

PROTEÍNAS DE FUSIÓN TACI-FC PARA LA INHIBICIÓN
MULTIFUNCIONAL DE BAFF, APRIL Y RECEPTOR FC NEONATAL

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de los EE. UU. núm. 63/430.265, presentada el 5 de diciembre de 2022, cuyo contenido se incorpora como referencia en la presente en su totalidad.

10

ANTECEDENTES

La proliferación, maduración y supervivencia de las células B dependen de las vías de señalización de tres receptores, TACI (activador transmembrana o interactor de ligando de ciclofilina modulador de calcio), BCMA (antígeno de maduración de células B) y BAFF-R (receptor del factor activador de células B). BCMA y BAFF-R son receptores de superficie celular de la superfamilia de receptores TNF, que se codifican mediante los genes *TNFRSF17* y *TNFRSF13C*, respectivamente.

TACI es una proteína transmembrana de la superfamilia de receptores TNF (codificada por el gen *TNFRSF13B*), que se encuentra predominantemente en la superficie de las células B. TACI reconoce tres ligandos, APRIL (un ligando inductor de proliferación codificado por

el gen *TNFSF1*), BAFF (factor activador de células B, codificado por el gen *TNFSF13B*), y CAML (ligando de ciclofilina modulador de calcio). Se conoce que TACI controla las respuestas a los anticuerpos de células B independientes de las células T, el cambio de isotipo y la homeostasis de las células B. APRIL es un ligando inductor de proliferación, que es un ligando tanto para TACI como para BCMA. BAFF es un ligando para TACI, BCMA y BAFF-R (Marsters et al. Curr Biol 2000; 10(13): 785-788; Thompson et al. Science 2001; 293(2): 108-111). BAFF es un ligando para TACI, BCMA, y BAFF-R, se expresa en células de linaje B, actúa como un potente activador de células B, y juega un papel importante en la proliferación y diferenciación de las células B.

BAFF y APRIL son potentes estimuladores de la maduración, proliferación y supervivencia de células B (ver, p. ej., Gross et al., Nature 2000; 404: 995-999; Gross et al., Immunity 2001; 15(2): 289-302; y Groom et al., J Clin Invest 2002; 109(1): 59-68) y se conoce que forman independientemente homodímeros y heterotímeros BAFF/APRIL. BAFF y APRIL pueden ser necesarios para la persistencia de enfermedades autoinmunitarias, especialmente aquellas que involucran células B. Los ratones transgénicos diseñados genéticamente para expresar altos niveles de BAFF exhiben trastornos de las células inmunitarias y muestran síntomas como los

observados en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) (ver, p. ej., Cheson et al. Blood 1996; 87:4990-4997; y Cheema et al. Arthritis Rheum 2001; 44(6):1313-1319). Similarmente, se han medido los niveles aumentados de BAFF y APRIL en muestras de suero tomadas de los
5 pacientes con LES y otros pacientes con diversas enfermedades autoinmunitarias como artritis reumatoide (ver, p. ej., Roschke et al. J. Immunol 2002; 169:4314-4321; Mariette et al. Ann Rheum Dis 2003; 62(2):168-171; y Hahne et al. J Exp Med 1998; 188(6): 1185-1190), que
10 extiende la asociación de BAFF y/o APRIL y enfermedades mediadas por células B de los modelos animales a humanos.

El enfoque actual para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias es la supresión de la
15 reacción inmunitaria no deseada. Por ejemplo, en el tratamiento de la nefritis lúpica (LN, por sus siglas en inglés), una complicación grave que involucra el riñón de pacientes que padecen nefritis lúpica sistémica (LES), varios fármacos inmunosupresores han demostrado ser
20 beneficiosos. Estos fármacos incluyen ciclofosfamida (CYC), azatioprina (AZA), ciclosporina A (CSA) y micofenolato de mofetilo (MMF, por sus siglas en inglés) (ver p. ej., Mok et al. (2003) Ann Rheum Dis 62, 799-804 e Iaccarino et al. (2007) Autoimmunity Reviews 6, 190-
25 195). Aunque estos fármacos son beneficiosos, sigue existiendo una necesidad en la técnica de agentes

terapéuticos mejorados para mejorar la respuesta a fármacos inmunosupresores que modulen las respuestas inmunitarias, particularmente las respuestas inmunitarias de células B, para tratar mejor enfermedades, trastornos y afecciones inflamatorias o autoinmunitarias. En la presente se describen composiciones de inhibidor BAFF/APRIL anti-FcRn y métodos para su uso en el tratamiento de una variedad de enfermedades y trastornos.

La presente descripción proporciona proteínas de fusión TACI-Fc inmunomoduladoras que exhiben actividad neutralizadora de BAFF y APRIL (o heterotímeros BAFF/APRIL). Las proteínas de fusión TACI-Fc son composiciones inhibidoras de BAFF/APRIL anti-FcRn que contienen dominios DR1 y/o DR2 extracelulares variantes de TACI y dominios de unión al receptor Fc variantes. La presente descripción también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas de fusión TACI-Fc, métodos para elaborar y usar tales proteínas, y composiciones farmacéuticas para tratar una variedad de enfermedades, que incluyen enfermedades, trastornos y afecciones inmunológicas.

SUMARIO

En la presente se proporcionan proteínas de fusión TACI-Fc que se unen a e inhiben la actividad de los

ligandos BAFF, APRIL para neutralizar su actividad y bloquear o antagonizar la actividad de los receptores estimuladores de células B, TACI, BCMA y BAFF-R. Las proteínas de fusión TACI-Fc incluyen además un dominio Fc mutante que contiene mutaciones para bloquear una o más funciones efectoras, tales como citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés), y/o inhibir una o más actividades, que incluyen una o más actividades, que incluyen la actividad de FcRn. Como se describe además más abajo, las proteínas de fusión TACI-Fc pueden usarse para el tratamiento de una variedad de enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con una respuesta inmunitaria desregulada.

En un aspecto, la proteína de fusión TACI-Fc incluye una porción de dominio extracelular (ECD) de TACI y un dominio Fc de inmunoglobulina G (IgG) híbrido, p. ej., IgG1/IgG4. En algunas modalidades, la porción de ECD de TACI incluye una porción de dominio DR2 de TACI. En algunas modalidades, la porción de ECD de TACI incluye una porción de ECD contigua que abarca al menos una porción de las regiones DR1/DR2. En una modalidad, la porción de ECD de TACI incluye una secuencia de aminoácidos establecida en las sec. con núms. de ident.: 1 o 2.

En una modalidad, la porción de ECD de TACI incluye una o más mutaciones. En una modalidad, las mutaciones incluyen L82H solo o en combinación con una única mutación sustituida con histidina en la Tabla 1, donde la identificación y numeración de aminoácidos está de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 40. En otra modalidad, las mutaciones incluyen F78H y D80H. En otra modalidad, las mutaciones incluyen F78H, D80H, y L82H. En otra modalidad, las mutaciones incluyen Y79H, D80H, y L82H. En otra modalidad, las mutaciones incluyen D80H, L82H, y L83H. En otra modalidad, las mutaciones incluyen Y79H, D80H, y L83H. En otra modalidad, las mutaciones incluyen D80H, L83H, e I87H. Los SPR de las **Figuras 2A, 2B y 3** muestran afinidad debilitada en comparación con WT para algunas variantes específicas, p. ej. aquellas que tienen una o más mutaciones de: L82H, F78H/D80H/L82H, Y79H/D80H/L82H, D80H/L82H/L83H, Y79H/D80H/L83H, D80/L83H/I87H.

En una modalidad, la mutación es N434H. En otra modalidad, la mutación es Y436L. En otra modalidad, las mutaciones incluyen L234F y L235E. En otra modalidad, las mutaciones incluyen M252Y, S254T, y T256E. En otra modalidad, las mutaciones incluyen L234F, L235E, y N434H. En otra modalidad, las mutaciones incluyen M252Y, S254T, T256E, N434H. En otra modalidad, las mutaciones incluyen L234F, L235E, M252Y, S254T, y T256E. En otra modalidad, las

mutaciones incluyen L234F, L235E, M252Y, S254T, T256E, y N434H. En otra modalidad, las mutaciones incluyen T307A, E380A y N434A.

En algunas modalidades, el dominio Fc de Ig mutante se deriva de una IgG. En algunas modalidades, el dominio Fc de Ig mutante se deriva de una IgG1, una IgG2, una IgG3, una IgG4, o un dominio Fc híbrido de este. En algunas modalidades, el dominio Fc de Ig mutante comprende un dominio Fc de IgG1-IgG4 híbrido.

En algunas modalidades, el dominio Fc de Ig mutante comprende una secuencia de aminoácidos al menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 16-24, y 72. En una modalidad, el dominio Fc de Ig mutante comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a un dominio Fc de Ig mutante establecido en cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 16-24 y 72.

En algunas modalidades, la porción de ECD de TACI se acopla al dominio Fc de Ig mutante mediante un enlazador polipeptídico. En una modalidad, el enlazador polipeptídico contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en sec. con núm. de ident.: 3-15.

En algunas modalidades, la proteína de fusión TACI-Fc comprende una secuencia de aminoácidos al menos

96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de TACI-Fc establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 25-38, 46-48, 55, 56, y 67. En una modalidad, la proteína de fusión comprende una
5 secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de aminoácidos de TACI-Fc establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 25-38, 46-48, 55, 56, y 67. En otra modalidad, la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos establecida en las sec. con núms.
10 de ident.: 25 o 67.

