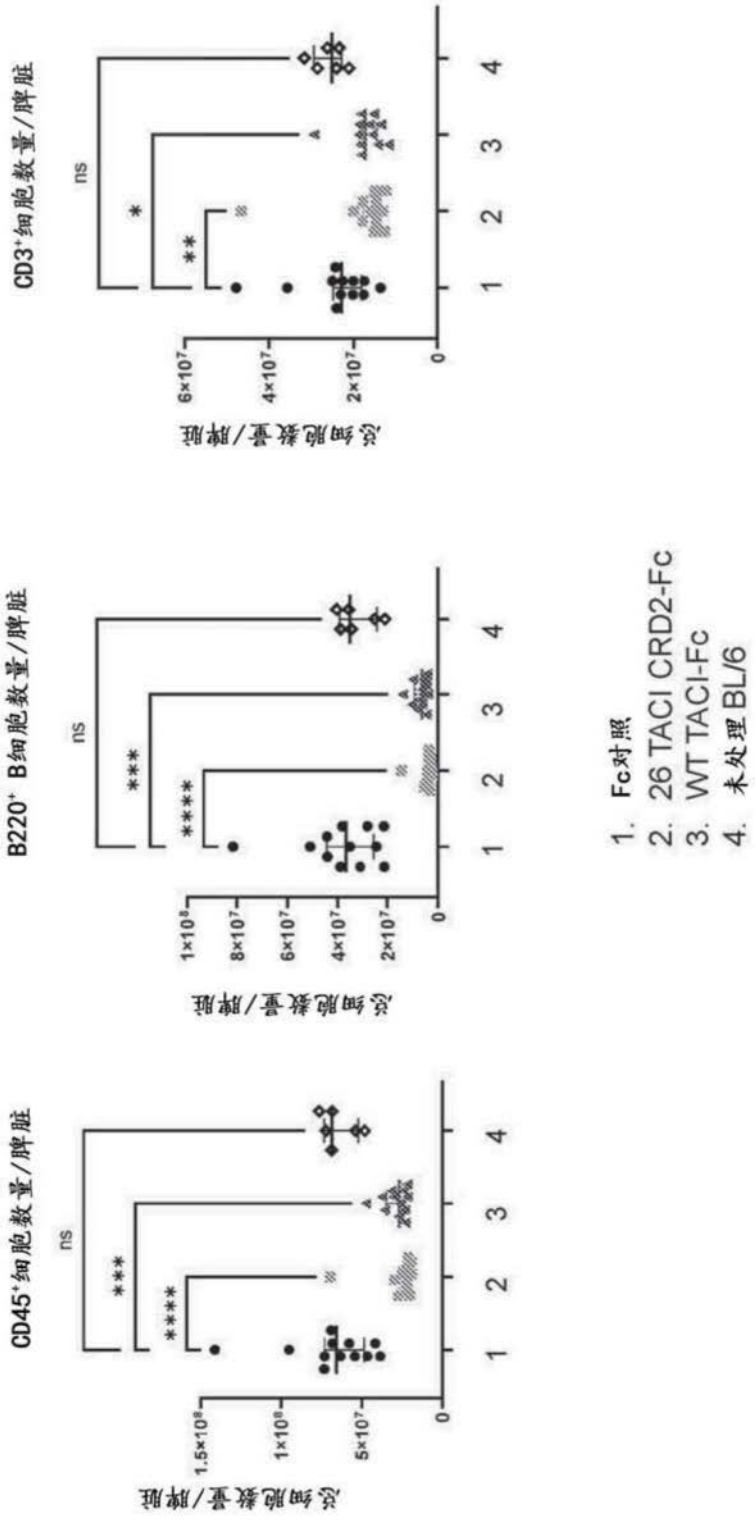

CD45+细胞数量/脾脏
B220+ B细胞数量/脾脏
CD3+细胞数量/脾脏
总细胞数量/脾脏
ns
*
**
***
****
1
2
3
4
0
1. Fc对照
2. 26 TACI CRD2-Fc
3. WT TACI-Fc
4. 未处理 BL/6