En algunas modalidades, la proteína de fusión exhibe una afinidad de unión (K_D) para FcRn a un pH 6,0 que es menor que 50 nM, menor que 20 nM, menor que 12 nM, menor que 6 nM, o menor que 4 nM.

15 En algunas modalidades, la proteína de fusión exhibe un aumento en la afinidad de unión (K_D) para FcRn mayor que 50 veces, mayor que 100 veces, o mayor que 200 veces a un pH 6,0 en relación con pH 7,4.

En otro aspecto, la presente descripción
20 proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión TACI-Fc descrita en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un ácido nucleico que codifica una proteína
25 de fusión TACI-Fc descrita en la presente. En una modalidad, el ácido nucleico codifica la proteína de

fusión establecida en las sec. con núms. de ident.: 25 o 67. En otra modalidad, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos establecida en las sec. con núms. de ident.: 69 o 70. En algunas modalidades, el
5 ácido nucleico codifica una proteína de fusión TACI-Fc optimizada por codones.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un vector de expresión que codifica una proteína de fusión TACI-Fc descrita en la presente, tal
10 como la proteína de fusión establecida en las sec. con núms. de ident.: 25 o 67 o una proteína de fusión TACI-Fc optimizada por codones. En una modalidad, el vector de expresión es un vector viral. En otra modalidad, el vector de expresión es un vector AAV.

15 En otro aspecto, la presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende un vector de expresión que codifica una proteína de fusión TACI-Fc descrita en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable.

20 En otro aspecto, la presente descripción proporciona una célula huésped que comprende un ácido nucleico o vector de expresión que codifica una proteína de fusión TACI-Fc descrita en la presente.

En otro aspecto, un método para tratar una
25 enfermedad comprende administrar a un paciente una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que

comprende una proteína de fusión TACI-Fc o vector de expresión que codifica una proteína de fusión TACI-Fc en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

En algunas modalidades, la enfermedad es

5 trastorno autoinmunitario. En algunas modalidades, el trastorno autoinmunitario se selecciona del grupo que consiste en rechazo agudo mediado por anticuerpos, rechazo crónico mediado por anticuerpos, síndrome de Sjogren primario, anemia hemolítica autoinmunitaria, síndrome

10 antifosfolípido (APS, por sus siglas en inglés), APS catastrófico, artritis reumatoide refractaria, vasculitis autoinmunitaria, crioglobulinemia, autoanticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos (ANCA, por sus siglas en inglés), vasculitis IgA, vasculitis reumatoide, síndrome

15 antisintetasa, nefropatía membranosa primaria, artritis idiopática juvenil (AIJ), esclerosis sistémica, síndrome de Guillain-Barré, proteinosis alveolar pulmonar autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria (AIHA, por sus siglas en inglés), enfermedad hemolítica del feto y

20 del recién nacido (HDFN), reacción transfusional hemolítica aguda, tratamiento preventivo con virus adeno-asociado (AAV, por sus siglas en inglés), enfermedad ocular tiroidea (TED, por sus siglas en inglés), enfermedad de Huntington, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP, por sus siglas en inglés), pénfigo vulgar (PV), penfigoide

25 bulloso (BP, por sus siglas en inglés), púrpura

trombocitopénica inmunitaria (PTI), miastenia gravis (MG) y trastorno del espectro de la neuromielitis óptica (NMOSD, por sus siglas en inglés).

En otro aspecto, un método para disminuir una
5 respuesta inmunitaria comprende administrar a un paciente una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión TACI-Fc o vector de expresión que codifica una proteína de fusión TACI-Fc en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

10 En otro aspecto, un método para inhibir la actividad de una o más citocinas proinflamatorias comprende administrar a un paciente una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión TACI-Fc o vector de expresión que codifica una
15 proteína de fusión TACI-Fc en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, las citocinas proinflamatorias incluyen BAFF y/o APRIL.

En otro aspecto, un método para potenciar un aclaramiento de inmunoglobulinas IgG comprende administrar
20 a un paciente una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión TACI-Fc o vector de expresión que codifica una proteína de fusión TACI-Fc en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

25 En otro aspecto, un método para reducir los niveles de células B maduras, IgG, IgM, IgA, o una

combinación de estas comprende administrar a un paciente una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión TACI-Fc o vector de expresión que codifica una proteína de fusión TACI-Fc en
5 combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la administración de la composición farmacéutica no disminuye significativamente los niveles de IgD o IgE.

En otro aspecto, la presente descripción
10 proporciona un kit para tratar una enfermedad en un paciente en el que el kit incluye al menos una dosis de una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión TACI-Fc o vector de expresión que codifica una proteína de fusión TACI-Fc e instrucciones de uso.

En otro aspecto, la presente descripción
15 proporciona un enlazador polipeptídico que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en las sec. con núms. de ident.: 4, 5, o 6.

20 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La **Figura 1** es un modelo estructural basado en entradas PBD 1XU1 y 1KD7 que muestran posiciones de residuos de histidina (como esferas negras) que fueron
25 mutadas secuencial y combinatoriamente a/cerca de la

interfaz predicha entre TACI y BAFF usando contactos conocidos de TACI a BAFF y/o APRIL.

Las **Figuras 2A-2B** muestran los efectos de las sustituciones de histidina simples en el dominio TACI en la unión a BAFF (Figura 2A) y APRIL (Figura 2B) por resonancia de plasmón de superficie (SPR, por sus siglas en inglés).

La **Figura 3** muestra los efectos de múltiples sustituciones de histidina en el dominio TACI en la unión a BAFF mediante SPR.

La **Figura 4** muestra un sensorgrama ilustrativo de proteínas de fusión TACI-Fc a BAFF, APRIL o FcRn mediante interferometría de biocapas (BLI, por sus siglas en inglés).

La **Figura 5** es un sensorgrama que muestra la unión de TPP-6269 a BAFF a un pH 6,0 y pH 7,4 mediante BLI.

La **Figura 6** muestra los resultados de un ensayo funcional que muestra la inhibición de BAFF que se une a una línea celular HEK293 reportera de BCMA/factor nuclear kappa B (NF- κ B, por sus siglas en inglés)-luciferasa mediante diferentes concentraciones de proteína de fusión TACI-Fc o un control (TPP-4217).

La **Figura 7** muestra los resultados de un ensayo funcional que muestra la inhibición de la unión de BAFF y la activación mediada por NF- κ B en una línea celular HEK293 reportera de BCMA/NF- κ B-luciferasa mediante diferentes concentraciones de variantes de TACI-Fc como

se indica, que incluye los valores IC50 correspondientes asociados con ellas.

La **Figura 8** muestra los resultados de un ensayo funcional que muestra la inhibición de la unión de BAFF y la activación mediada por NF- κ B en una línea celular HEK293 reportera de BCMA/NF- κ B-luciferasa mediante diferentes concentraciones de proteínas de fusión TACI-Fc TPP-4286 y un control (TPP-4291), que incluye los valores IC50 correspondientes asociados con ellas.

Las **Figuras 9A-9H** representan sensogramas de interferometría de biocapa que muestran la unión de variantes de TACI-Fc a FcRn a un pH 6,0 (paneles izquierdos) y pH 7,4 (paneles derechos) usando el sistema Octet Red96. Las variantes de TACI-Fc incluyen: TPP-5260 (Figura 9A); TPP-5262 (Figura 9B); TPP-5317 (Figura 9C); TPP-5272 (Figura 9D); TPP-5273 (Figura 9E); TPP-5274 (Figura 9F); TPP-5275 (Figura 9G); y TPP-6269 (Figura 9H).

La **Figura 10** muestra una estructura cristalina de un complejo FcRn:Fc (PDB: 4N0U), que muestra los residuos ácidos E115, E116, D130, y E133 en el FcRn humano procesado para dirigirse mediante las proteínas de fusión TACI-Fc de la presente descripción.

Las **Figuras 11A-11B** muestran trazas de octeto que comparan la unión a FcRn de variantes de TACI-Fc sustituidos con histidina única (Figura 11A) y variantes de

TACI-Fc sustituidos con histidina tanto simple como doble (Figura 11B) en relación con una proteína de fusión TACI-Fc silvestre (“WT”; TPP-5274 no sustituta con histidina parenteral) a un pH 7,4. Las **Figuras 11C-11D** muestran 5 trazas de octeto que comparan la unión a FcRn de variantes de proteína de fusión TACI-Fc sustituidos con histidina simple (Figura 11C) y variantes de TACI-Fc sustituidos con histidina tanto simple como doble (Figura 11D) en relación con una proteína de fusión TACI-Fc (“WT”; TPP-5274) a un pH 10 6,0.

La **Figura 12A** muestra trazas de octeto que comparan la unión a FcRn mediante TPP-5958 (L234F, L235E, M252Y, S254T, T256E, N434H) y TPP-5957 (L234F, L235E, M252Y, S254T, T256E) a un pH 6,0. La **Figura 12B** muestra 15 trazas de octeto que comparan la unión a FcRn mediante TPP-5958 (L234F, L235E, M252Y, S254T, T256E, N434H) y TPP-5957 (L234F, L235E, M252Y, S254T, T256E) a un pH 7,4.

La **Figura 13A** muestra la cinética de unión de TPP-6269 a diversas concentraciones de FcRn a un pH 6,0 por 20 resonancia de plasmón de superficie (SPR)/biacore. La **Figura 13B** muestra la cinética de unión de TPP-6269 a diversas concentraciones de FcRn a un pH 7,4 por SPR/Biacore. La Figura 13C muestra las constantes de disociación de equilibrio (K_D) correspondientes 25 determinadas por SPR/Biacore.

Las **Figuras 14A-14D** muestran el análisis de citometría de flujo que muestran la unión simultánea de las variantes de TACI-Fc, TPP-5954 (Figuras 14A, 14B), TPP-5957 (Figuras 14A, 14C) y TPP-5958 (Figuras 14A, 14D) a BAFF y FcRn humano en una línea celular que expresa FcRn humano.

Las **Figuras 15A-15B** muestran el análisis de citometría de flujo que muestran la capacidad de TPP-6269 (Figura 15A) y otras variantes de TACI-Fc (Figura 15B, como se indica) para bloquear la unión de IgG1 humana a FcRn en una línea celular que expresa FcRn humano.

La **Figura 16A** es un gráfico que muestra la estabilidad de las variantes de TACI-Fc seleccionadas mediante pruebas de estabilidad aceleradas usando cromatografía de exclusión por tamaño para ensayar el porcentaje de monómeros de TACI-Fc en función del tiempo. La **Figura 16B** es una tabla que muestra los números de porcentaje de monómero para cada una de las variantes de TACI-Fc seleccionadas en el momento cero (T0) y después de 1, 2 y 3 semanas de incubación a 37 °C.

La **Figura 17A** muestra el diseño de estudio *in vivo* de un experimento para evaluar la capacidad de TPP-6269 para reducir los niveles de IgG, IgM y células B maduras después del tratamiento *in vivo* de ratones con hemocianina de lapa ojo de cerradura (KLH, por sus siglas en inglés). La **Figura 17B** muestra números absolutos de células B220+ y células T CD4+ en esplenocitos de ratón

después de la coadministración de TPP-6269 y KLH en comparación con la administración de un control de KLH (“KLH + PBS”) o ninguna administración (“control saludable”), según lo determinado por citometría de flujo.

5 La **Figura 17C** muestra los niveles séricos resultantes de anticuerpos IgM e IgG anti-KLH después de las administraciones. La **Figura 17D** muestra los niveles séricos resultantes de anticuerpos IgM e IgG después de las administraciones.

10 La **Figura 18A** muestra el diseño de un experimento para evaluar la eliminación de anticuerpos (biotina-hIgG) IgG humana después de la administración de TPP-6269 en un ratón transgénico Tg32 muFcRn/- huFcRn *in vivo*. La **Figura 18B** muestra el porcentaje de reducción del total de
15 anticuerpos IgG humanos en función del tiempo a dosificaciones de 20 mg/kg y 60 mg/kg de TPP-6269 en comparación con la administración solo de PBS.

La **Figura 19A** muestra el diseño de un experimento para evaluar la farmacocinética de TPP-6269 durante un
20 periodo de 21 días.

La **Figura 19B** es un gráfico que muestra los resultados de este análisis.

La **Figura 20A** muestra el diseño de un experimento para evaluar la farmacocinética y farmacodinámica de TPP-
25 6269 durante un periodo de 10 días.

La **Figura 20B** es un gráfico que muestra los resultados del análisis farmacocinético.

La **Figura 20C** es un gráfico que muestra los resultados del análisis farmacodinámico.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

Como se usa en la presente, la palabra “uno/a” o
5 “pluralidad” antes de un sustantivo representa uno o más de los sustantivos particulares. Por ejemplo, la frase “una célula de mamífero” representa “una o más células de mamífero”.

Las formas singulares “un”, “una” y “el/la”
10 incluyen la referencia plural a menos que el contexto dicte claramente de cualquier otra manera.

El término “aproximadamente”, particularmente en referencia a una cantidad o número dado, pretende abarcar desviaciones dentro de más o menos diez por
15 ciento ($\pm 10\%$), cinco por ciento (p. ej., $\pm 5\%$), dos por ciento ($\pm 2\%$), uno por ciento ($\pm 1\%$) o medio por ciento ($\pm 0,5\%$).

Los términos “porción”, “porción de” y “porción de este(os)/esta(s)” se refieren a una parte o la
20 totalidad del componente temático. Por lo tanto, puede referirse a la totalidad de un componente o parte del componente.

Los términos “polipéptido” y “proteína” se usan indistintamente en la presente y se refieren a una cadena
25 molecular de dos o más aminoácidos ligados a través de

enlaces peptídicos. Los términos no se refieren a una longitud específica del producto. Por lo tanto, “péptidos” y “oligopéptidos”, se incluyen dentro de la definición de polipéptido. Los términos incluyen modificaciones postranslacionales del polipéptido, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y lo similar. Los términos también incluyen moléculas en las que se incluyen uno o más análogos de aminoácidos, o aminoácidos no canónicos o no naturales a medida que pueden sintetizarse o expresarse recombinantemente usando técnicas de ingeniería de proteínas conocidas. Además, las proteínas pueden derivatizarse como se describe en la presente mediante técnicas de química orgánica bien conocidas.

Como se usa en la presente, los términos “dominio” y “dominio funcional” se usan con referencia a un polipéptido funcional o dominio de ácido nucleico, que típicamente contienen o codifican una secuencia de aminoácidos de tres o más, generalmente 5 o 7 o más aminoácidos, tales como 10 a 200 residuos de aminoácidos que es estructural y/o funcionalmente distinta de otras porciones de la molécula y es identificable. Por ejemplo, los dominios incluyen aquellas porciones de una cadena polipeptídica que pueden formar una estructura independientemente plegada dentro de una proteína compuesta por uno o más motivos estructurales y/o que se reconoce en

virtud de una actividad funcional, tal como actividad de unión. Una proteína, tal como las proteínas de fusión descritas en la presente, puede incluir uno o más dominios distintos. Un dominio puede identificarse, definirse o
5 distinguirse por homología de la secuencia o estructura primaria con miembros de la familia relacionados, tal como homología con motivos. En otro ejemplo, un dominio puede distinguirse por su función, tal como la capacidad de interactuar con una biomolécula, tal como un socio de unión
10 afín. Un dominio puede exhibir independientemente una función o actividad biológica de tal manera que el dominio independientemente o fusionado a otra molécula pueda realizar una actividad, tal como, por ejemplo, la unión. En algunos casos, los aminoácidos N- y/o C-terminales
15 adyacentes de un dominio dado de estos (*p. ej.*, dominio rico en cisteína (CRD, por sus siglas en inglés)), pueden ligarse directamente mediante un enlace peptídico simple o un enlazador polipeptídico que contiene uno o más residuos de aminoácidos. Generalmente, las dos porciones y un
20 enlazador polipeptídico estarán en marco de lectura entre sí. Alternativamente, las dos porciones pueden ligarse covalentemente usando uno o más reticuladores conocidos en la técnica.

Como se usa en la presente, el término
25 “proteína TACI” (activador transmembrana o interactor de ligando de ciclofilina modulador de calcio) se refiere a

una proteína transmembrana de la superfamilia de receptores TNF (codificada por el gen *TNFRSF13B*), que antagoniza o bloquea la actividad de los receptores estimuladores de células B, antígeno de maduración de células B (BCMA, por sus siglas en inglés), receptor del factor de activación de células B (BAFF-R, por sus siglas en inglés) al unirse a sus ligandos APRIL (un ligando inductor de proliferación codificado por el gen *TNFSF1*) y BAFF (factor activador de células B, codificado por el gen *TNFSF13B*).

Los términos “dominio extracelular (ECD) de TACI” y “porción de ECD de TACI ” se refieren a una porción de la proteína que contiene sitios de unión para APRIL y BAFF y están compuestas por regiones de repetición de TNFR ricas en cisteína que contienen los dominios TACI DR1/DR2.

Los términos “región de Fc”, “dominio de Fc” e “Fc de inmunoglobulina (Ig)” se refieren a la región C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo, que incluye los dominios de región constante de cadena pesada de Ig CH2 y CH3 y puede incluir todo o parte del dominio de bisagra de Ig. El dominio de Fc típicamente codifica varias funciones efectoras que pueden modificarse o eliminarse. El dominio de Fc puede formar un monómero o dímero de dos cadenas polipeptídicas unidas a través de residuos de cisteína de

región de bisagra que forman enlaces disulfuro interpolipeptídicos.

Los términos “mutante” y “variante” se refieren a una proteína obtenida después de la modificación de una
5 proteína parental en un proceso de modificación de proteínas. Específicamente, un mutante o variante es una proteína que se deriva de una proteína parental mediante una o más sustitución(es) de aminoácidos, delección(es) de aminoácidos y/o adición(es) de aminoácidos en relación
10 con la proteína parental, que puede añadir, retener, eliminar o potenciar algunas o todas las funciones de la madre.

Como se usa en la presente, los términos “mutante TACI” y “variante de TACI” se usan
15 indistintamente con referencia a una porción de dominio extracelular (ECD) de TACI que difiere de la secuencia de ECD de TACI parental debido a al menos una modificación de aminoácidos. La modificación de aminoácidos puede ser una mutación de sustitución, delecciones de aminoácidos
20 y/o adición de aminoácidos. Un mutante TACI se une a APRIL y/o BAFF y puede exhibir una unión mejorada a sus ligandos a pH bajo (p. ej., pH 6,0) en comparación con, p. ej., un ECD de TACI silvestre o una proteína de referencia TACI de la que se deriva el mutante TACI. Ver
25 p. ej., las Tablas 1, 2.