图32

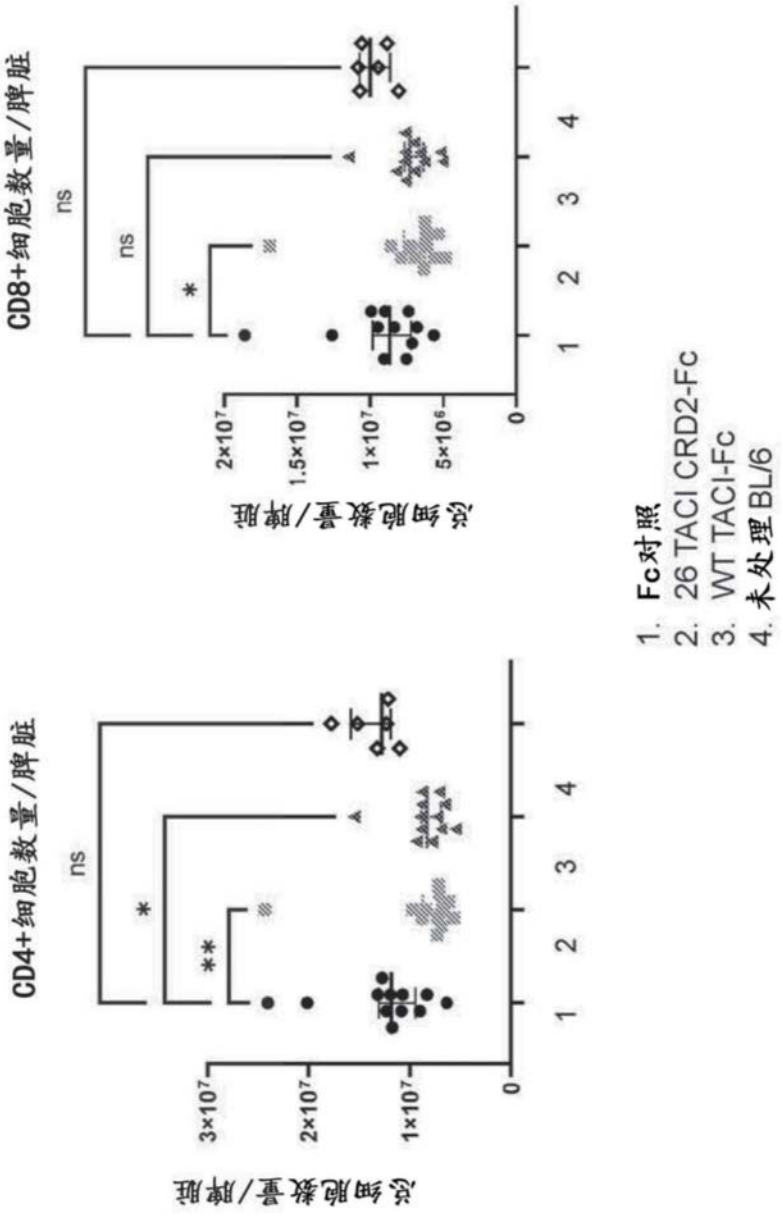

CD8+细胞数量/脾脏
ns
ns
*
总细胞数量/脾脏
2×10^7
1.5×10^7
1×10^7
5×10^6
0
1 2 3 4
CD4+细胞数量/脾脏
ns
*
**
总细胞数量/脾脏
3×10^7
2×10^7
1×10^7
0
1 2 3 4
1. Fc对照
2. 26 TACI CRD2-Fc
3. WT TACI-Fc
4. 未处理BL/6