Como se usa en la presente, los términos “mutante de Fc”, “variante de Fc” y “variante de Fc de Ig” se usan indistintamente con referencia a una secuencia de Fc que difiere de la secuencia de Fc parental debido a al menos una modificación de aminoácidos. La variante de Fc puede comprender solo la región Fc o puede estar presente en el contexto de un anticuerpo, fusión Fc, Fc aislado, región Fc u otro polipéptido que esté sustancialmente codificado por Fc. La variante de Fc puede referirse al polipéptido Fc por sí mismo, una composición que comprende un polipéptido de variante Fc, o una secuencia de aminoácidos que la codifica.

Los términos “variante de TACI-Fc” y “proteína de fusión TACI-Fc” se usan indistintamente con referencia a una proteína híbrida que combina la especificidad de unión de un dominio de unión a TACI que contiene una porción de dominio extracelular (ECD) de TACI compuesta por porciones de dominio TACI DR2 o TACI DR1/DR2 fusionadas a o químicamente conjugadas con un dominio Fc de inmunoglobulina (Ig) mutante que exhibe funciones efectoras reducidas debido a la inclusión de una o más mutaciones en las mismas. El ECD de TACI incluye secuencias de aminoácidos contiguas o no contiguas que proporcionan uno o más sitios de unión para APRIL y BAFF. Las porciones de unión APRIL y BAFF se derivan del ECD de

TACI sin las secuencias transmembrana o citoplasmáticas del receptor TACI.

Los términos “región Fc”, “dominio Fc” e “Fc de Ig” se refieren a la región C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo, que incluye los dominios de región constante de cadena pesada de Ig CH2 y CH3 y puede incluir todo o parte del dominio de bisagra de Ig. El dominio de Fc típicamente codifica varias funciones efectoras que pueden modificarse o eliminarse. El dominio Fc puede formar un monómero o dímero de dos cadenas polipeptídicas unidas por uno o más enlaces disulfuro. Un dominio Fc de la presente descripción es una forma variante o mutante de un dominio Fc silvestre que exhibe funciones efectoras reducidas (*p. ej.*, reducidas a más de aproximadamente 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 2 veces, 5 veces o más).

Como se usan en la presente, las referencias a sustituciones de aminoácidos en la región Fc usan el sistema de numeración de la UE a menos que se describan con referencia a una sec. con núm. de ident. específica. La numeración de la UE es conocida y está de acuerdo con el Cuadro Científico IMGT actualizado más recientemente (IMGT®, el sistema internacional de información ImMunoGeneTics™, http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html (creada: 17 de mayo de 2001, última

actualización: 10 de enero de 2013) y el índice de la UE como se informó en Kabat, E. A. et al. Sequences of Proteins of Immunological interest. 5.^a ed. US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242
5 (1991).

El término “enlazador polipeptídico” se refiere a un polipéptido definido por una secuencia de aminoácidos que funciona para conectar el dominio TACI en el marco del dominio Fc de Ig, lo que resulta en una proteína de fusión
10 TACI-Fc.

Como se usa en la presente, el término “Fc de Ig híbrida” significa una región Fc mutante que comprende porciones de al menos dos subclases de IgG1.

Un “conjugado” se refiere a cualquier molécula
15 híbrida, que incluye dominios proteicos y/u otras moléculas que contienen tanto porciones de aminoácidos o proteínas como porciones sin proteínas. Los conjugados pueden sintetizarse mediante una variedad de técnicas conocidas en la técnica que incluyen, p. ej., técnicas de
20 ADN recombinante, síntesis en fase sólida, síntesis en fase de solución, técnicas sintéticas químicas orgánicas o una combinación de estas técnicas. La elección de síntesis dependerá de la molécula que va a generarse. Por ejemplo, una molécula híbrida que no es completamente
25 “proteína” en naturaleza puede sintetizarse mediante una

combinación de técnicas recombinantes y técnicas en fase de solución.

Los términos “unir”, “unido” o variaciones gramaticales de estos se usan con referencia a la participación de una molécula en cualquier interacción atractiva con otra molécula, lo que resulta en una asociación estable en la que las dos moléculas están en estrecha proximidad entre sí. La unión incluye, pero no se limita a, enlaces no covalentes, enlaces covalentes (tales como enlaces covalentes reversibles e irreversibles), e incluye interacciones entre moléculas tales como, pero no se limitan a, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos y moléculas pequeñas, tales como compuestos químicos que incluyen fármacos.

Con respecto a la unión de las proteínas de fusión TACI-Fc de la presente descripción, los términos “unir”, “unido” o variaciones gramaticales se usan con referencia a la proteína de fusión TACI-Fc o dominio de esta que se une específicamente *in vitro* y/o *in vivo* a cada uno de APRIL, BAFF, y el receptor Fc neonatal (FcRn) pero no a otros ligandos o antígenos. Típicamente, el dominio o proteína de fusión TACI-Fc se une específicamente a cada uno de APRIL, BAFF y FcRn con una constante de disociación de equilibrio (K_D) de aproximadamente menos de 10^{-7} M, tal como aproximadamente menos de 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M, o menos,

pero no a otra molécula con afinidad similar cuando se determina por, p. ej., tecnología de resonancia de plasmón de superficie (SPR) en un instrumento de plasmón de superficie BIACORE® 2000 usando la proteína de fusión TACI-Fc como el analito y APRIL, BAFF o FcRn como el ligando. Por consiguiente, a menos que se indique de cualquier otra manera, una proteína de fusión TACI-Fc se une a APRIL, BAFF o FcRn soluble o unido a las células con una K_D de 10^{-7} M o menor, tal como aproximadamente menor que 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, o inferior.

El término “actividad de unión” se refiere a las características de una molécula, p. ej., un polipéptido o dominio polipeptídico que se relaciona con si se une o cómo se une a uno o más socios de unión. Una actividad de unión puede incluir cualquier medida de unión de una molécula para un socio de unión. Las actividades de unión incluyen la capacidad de unir el (los) socio(s) de unión, la afinidad con la que se une al socio de unión (p. ej., alta afinidad), la avidez con la que se une al socio de unión, la fuerza del enlace con el socio de unión y/o la especificidad o selectividad para la unión con el socio de unión.

El término “afinidad de unión” se refiere a la afinidad de unión específica de una proteína para su socio de unión (es decir, su contra-estructura) bajo condiciones de unión específicas. La afinidad de unión se refiere a la

fuerza de la interacción entre dos o más moléculas, tales como socios de unión, típicamente la fuerza de las interacciones no covalentes entre dos socios de unión. Un aumento o atenuación en la afinidad de unión de un dominio modificado por afinidad, o una proteína de fusión TACI-Fc que contiene un dominio modificado por afinidad, a un socio de unión se determina en relación con la afinidad de unión del dominio no modificado (p. ej., el dominio TACI o Fc de Ig nativo o silvestre). Los métodos para determinar la afinidad de unión, o afinidad de unión relativa, son conocidos en la técnica, que incluye mediciones de Biacore o citometría de flujo, inmunoensayos de ELISA en fase sólida, octeto ForteBio, etc. En algunas modalidades, la afinidad de unión puede medirse por citometría de flujo, tal como basándose en una intensidad de fluorescencia media (MFI, por sus siglas en inglés) en un ensayo de unión de flujo.

El término " k_{asoc} " o " k_a ", como se usa en la presente, pretende referirse a la tasa de asociación de una interacción proteína-proteína particular, p. ej., proteína de fusión TACI-Fc o dominio de esta a un ligando, tal como APRIL, BAFF o FcRn, mientras que el término " k_{dis} " o " k_d ", como se usa en la presente, pretende referirse a la tasa de disociación de una interacción proteína-proteína particular. El término " K_D ", como se usa en la presente, pretende referirse a la constante de

disociación, que se obtiene de la relación de k_d a k_a (es decir, k_d/k_a) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de K_D pueden determinarse usando métodos bien establecidos en la técnica. Los métodos para
5 determinar la K_D de la proteína de fusión TACI-Fc incluyen la resonancia de plasmón de superficie, preferentemente usando un sistema biosensor tal como un sistema Biacore, interferometría de biocapas, citometría de flujo y análisis de Scatchard.

10 Tales determinaciones se miden típicamente, por ejemplo, a 25 °C o 37 °C. Por ejemplo, la cinética de proteína de fusión que se une a APRIL, BAFF o FcRn puede determinarse a un pH 8,0, 7,4, 7,0, 6,5 y 6,0 a través de la resonancia de plasmón de superficie (“SPR”) en un
15 instrumento BIAcore 3000 usando un método de captura adecuado para inmovilizar la proteína de fusión o ligando que se une a la misma.

El término “resonancia de plasmón de superficie”, como se usa en la presente, se refiere a un
20 fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz biosensor, por ejemplo usando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y
25 Piscataway, N.J.). Para descripciones adicionales, ver Jonsson, U., et al. (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26;

Jonsson, U., et al. (1991) *Biotechniques* 11:620-627;
Johnsson, B., et al. (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131;
y Johnsson, B., et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.

El término, “correspondiente a” con referencia a
5 posiciones de una proteína o polinucleótido, por lo que
las posiciones de aminoácidos o nucleótidos en una
secuencia de referencia “corresponden a” posiciones de
nucleótidos o aminoácidos en una secuencia descrita, tal
como se estableció en el Listado de secuencias, de tal
10 manera que las posiciones de aminoácidos o nucleótidos
correspondientes se identifican tras la alineación
estructural de dos o más secuencias usando un algoritmo
de alineación estándar, tal como el algoritmo GAP. Al
alinear las secuencias, un experto en la técnica puede
15 identificar residuos correspondientes, por ejemplo,
usando residuos de aminoácidos conservados e idénticos
como guías.