图33

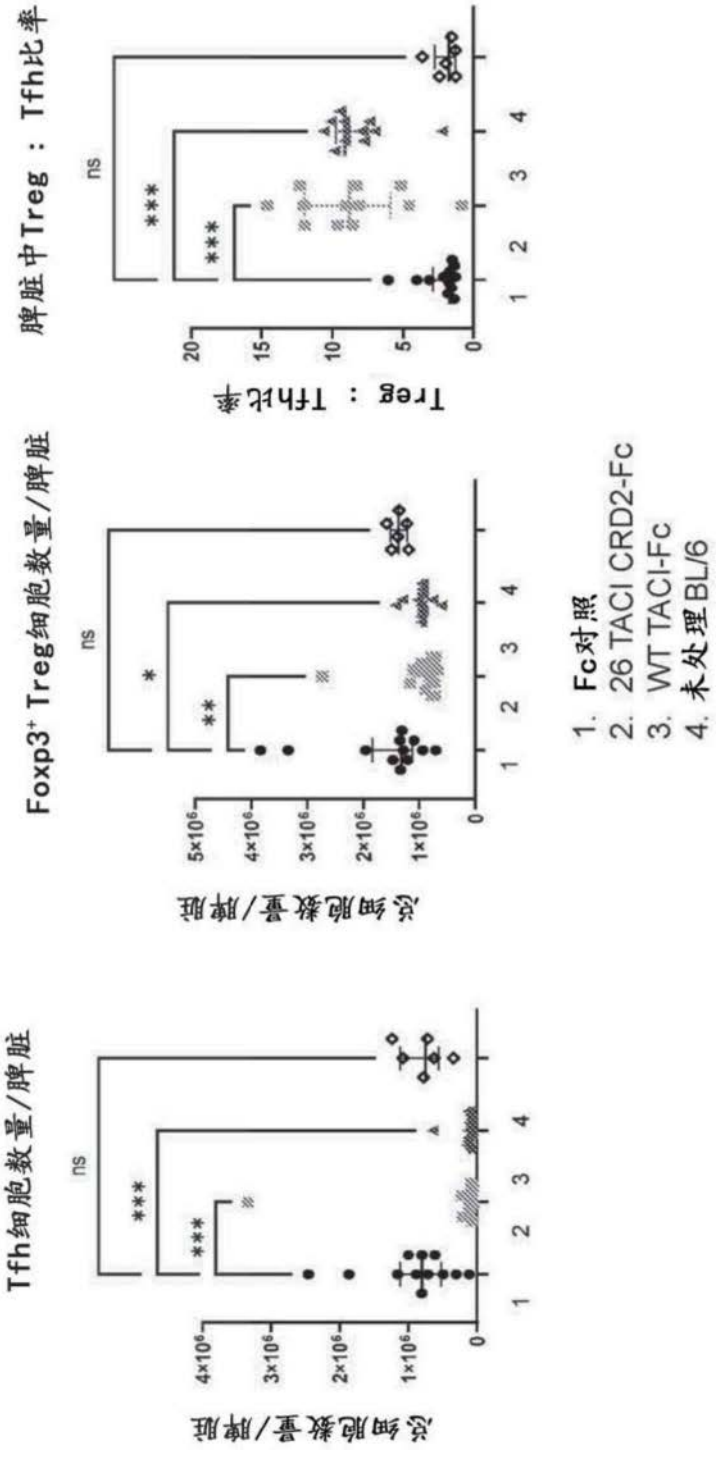

Tfh细胞数量/脾脏
Foxp3+ Treg细胞数量/脾脏
脾脏中Treg : Tfh比率
Treg : Tfh比率
ns
***
**
*
1. Fc对照
2. 26 TACI CRD2-Fc
3. WT TACI-Fc
4. 未处理BL/6

图34

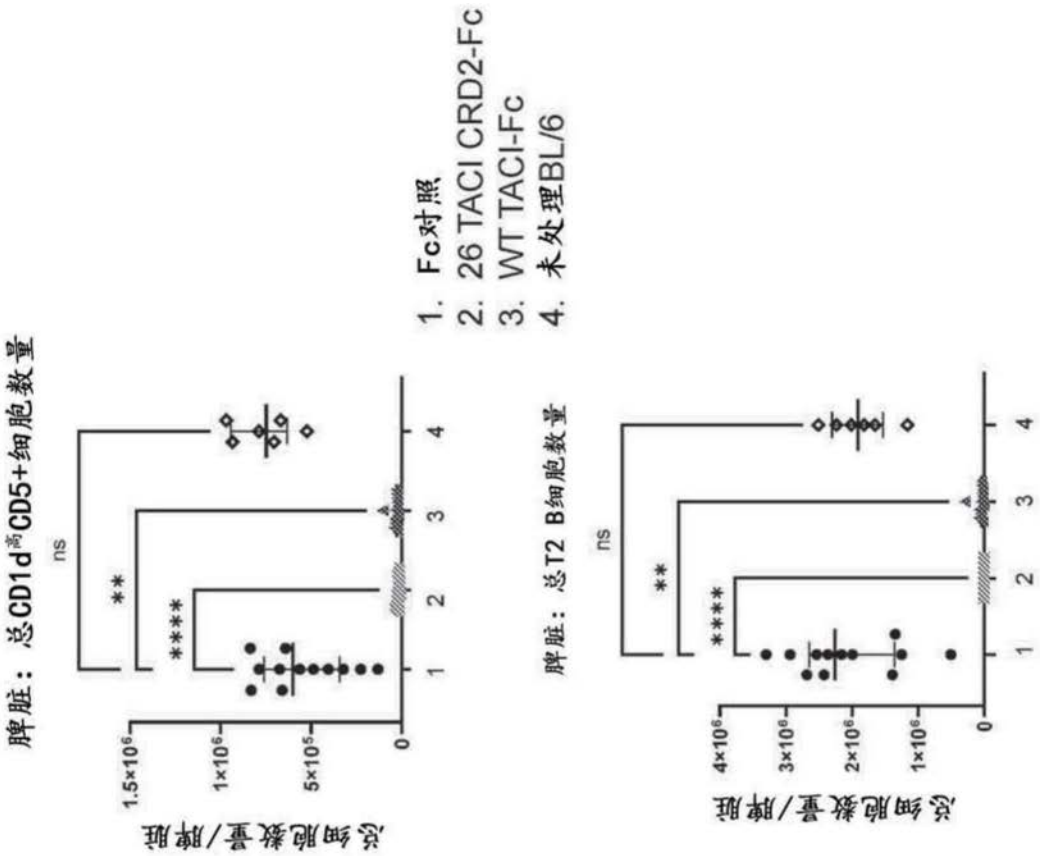

脾脏：总CD1d^{高}CD5+细胞数量
总细胞数量/脾脏
1.5×10^6
1×10^6
5×10^5
0
ns
**
****
1 2 3 4
1. Fc对照
2. 26 TACI CRD2-Fc
3. WT TACI-Fc
4. 未处理BL/6
脾脏：总T2 B细胞数量
总细胞数量/脾脏
4×10^6
3×10^6
2×10^6
1×10^6
0
ns
**
****
1 2 3 4

图35A

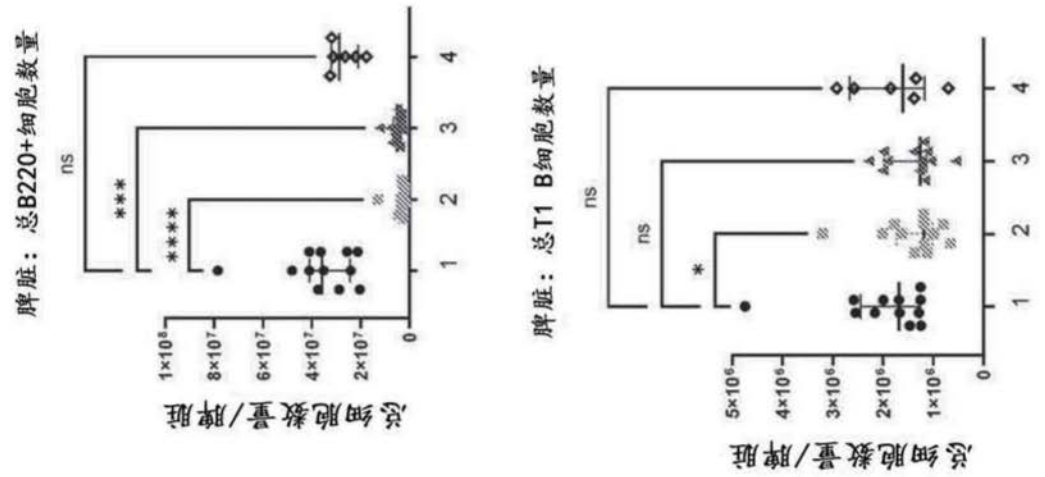

脾脏：总B220+细胞数量
总细胞数量/脾脏
1×10^8
8×10^7
6×10^7
4×10^7
2×10^7
0
ns
***
****
1 2 3 4
脾脏：总T1 B细胞数量
总细胞数量/脾脏
5×10^6
4×10^6
3×10^6
2×10^6
1×10^6
0
ns
ns
*
1 2 3 4