El término “identidad de secuencia” como se usa
en la presente se refiere a la identidad de secuencia
20 entre genes o proteínas a nivel de nucleótidos o
aminoácidos, respectivamente. La “identidad de secuencia”
es una medida de identidad entre proteínas a nivel de
aminoácidos y una medida de identidad entre ácidos
nucleicos a nivel de nucleótidos. La identidad de
25 secuencia de proteínas puede determinarse al comparar la
secuencia de aminoácidos en cada posición cuando las

secuencias están alineadas. Similarmente, la identidad de secuencia de ácidos nucleicos puede determinarse al comparar la secuencia de nucleótidos en cada posición cuando las secuencias están alineadas. Los métodos para la alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica, tales métodos incluyen el software GAP, BESTFIT, BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR), FASTA y TFASTA.

El término “vector de expresión” se refiere a una molécula de ácido nucleico que contiene secuencias de ácido nucleico necesarias para la expresión en procariotas, que incluye, p. ej., un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, un sitio de unión al ribosoma y posiblemente otras secuencias, o la expresión en células eucariotas, que incluye, p. ej., promotores, potenciadores, señales de terminación y poliadenilación, y lo similar. Una secuencia de péptidos de señal secretora también puede codificarse, opcionalmente, mediante el vector de expresión recombinante, ligarse operativamente a la secuencia codificadora de manera que la proteína expresada pueda secretarse mediante la célula huésped recombinante, tal como para su expresión como una proteína secretada o para un aislamiento o purificación más fácil de la proteína de fusión TACI-Fc de la célula, si se desea. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico

autorreplicante así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido.

Los vectores de expresión incluyen secuencias reguladoras, p. ej., secuencias de control de expresión, 5 suficientes para dirigir la transcripción directa de un ácido nucleico ligado operativamente bajo al menos algunas condiciones; otros elementos requeridos o útiles para la expresión pueden suministrarse mediante, p. ej., la célula huésped o mediante un sistema de expresión *in* 10 *vitro*. Tales secuencias reguladoras incluyen típicamente un promotor y pueden incluir secuencias potenciadoras o secuencias activadoras corriente arriba. En algunas modalidades, un vector puede incluir secuencias que codifican una región no traducida 5' y/o una región no 15 traducida 3', que puede comprender una señal de escisión y/o poliadenilación. En general, los elementos reguladores pueden estar contenidos en un vector antes de la inserción de un ácido nucleico cuya expresión es deseada o puede estar contenida en un ácido nucleico 20 insertado o pueden insertarse en un vector después de la inserción de un ácido nucleico cuya expresión se desea. Los vectores de expresión incluyen vectores no virales, tales como vectores plásmidos, y vectores virales, tales como vectores de virus adenoasociados (AAV), vectores de 25 lentivirus, y lo similar.

Como se usa en la presente, el término “enfermedad” se usa con referencia a cualquier enfermedad, trastorno o afección que directa o indirectamente cause o contribuya a un estado distinto de la homeostasis fisiológica que existente en ausencia de tal enfermedad, 5 trastorno o afección.

Tal como se usa en la presente, el término “tratar” incluye tratamientos profilácticos y/o terapéuticos de una o más enfermedades. El término 10 tratamiento “profiláctico o terapéutico” se reconoce en la técnica e incluye la administración al huésped de una o más de las composiciones de proteína de fusión TACI- Fc descritas en la presente. Si se administra antes de la manifestación clínica de una enfermedad, el tratamiento es 15 profiláctico, (*es decir*, protege al huésped contra el desarrollo de la enfermedad o reduce las manifestaciones clínicas que resultarían de cualquier otra manera en ausencia de tratamiento), mientras que si se administra después de la manifestación de la enfermedad, el 20 tratamiento es terapéutico, (*es decir*, se pretende disminuir, mejorar, o estabilizar la enfermedad existente o los efectos secundarios de esta). Preferentemente, se pretende que la gravedad de la condición del sujeto se reduzca o al menos se mejore o se modifique parcialmente y 25 que se logre algún alivio, mitigación, reversión o disminución en al menos un síntoma clínico (*p. ej.*,

síntomas autoinmunitarios reducidos, pérdida de peso en sujetos en comparación con sujetos normales).

El término “composición farmacéutica” se refiere a preparaciones que se encuentran en forma tal que permitan que la actividad biológica de los ingredientes activos sea inequívocamente efectiva, y que no contenga componentes adicionales que sean significativamente tóxicos para sujetos a quienes se les administraría la composición.

Como se usa en la presente, el término “sujeto” incluye tanto sujetos humanos como sujetos no humanos (p. ej., animales veterinarios o animales salvajes). Preferentemente, los “sujetos” incluyen pacientes humanos.

El término “cantidad efectiva” o “una cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a una cantidad de una proteína de fusión TACI-Fc, sola o en combinación con uno o más agentes terapéuticos, que proporciona un resultado biológico, terapéutico y/o profiláctico deseado. Ese resultado puede ser la reducción, mejora, paliación, disminución, retraso y/o alivio de uno o más de los signos, síntomas o causas de una enfermedad en un sujeto, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. Una cantidad efectiva se puede administrar en una o más administraciones.

Como se usa en la presente, “tratamiento efectivo” se refiere al tratamiento que produce un efecto beneficioso, p. ej., el alivio de al menos un síntoma de una enfermedad en un sujeto. Un efecto beneficioso puede
5 ser una mejora con respecto al valor inicial, es decir, una mejora respecto de una medición u observación realizada antes del inicio de la terapia de acuerdo con el método.

El término “vida media biológica”, como se usa en
10 la presente, se refiere a la cantidad de tiempo que tarda la proteína de fusión TACI-Fc en perder la mitad de su actividad o concentración farmacológica o fisiológica. La vida media biológica puede verse afectada por la eliminación, excreción, degradación (p. ej.,
15 degradación/digestión enzimática) de la proteína de fusión, o absorción y concentración en ciertos órganos o tejidos del cuerpo. En algunas modalidades, la vida media biológica puede evaluarse al determinar el tiempo que tarda la concentración plasmática sanguínea de la sustancia en
20 alcanzar la mitad de su nivel de estado estable (“vida media plasmática”).

I. Proteínas de fusión TACI-Fc

En la presente se proporcionan proteínas de
25 fusión TACI-Fc que se unen a e inhiben la actividad de los

ligandos BAFF, APRIL para neutralizar su actividad y bloquear o antagonizar la actividad de los receptores estimuladores de células B, TACI, BCMA y BAFF-R. Las proteínas de fusión TACI-Fc incluyen además un dominio Fc mutante que contiene mutaciones para bloquear una o más funciones efectoras, tales como citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés), y/o inhibir una o más actividades, que incluyen una o más actividades, que incluyen la actividad de FcRn. Como se describe además más abajo, las proteínas de fusión TACI-Fc pueden usarse para el tratamiento de una variedad de enfermedades asociadas con una respuesta inmunitaria desregulada asociada con síntomas inflamatorios o autoinmunitarios que acompañan a una amplia gama de enfermedades y trastornos inflamatorios y autoinmunitarios.

Las proteínas de fusión TACI-Fc de la presente descripción incluyen una porción de dominio extracelular (ECD) de TACI y un dominio Fc de Ig mutante.

En algunas modalidades, la porción de ECD de TACI incluye un dominio DR2 de TACI. En algunas modalidades, la porción de ECD de TACI incluye una porción de ECD contigua que abarca al menos una porción de la región CRD1/CRD2. En algunas modalidades, la porción de ECD de TACI incluye una secuencia de aminoácidos establecida en las sec. con núms. de ident.: 1 o 2.

En algunas modalidades, la porción de ECD de TACI incluye una o más mutaciones, tales como las identificadas en las Tablas 1-3, donde los aminoácidos están numerados e identificados de acuerdo con la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 40.

En otra modalidad, las mutaciones incluyen F78H y L83H.

En otra modalidad, las mutaciones incluyen F78H y D80H.

10 En otra modalidad, las mutaciones incluyen F78H, D80H, y L82H.

En otra modalidad, las mutaciones incluyen Y79H y L83H.

15 En otra modalidad, las mutaciones incluyen Y79H, D80H, y L83H.

En otra modalidad, las mutaciones incluyen Y79H, D80H, y L82H.

En una modalidad, las mutaciones incluyen D80H.

20 En otra modalidad, las mutaciones incluyen D80H y L82H.

En otra modalidad, las mutaciones incluyen D80H y L83H.

En otra modalidad, las mutaciones incluyen D80H e I87H.

25 En otra modalidad, las mutaciones incluyen D80H, L82H, y L83H.

En otra modalidad, las mutaciones incluyen D80H, L83H, e I87H.

En una modalidad, las mutaciones incluyen L82H.

En otra modalidad, las mutaciones incluyen L82H
5 e I87H.

En otra modalidad, las mutaciones incluyen L82H e I92H.

En otra modalidad, las mutaciones incluyen L82H y Q95H.

10 En otra modalidad, las mutaciones incluyen L83H.

En otra modalidad, las mutaciones incluyen L83H e I87H.

En otra modalidad, las mutaciones incluyen I87H e I92H.