图35B

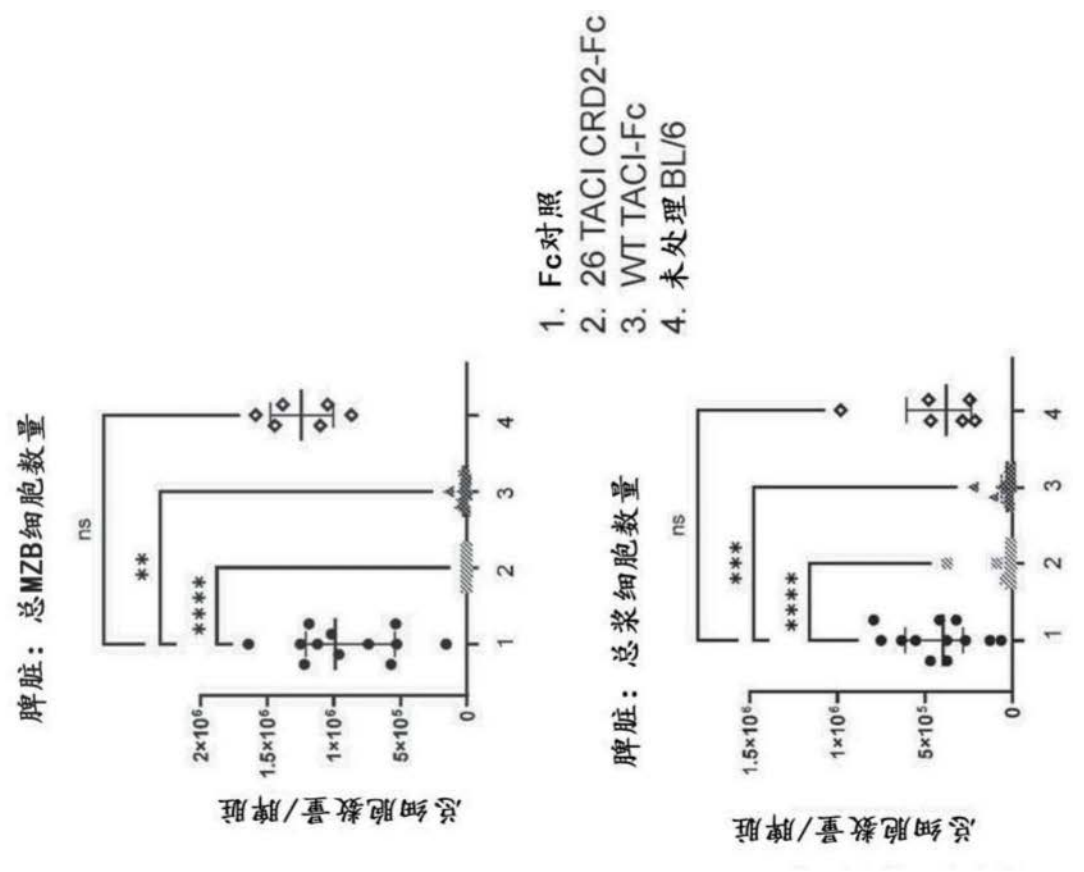

脾脏：总滤泡B细胞数量
总细胞数量/脾脏
5×10^7
4×10^7
3×10^7
2×10^7
1×10^7
0
ns
**
****
1
2
3
4
脾脏：总MZB细胞数量
总细胞数量/脾脏
2×10^6
1.5×10^6
1×10^6
5×10^5
0
ns
**
****
1
2
3
4
1. Fc对照
2. 26 TACI CRD2-Fc
3. WT TACI-Fc
4. 未处理BL/6
脾脏：总GC B细胞数量
总细胞数量/脾脏
2.5×10^6
2×10^6
1.5×10^6
1×10^6
5×10^5
0
ns
***
***
1
2
3
4
脾脏：总浆细胞数量
总细胞数量/脾脏
1.5×10^6
1×10^6
5×10^5
0
ns
***
****
1
2
3
4