15 En algunas modalidades, la proteína de fusión TACI-Fc incluye un dominio Fc de Ig mutante. El dominio Fc mutante puede contener una variedad de mutaciones que sirven para reducir las funciones efectoras de Fc, que incluye la regulación descendente de las funciones
20 inflamatorias, tales como citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y unión a Clq; regular de manera descendente la activación de células B y la expresión del receptor de células B; mejorar la unión al receptor Fc
25 neonatal (FcRn); aumentar la estabilidad de la proteína y/o

renderizar el dominio Fc mutante inerte para una o más de estas funciones.

La secuencia de unión al FcRn en la región Fc juega un papel importante en la regulación de los niveles séricos de IgG. El FcRn regula las concentraciones séricas de IgG al unirse a y proteger la IgG monomérica endocitosada de la degradación en el compartimento lisosomal y transportar la IgG a la superficie celular para su liberación a un pH extracelular neutro. A través de este mecanismo, el FcRn es responsable de la larga vida media sérica de la IgG ya que la IgG que no está limitada por el FcRn entra en la vía lisosomal y se degrada.

La administración de altas dosis de las IgG en pacientes con enfermedad autoinmunitaria tiene un efecto paliativo que puede explicarse al menos parcialmente mediante la saturación de la protección mediada por FcRN de la IgG, lo que acorta la vida media de la IgG patógena (Jin & Balthasar, 2005, Hum. Immunol. 66:403-410; Akilesh et al., 2004, J. Clin. Invest. 113:1328-1333; Li et al., 2005, J. Clin. Invest. 115:3440-3450). Por consiguiente, el bloqueo específico de las interacciones FcRN-IgG puede usarse para promover la degradación de anticuerpos IgG patógenos, por ejemplo, para tratar enfermedades autoinmunitarias mediadas por IgG. Por ejemplo, en una modalidad, las proteínas de fusión TACI-Fc de la presente

descripción se usan en un método para mejorar la eliminación de inmunoglobulinas IgG en un paciente con una enfermedad, trastorno o afección inflamatoria o autoinmunitaria.

5 Las proteínas de fusión TACI-Fc de la presente descripción incluyen un dominio Fc de Ig que comprende una o más mutaciones que mejoran la unión del dominio Fc mutante al FcRn de manera que la proteína de fusión TACI-Fc supera a las IgG en la unión al FcRn, lo que reduce de esta
10 manera los niveles de IgG. El dominio Fc mutante puede incluir además una o más mutaciones que confieren actividades funcionales mejoradas, funciones antiinflamatorias o propiedades farmacocinéticas asociadas con la proteína de fusión TACI-Fc de la presente
15 descripción. Las actividades funcionales mejoradas o funciones antiinflamatorias se relacionan con mejoras asociadas con la unión de Clq y la citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de
20 anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación descendente de los receptores de superficie celular (p. ej., receptor de células B); activación de células B; y/o mayor estabilidad de proteínas.

En algunas modalidades, la proteína de fusión
25 TACI-Fc incluye un dominio Fc de Ig que comprende una mutación N434H.

En otra modalidad, la proteína de fusión TACI-Fc incluye un dominio Fc de Ig que comprende una mutación Y436L.

En otra modalidad, la proteína de fusión TACI-Fc incluye un dominio Fc de Ig que comprende mutaciones L234F y L235E.

En otra modalidad, la proteína de fusión TACI-Fc incluye un dominio Fc de Ig que comprende mutaciones M252Y, S254T y T256E.

En otra modalidad, la proteína de fusión TACI-Fc incluye un dominio Fc de Ig que comprende mutaciones L234F/L235E/N434H.

En otra modalidad, la proteína de fusión TACI-Fc incluye un dominio Fc de Ig que comprende mutaciones M252Y, S254T, T256E, N434H.

En otra modalidad, la proteína de fusión TACI-Fc incluye un dominio Fc de Ig que comprende mutaciones L234F, L235E, M252Y, S254T y T256E.

En otra modalidad, la proteína de fusión TACI-Fc incluye un dominio Fc de Ig que comprende mutaciones L234F, L235E, M252Y, S254T, T256E y N434H.

En otra modalidad, la proteína de fusión TACI-Fc incluye un dominio Fc de Ig que comprende mutaciones T307A, E380A y N434A.

Adicionalmente, se describen mutaciones o combinaciones de mutaciones útiles para su incorporación

en las proteínas de fusión TACI-Fc de la presente en US 2015/0017164, US 2020/0095310 y US 2021/0388054, cuyas descripciones se expresan incorporadas como referencia en la presente.

5 En algunas modalidades, el dominio Fc de Ig mutante comprende una secuencia de aminoácidos al menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos establecida en las sec. con núms. de ident.: 16-24, y 72. En otras modalidades, el dominio Fc de Ig
10 mutante comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a un dominio Fc de Ig mutante establecido en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 16-24 y 72. En algunas modalidades, el dominio Fc de Ig mutante de acuerdo con una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 16-24, y
15 72, y que incluye opcionalmente un residuo de lisina terminal unido a este. En una modalidad, el dominio Fc de Ig mutante comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 19. En otra modalidad, una modalidad, el dominio Fc de Ig mutante
20 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 72.

 En algunas modalidades, la proteína de fusión TACI-Fc incluye una porción de ECD de TACI que tiene cualquiera de las mutaciones o combinaciones de mutaciones
25 descritas anteriormente, y cualquiera de las mutaciones o

combinaciones de mutaciones del dominio Fc de Ig descritas anteriormente.

Preferentemente, el dominio Fc mutante se deriva de una IgG. Pueden emplearse diversos isotipos de IgG, 5 que incluyen dominios Fc derivados de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, o una combinación de estos. En modalidades preferidas, el dominio Fc comprende un dominio Fc de IgG1-IgG4 híbrido. En ciertas modalidades, el dominio Fc de IgG1-IgG4 híbrido se construye a partir de un ácido 10 nucleico que codifica una región de cadena C gamma-1 de IgG1 (p. ej., número de acceso. P01857) y una región de cadena C gamma-4 de IgG4 (p. ej., número de acceso P01861).

La porción de ECD de TACI se acopla (p. ej., 15 fusionada o conjugada) al dominio Fc de Ig mutante. En algunas modalidades, la porción de ECD de TACI se fusiona al dominio Fc de Ig mutante mediante un enlazador polipeptídico. En algunas modalidades, la porción de ECD de TACI se conjuga químicamente con el dominio Fc de Ig 20 mutante.

En algunas modalidades, el enlazador polipeptídico comprende una secuencia de aminoácidos con una longitud de al menos 3, al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 30, al menos 40, o al 25 menos 50 aminoácidos, que incluyen uno o más aminoácidos

seleccionados de G (glicina), alanina (A), serina (S), prolina (P), o una combinación de estos.

En una modalidad, el enlazador polipeptídico comprende la secuencia de aminoácidos $(AG_x)_n$, $(GA_x)_n$, $(A_xG)_n$, o $(G_xA)_n$, donde $x=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ u 8 y $n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ u 8 .

En otra modalidad, el enlazador polipeptídico comprende la secuencia de aminoácidos $(SG_x)_n$, $(GS_x)_n$, $(S_xG)_n$, o $(G_xS)_n$, donde $x=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ u 8 y $n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ u 8 .

En otra modalidad, el enlazador polipeptídico comprende la secuencia de aminoácidos $(EA_xK)_n$, donde $x=2, 3, 4, 5, 6, 7$ u 8 y $n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ u 8 .

En algunas modalidades, la porción de ECD de TACI se fusiona al dominio Fc de Ig mutante mediante un enlazador polipeptídico que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 3-15.

En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un enlazador polipeptídico que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en 4, 5 y 6.

En algunas modalidades, la proteína de fusión TACI Fc comprende un enlazador polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 3-15, que se fusiona con una porción de dominio Fc de Ig de

acuerdo con una cualquiera de las sec. con núms. de
ident.: 16-24, y 72, y que contiene opcionalmente una
lisina C-terminal unida a esta. Por ejemplo, en una
modalidad, la proteína de fusión TACI Fc comprende una
5 secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que
consiste en la sec. con núm. de ident.: 61. En otra
modalidad, la proteína de fusión TACI Fc comprende una
secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que
consiste en sec. con núm. de ident.: 62. En otra
10 modalidad, la proteína de fusión TACI Fc comprende una
secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que
consiste en sec. con núm. de ident.: 63. En otra
modalidad, la proteína de fusión TACI Fc comprende una
secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que
15 consiste en la sec. con núm. de ident.: 64. En otra
modalidad, la proteína de fusión TACI Fc comprende una
secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que
consiste en sec. con núm. de ident.: 65. En otra
modalidad, la proteína de fusión TACI Fc comprende una
20 secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que
consiste en sec. con núm. de ident.: 66.

En algunas modalidades, la proteína de fusión
TACI Fc comprende una porción de ECD de TACI con o sin
cualquiera de las mutaciones de TACI o combinaciones de
25 mutaciones de TACI descritas anteriormente, en donde la
porción de ECD de TACI se fusiona con cualquiera de los

enlazadores polipeptídicos establecidos en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 3-15.

En algunas modalidades, la proteína de fusión Fc de TACI comprende una porción de ECD de TACI de acuerdo con
5 la sec. con núm. de ident.: 1 o la sec. con núm. de ident.: 2, que se fusiona con un enlazador polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 3-15.

En algunas modalidades, la proteína de fusión TACI-Fc incluye una porción de ECD de TACI que comprende
10 cualquiera de las mutaciones TACI o combinaciones de mutaciones TACI descritas anteriormente en combinación con cualquiera de las mutaciones del dominio Fc de Ig o combinaciones de mutaciones del dominio Fc de Ig descritas anteriormente y con cualquiera de los enlazadores
15 polipeptídicos descritos anteriormente.

En algunas modalidades, la porción de ECD de TACI se conjuga con el dominio Fc. En una modalidad, la porción de ECD de TACI está reticulada al dominio Fc usando cualquiera de una serie de reticuladores químicos
20 conocidos. Los reticuladores ilustrativos son aquellos que enlazan dos residuos de aminoácidos a través de un enlace que incluye un enlace disulfuro "impedido". En estos enlaces, un enlace disulfuro dentro de la unidad de reticulación está protegido (al impedir grupos en cada lado
25 del enlace disulfuro) de la reducción por la acción, por ejemplo, de glutatión reducido o la enzima disulfuro

reductasa. Un reactivo adecuado, 4-succinimidiloxicarbonil- α -metil- α -(2-piridilditio)tolueno (SMPT), forma tal un enlace entre dos proteínas utilizando una lisina terminal en una de las proteínas y una cisteína terminal en la otra.

5 También pueden usarse reactivos heterobifuncionales que se reticulan mediante una porción de acoplamiento diferente en cada proteína. Otros reticuladores útiles incluyen, sin limitarse, reactivos que enlazan dos grupos amino (p. ej., N-5-azido-2-nitrobenzoiloxisuccinimida), dos grupos

10 sulfidrilo (p. ej., 1,4-bis-maleimidobutano), un grupo amino y un grupo sulfidrilo (p. ej., éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida), un grupo amino y un grupo

carboxilo (p. ej., 4-[p-azidosalicilamido]butilamina), y un grupo amino y un grupo

15 guanidinio que está presente en la cadena lateral de arginina (p. ej., monohidrato de p-azidofenil glioxal).

En algunas modalidades, la proteína de fusión TACI-Fc se conjuga con polietilenglicol (PEG). El PEG puede unirse a cualquier cadena lateral de aminoácidos o grupo

20 funcional de aminoácidos terminal, p. ej., un grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. Pueden emplearse métodos de unión de PEG a anticuerpos conocidos en la técnica.

En algunas modalidades, la proteína de fusión

25 comprende una secuencia de aminoácidos al menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos

establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de
ident.: 25-38, 46-48, 55, 56, y 67. En algunas
modalidades, la proteína de fusión comprende una
secuencia de aminoácidos establecida en una cualquiera de
5 las sec. con núms. de ident.: 25-38, 46-48, 55, 56, y 67.

En una modalidad, la proteína de fusión TACI-Fc
es TPP-6269, que comprende la secuencia de aminoácidos en
la sec. con núm. de ident.: 25.

En otra modalidad, la proteína de fusión TACI-
10 Fc es TPP-6270, que comprende la secuencia de aminoácidos
en la sec. con núm. de ident.: 26.

En otra modalidad, la proteína de fusión TACI-
Fc es TPP-6267, que comprende la secuencia de aminoácidos
en la sec. con núm. de ident.: 27.

15 En otra modalidad, la proteína de fusión TACI-
Fc es TPP-5776, que comprende la secuencia de aminoácidos
en la sec. con núm. de ident.: 28.

En otra modalidad, la proteína de fusión TACI-
Fc es TPP-5954, que comprende la secuencia de aminoácidos
20 en la sec. con núm. de ident.: 29.

En otra modalidad, la proteína de fusión TACI-
Fc es TPP-5957, que comprende la secuencia de aminoácidos
en la sec. con núm. de ident.: 30.

En otra modalidad, la proteína de fusión TACI-
25 Fc es TPP-5958, que comprende la secuencia de aminoácidos
en la sec. con núm. de ident.: 31.

En otra modalidad, la proteína de fusión TACI-Fc es TPP-5975, que comprende la secuencia de aminoácidos en la sec. con núm. de ident.: 32.

En otra modalidad, la proteína de fusión TACI-Fc es TPP-5977, que comprende la secuencia de aminoácidos en la sec. con núm. de ident.: 33.

En otra modalidad, la proteína de fusión TACI-Fc es TPP-5791, que comprende la secuencia de aminoácidos en la sec. con núm. de ident.: 34.

En otra modalidad, la proteína de fusión TACI-Fc es TPP-5780, que comprende la secuencia de aminoácidos en la sec. con núm. de ident.: 35.

En otra modalidad, la proteína de fusión TACI-Fc es TPP-5779, que comprende la secuencia de aminoácidos en la sec. con núm. de ident.: 36.

En otra modalidad, la proteína de fusión TACI-Fc es TPP-5792, que comprende la secuencia de aminoácidos en la sec. con núm. de ident.: 37.

En otra modalidad, la proteína de fusión TACI-Fc es TPP-5298, que comprende la secuencia de aminoácidos en la sec. con núm. de ident.: 38.

En otra modalidad, la proteína de fusión TACI-Fc es TPP-7165, que comprende la secuencia de aminoácidos en la sec. con núm. de ident.: 46.

En otra modalidad, la proteína de fusión TACI-Fc es TPP-7166, que comprende la secuencia de aminoácidos en la sec. con núm. de ident.: 47.

En otra modalidad, la proteína de fusión TACI-Fc es TPP-7167, que comprende la secuencia de aminoácidos en la sec. con núm. de ident.: 48.

En otra modalidad, la proteína de fusión TACI-Fc es TPP-6265, que comprende la secuencia de aminoácidos en la sec. con núm. de ident.: 55.

En otra modalidad, la proteína de fusión TACI-Fc es TPP-6458, que comprende la secuencia de aminoácidos en la sec. con núm. de ident.: 56.

En otra modalidad, la proteína de fusión TACI-Fc es TPP-6265, que comprende la secuencia de aminoácidos en la sec. con núm. de ident.: 67.

Las proteínas de fusión TACI-Fc de la presente descripción se han diseñado genéticamente para exhibir una unión aumentada a un pH 6,0 y una unión baja o insignificante a un pH 7,4. En una modalidad, una proteína de fusión TACI-Fc se caracteriza por una afinidad de unión (K_D) para FcRn a un pH 6,0 que es menor que 50 nM, menor que 20 nM, menor que 12 nM, menor que 6 nM, o menor que 4 nM. La proteína de fusión TACI-Fc puede caracterizarse además por una afinidad de unión (K_D) para FcRn que es mayor que 50 veces, mayor que 100 veces, o mayor que 200 veces a un pH 6,0 en relación con pH 7,4. Además, en la

medida en que la región Fc mutante en la proteína de fusión TACI-Fc exhibe una mayor unión al FcRn en comparación con una región Fc silvestre, los niveles de IgG en la circulación se reducen.

5 En ciertas modalidades, las proteínas de fusión TACI-Fc de la presente descripción exhiben aumentos de la vida media *in vivo* mayores que o aproximadamente 1,2 veces, aproximadamente 1,5 veces, aproximadamente 2,0 veces, aproximadamente 3,0 veces, aproximadamente 4,0
10 veces, aproximadamente 5,0 veces, o aproximadamente 6,0 veces. En algunas modalidades, la vida media biológica se extiende en más de 6 horas, más de 12 horas, más de 24 horas, más de 48 horas, más de 72 horas, más de 96 horas o más de 1 semana después de la administración *in vivo* en
15 comparación con una proteína de fusión TACI-Fc correspondiente que contiene una región Fc parental silvestre o no mutada. La vida media biológica puede determinarse, por ejemplo, al usar un ensayo de ELISA o un ensayo de actividad.

20 En otro aspecto, la presente solicitud proporciona una proteína de fusión que comprende un enlazador polipeptídico fusionado a un dominio Fc de Ig híbrido. El enlazador polipeptídico puede fusionarse al extremo N-terminal o C-terminal del dominio Fc de Ig
25 híbrido. La proteína de fusión puede ligarse (o fusionarse) además a cualquier dominio TACI de acuerdo

con la presente solicitud. En una modalidad, el enlazador polipeptídico comprende una secuencia de aminoácidos establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 3-15, y el dominio Fc de Ig híbrido comprende una
5 secuencia de aminoácidos establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 16-24 o 72, y que contiene opcionalmente una lisina añadida al extremo C-terminal. En algunas modalidades, la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de
10 las sec. con núms. de ident.: 61-66, y que contiene opcionalmente una lisina añadida al extremo C-terminal.

II. Ácidos nucleicos, vectores de expresión y células

En otro aspecto, la presente descripción
15 proporciona ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión TACI-Fc, vectores de expresión para expresar las proteínas de fusión TACI-Fc, como células huésped, que incluyen células establemente transformadas que expresan las proteínas de fusión TACI-Fc. Las líneas
20 celulares que expresan las proteínas de fusión TACI-Fc pueden usarse para fabricar las proteínas de fusión TACI-Fc usadas en las composiciones farmacéuticas para el tratamiento.