图36A

图36B

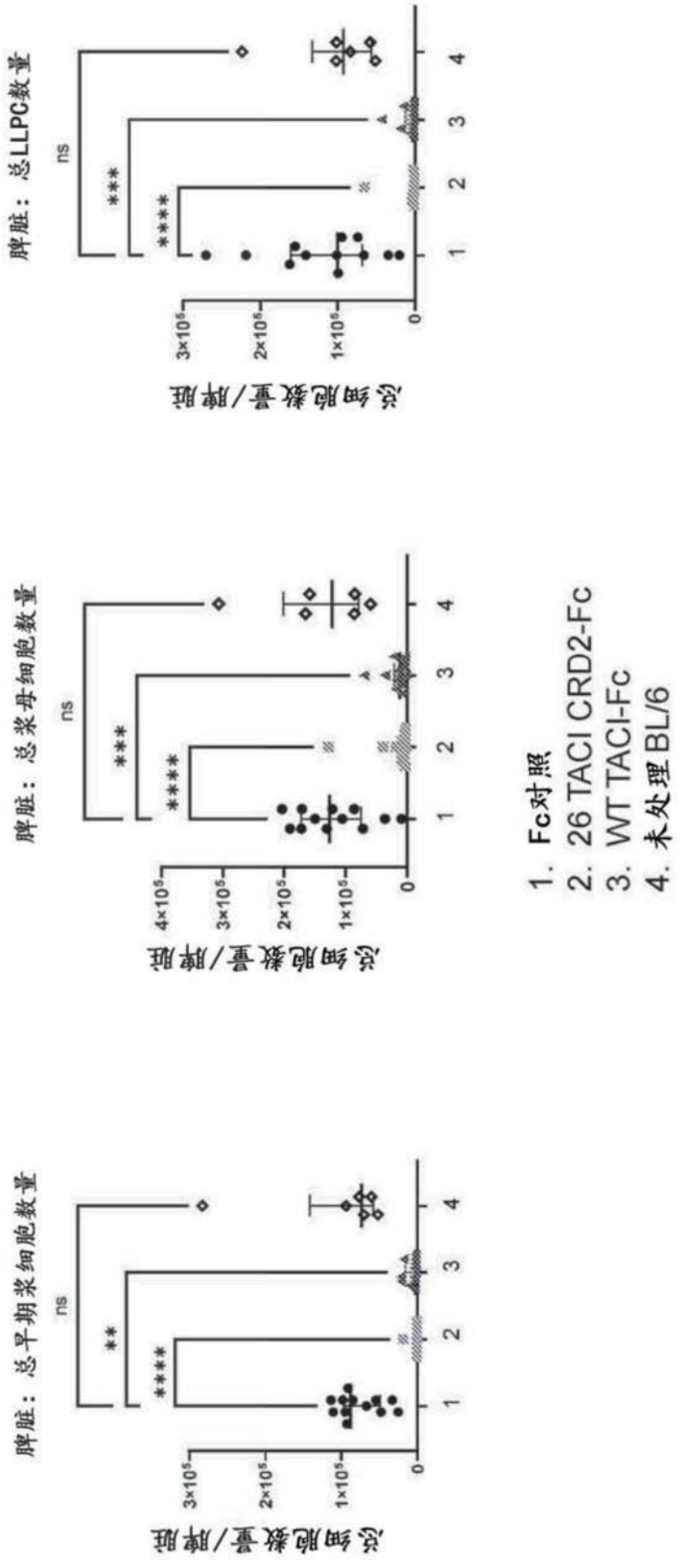

脾脏：总LLPC数量
总细胞数量/脾脏
3×10⁵
2×10⁵
1×10⁵
0
ns
***
****
1
2
3
4
脾脏：总浆母细胞数量
总细胞数量/脾脏
4×10⁵
3×10⁵
2×10⁵
1×10⁵
0
ns
***
****
1
2
3
4
脾脏：总早期浆细胞数量
总细胞数量/脾脏
3×10⁵
2×10⁵
1×10⁵
0
ns
**
****
1
2
3
4
1. Fc对照
2. 26 TACI CRD2-Fc
3. WT TACI-Fc
4. 未处理BL/6

图37

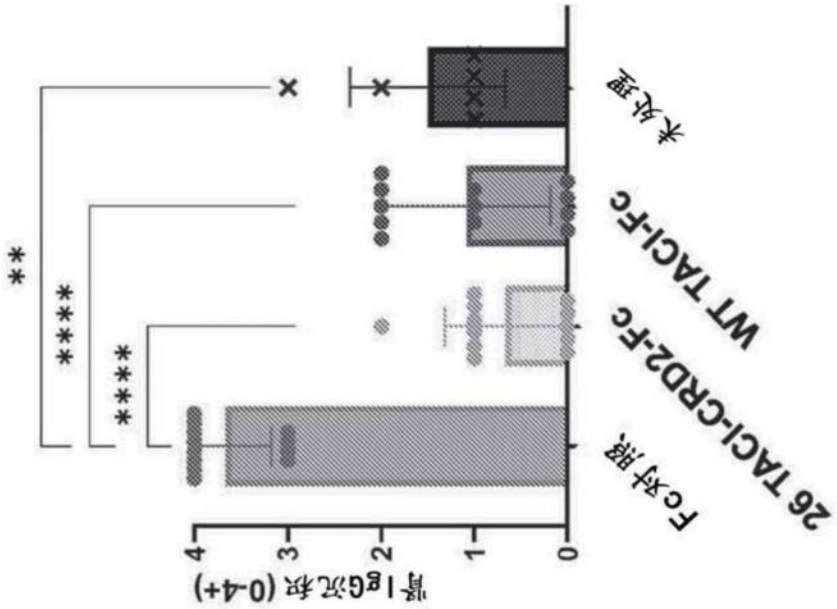


图38

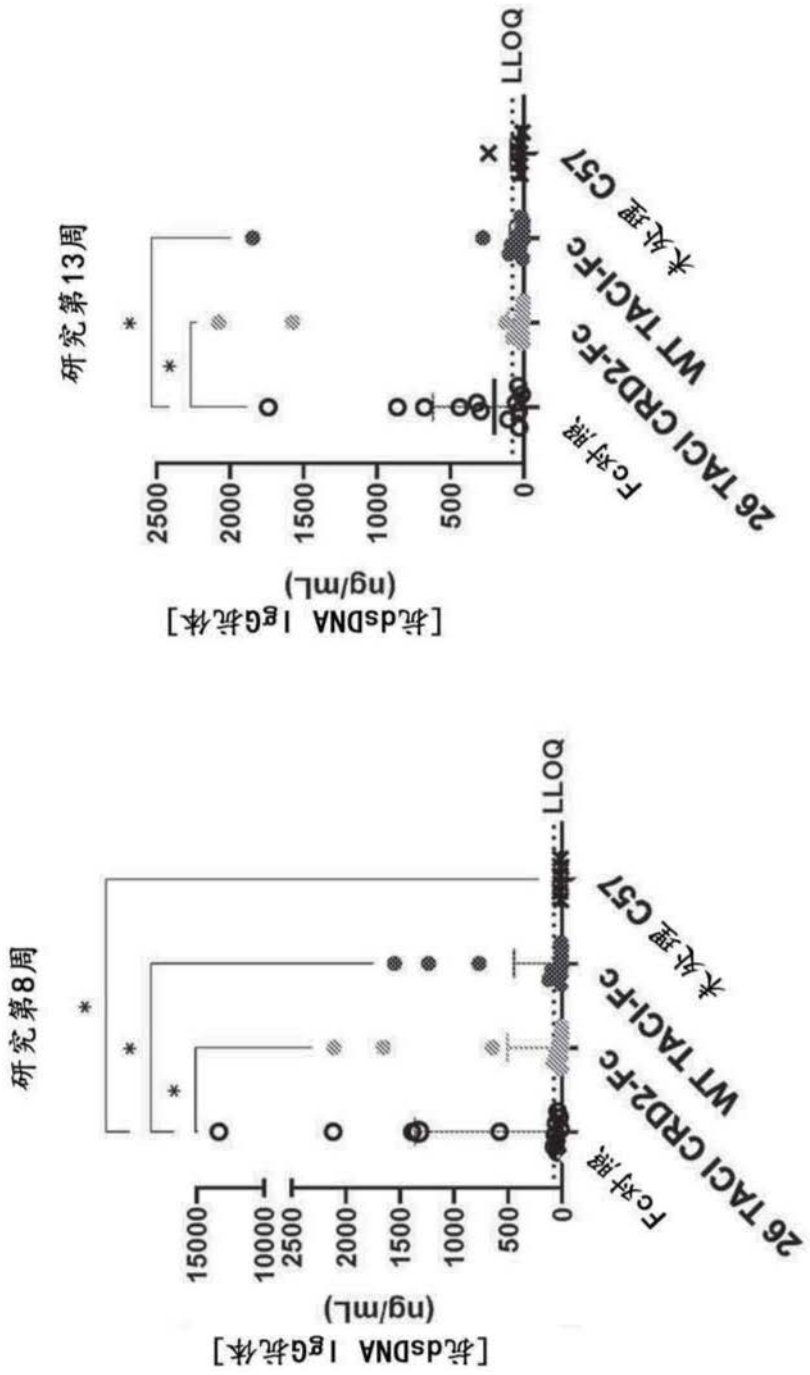

研究第13周
研究第8周
[抗dsDNA IgG抗体]
(ng/mL)
0
500
1000
1500
2000
2500
10000
15000
LLOQ
Fc对照
26 TACI CRD2-Fc
WT TACI-Fc
未处理 C57

图39

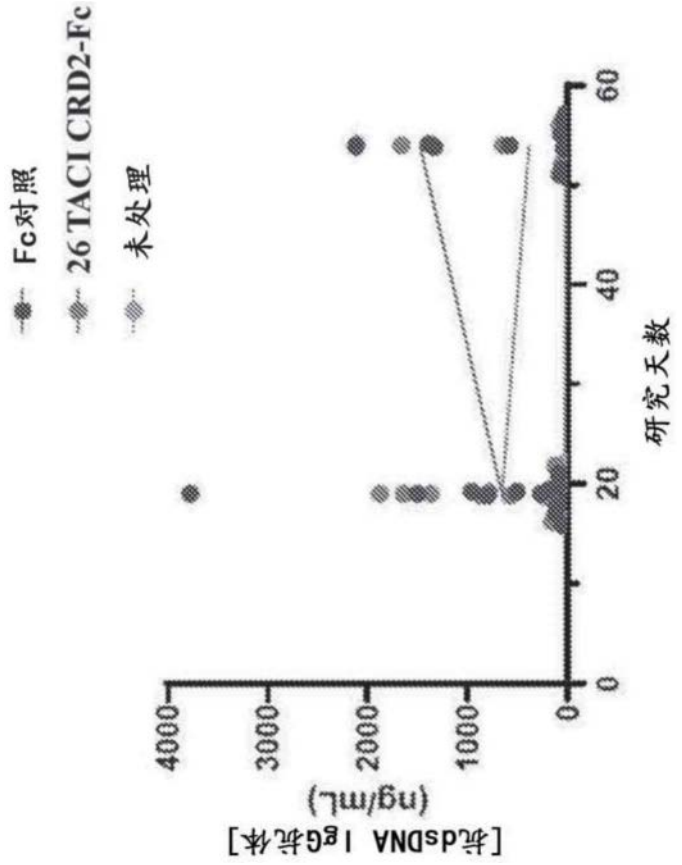

Fc对照
26 TACI CRD2-Fc
未处理
研究天数
0
20
40
60
1000
2000
3000
4000
(ng/mL)
[抗dsDNA IgG抗体]

图40

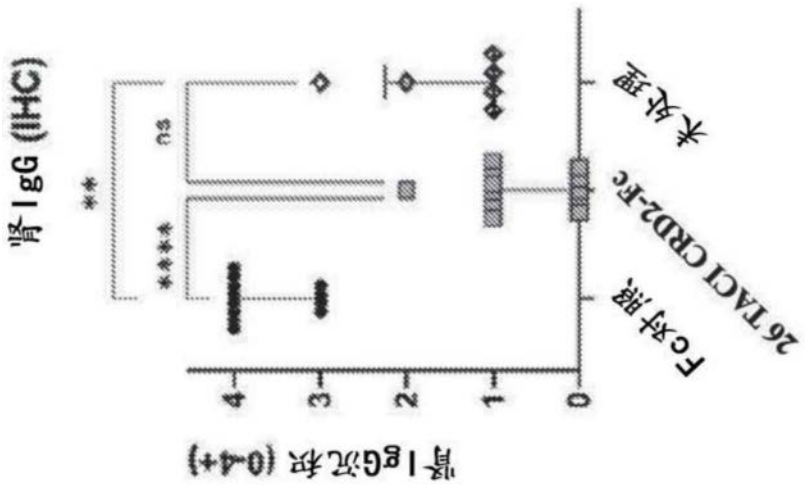

肾 IgG (IHC)
**
****
ns
0
1
2
3
4
肾 IgG沉积 (0-4+)
Fc对照
26 TACI CRD2-Fc
未处理

图41

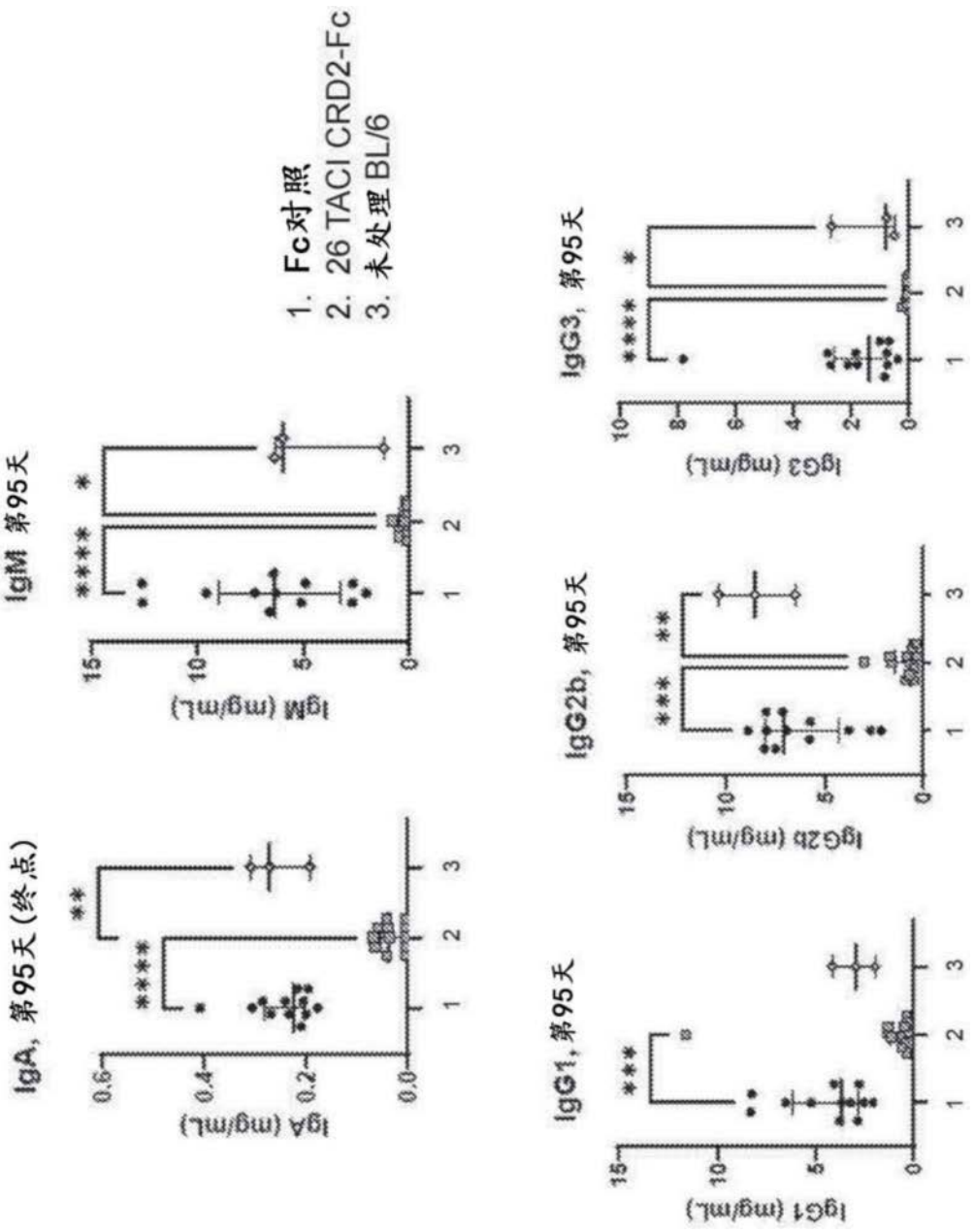

1. Fc对照
2. 26 TACI CRD2-Fc
3. 未处理 BL/6
IgA, 第95天 (终点)
IgM 第95天
IgG1, 第95天
IgG2b, 第95天
IgG3, 第95天
IgA (mg/mL)
IgM (mg/mL)
IgG1 (mg/mL)
IgG2b (mg/mL)
IgG3 (mg/mL)

图42