En un aspecto, la presente descripción
25 proporciona vectores de expresión para expresar las proteínas de fusión TACI-Fc en células apropiadas bajo

condiciones adecuadas para expresar la proteína de fusión TACI-Fc. Una molécula de ácido nucleico o vector de expresión incluye la molécula de ADN que codifica la proteína de fusión TACI-Fc ligada operativamente a
5 secuencias de control de expresión apropiadas. Las secuencias de control de expresión incluyen promotores, activadores, potenciadores, operadores, sitios de unión ribosómica, señales de inicio, señales de parada, señales de tapa, señales de poliadenilación y otras señales
10 involucradas con el control de la transcripción o traslación. La elección y el diseño de un vector y elemento(s) regulador(es) apropiado(s) está dentro de la capacidad y discreción de un experto en la técnica. Por ejemplo, un experto en la técnica puede seleccionar un
15 promotor apropiado (u otras secuencias de control de expresión) para la expresión en una especie deseada (p. ej., una especie de mamífero) o tipo celular.

En algunas modalidades, el vector de expresión incluye un promotor capaz de dirigir la expresión en
20 células de mamífero, tal como un promotor viral adecuado, p. ej., a partir de un citomegalovirus (CMV), retrovirus, virus simio (p. ej., SV40), virus del papiloma, virus del herpes u otro virus que infecta las células de mamíferos, o un promotor de mamífero de, p. ej., un gen tal como EFl α ,
25 ubiquitina (p. ej., ubiquitina B o C), globina, actina, fosfoglicerato quinasa (PGK, por sus siglas en inglés),

etc., o un promotor compuesto tal como un promotor CAG (combinación del elemento potenciador temprano de CMV y promotor de beta-actina de pollo). En algunas modalidades puede usarse un promotor humano. En algunas modalidades, se
5 usa un promotor que normalmente dirige la transcripción por una ARN polimerasa II eucariota (un “promotor pol II”) o una variante funcional de este. En algunas modalidades, se usa un promotor que normalmente dirige la transcripción por una ARN polimerasa I eucariota, p. ej., un promotor para la
10 transcripción de ARN ribosómica (distinto del ARNr 5S) o una variante funcional de este. En algunas modalidades, puede usarse un promotor que normalmente dirige la transcripción por una ARN polimerasa III eucariota (un “promotor pol III”), p. ej., (un promotor U6, H1, 7SK o ARNt
15 o una variante funcional de este).

Los promotores ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), un RSV LTR, un MoMLV LTR, un promotor de fosfoglicerato quinasa-1 (PGK), un promotor
20 del virus 40 de simio (SV40) y un promotor CK6, un promotor de transtiretina (TTR), un promotor de TK, un promotor sensible a la tetraciclina (TRE), un promotor del VHB, un promotor hAAT, un promotor selectivo de neuronas, tal como el promotor de sinapsina humana, un
25 promotor específico del músculo, tal como el promotor de creatina quinasa humana (MCK), un promotor específico del

hígado, tal como el promotor de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK, por sus siglas en inglés) humano, un promotor de rodopsina quinasa, un promotor de opsina, un promotor U6, un promotor E2F, un promotor de telomerasa (hTERT), un promotor H1, un potenciador de citomegalovirus/promotor de beta-actina de pollo/ β -globina de conejo (CAG), un promotor del factor de elongación 1-alfa (EF1- α), un promotor de β -glucuronidasa humana, un promotor de β -actina de pollo (CBA), un promotor LTR retroviral del virus del sarcoma de Rous (RSV, por sus siglas en inglés), un promotor de dihidrofolato reductasa y un promotor de 13-actina.

En algunas modalidades, el vector de expresión incluye una proteína de fusión TACI-Fc optimizada por codones. Los términos “optimizada por codones” y “optimización de codones” se refieren a un proceso para modificar una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con uno o más de los siguientes: (1) igualar las frecuencias de codones en un organismo huésped objetivo; (2) promover una mayor expresión; (3) asegurar un plegamiento adecuado; (4) proporcionar un contenido de GC adecuado para aumentar la estabilidad del ARNm o reducir las estructuras secundarias; (5) minimizar los codones repetidos en tándem o las corridas de bases que puedan perjudicar la construcción o expresión de genes; (6) personalizar las regiones de control transcripcional y traslacional; (7)

insertar o eliminar secuencias de tráfico de proteínas;
(8) eliminar/añadir sitios de modificación postraslación
en una proteína codificada (p. ej., sitios de
glicosilación); (9) añadir, eliminar o mezclar dominios
5 proteicos; (10) insertar o eliminar sitios de restricción;
(11) modificar los sitios de unión a ribosomas y los
sitios de degradación del ARNm; (12) ajustar las tasas de
traslación para permitir que los diversos dominios de la
proteína se plieguen adecuadamente; o (13) reducir o
10 eliminar estructuras secundarias problemáticas dentro del
polinucleótido. Las herramientas, algoritmos y servicios
de optimización de codones son conocidos en la técnica;
los ejemplos no limitantes incluyen los servicios de
GeneArt (Life Technologies), DNA2.0 (Menlo Park Calif.)
15 y/o métodos patentados.

En una modalidad, el ácido nucleico codifica la
proteína de fusión establecida en las sec. con núms. de
ident.: 25 o 67.

En otra modalidad, el ácido nucleico comprende
20 una secuencia de nucleótidos establecida en las sec. con
núms. de ident.: 69 o 70.

En ciertas modalidades, se proporciona un ácido
nucleico que codifica la proteína de fusión TACI-Fc, que
es un codón optimizado para la expresión en humanos. El
25 polinucleótido optimizado para codones puede prepararse
al reemplazar los codones del polinucleótido que codifica

la proteína de fusión TACI-Fc con, *p. ej.*, codones que aparecen con mayor frecuencia en genes humanos altamente expresados. Los métodos de optimización de codones son conocidos en la técnica y pueden usarse como se
5 proporciona en la presente. En algunas modalidades.

En algunas modalidades, una secuencia polinucleotídica optimizada por codones comparte menos de 95 %, menos de 90 %, menos de 85 %, menos de 80 %, menos de 75 %, menos de 70 %, menos de 65 %, menos de 60 %, menos de
10 55 % o menos de 50 % de identidad de secuencia con las secuencias de origen natural o silvestres correspondientes de las que se deriva la proteína de fusión TACI-Fc. En algunas modalidades, una secuencia polinucleotídica optimizada por codones comparte entre 50 % y 95 %, entre
15 50 % y 90 %, entre 50 % y 85 %, entre 50 % y 80 %, entre 50 % y 75 %, entre 50 % y 70 %, entre 50 % y 65 %, entre 50 % y 60 %, entre 50 % y 55 %, entre 55 % y 95 %, entre 55 % y 90 %, entre 55 % y 85 %, entre 55 % y 80 %, entre 55 % y 75 %, entre 55 % y 70 %, entre 55 % y 65 %, entre
20 55 % y 60 %, entre 60 % y 95 %, entre 60 % y 90 %, entre 60 % y 85 %, entre 60 % y 80 %, entre 60 % y 75 %, entre 60 % y 70 %, entre 60 % y 65 %, entre 65 % y 95 %, entre 65 % y 90 %, entre 65 % y 85 %, entre 65 % y 80 %, entre 65 % y 75 %, entre 65 % y 70 %, entre 70 % y 95 %, entre
25 70 % y 90 %, entre 70 % y 85 %, entre 70 % y 80 %, entre 70 % y 75 %, entre 75 % y 95 %, entre 75 % y 90 %, entre

75 % y 85 %, entre 75 % y 80 %, entre 80 % y 95 %, entre 80 % y 90 %, entre 80 % y 85 %, entre 85 % y 95 %, entre 85 % y 90 %, o entre 90 % y 95 % de identidad de secuencia con las secuencias de origen natural o silvestres correspondientes de las que se deriva la proteína de fusión TACI-Fc.

En algunas modalidades, un péptido señal heterólogo (no nativo) se añade a o se utiliza en una expresión adecuada que codifica la proteína de fusión TACI-Fc. El péptido señal ligado operativamente al ácido nucleico que codifica una proteína de fusión TACI-Fc de tal manera que una proteína de fusión TACI-Fc soluble resultante se recupera del medio de cultivo, la célula huésped o el periplasma de célula huésped. En algunas modalidades, el péptido señal es un péptido señal de una inmunoglobulina (tal como cadena pesada IgG o cadena ligera IgG-kappa), una citoquina (tal como interleucina-2 (IL-2), o CD33), una proteína de albúmina sérica (p. ej., HSA o albúmina), una secuencia señal de preproteína de azurocidina humana, una luciferasa, un tripsinógeno (p. ej., quimotripsinógeno o tripsinógeno) u otros péptidos señal capaces de expresar y/o secretar eficientemente la proteína de fusión TACI-Fc.

Los vectores de expresión pueden estar en forma de vectores virales o vectores no virales, tales como plásmidos. En algunas modalidades, los vectores son

vectores virales. Los vectores virales para la expresión del anticuerpo pueden derivarse de, p. ej., los adenovirus, virus adenoasociados (AAV), retrovirus (que incluyen lentivirus, tales como VIH-1 y VIH-2), virus vaccinia y otros poxvirus, herpesvirus (p. ej., virus del herpes simple tipos 1 y 2), poliovirus, Sindbis y otros virus de ARN, alfavirus, astrovirus, coronavirus, ortomixovirus, papovavirus, paramixovirus, parvovirus, picornavirus, togavirus y otros. Los vectores virales pueden o no pueden contener suficiente información genética viral y/o componentes estructurales para la producción de virus infeccioso cuando se introducen en células huésped, es decir, los vectores virales pueden ser competentes para la replicación o defectuosos en la replicación. En algunas modalidades, p. ej., cuando faltan componentes estructurales para la producción de virus infeccioso, los componentes funcionales necesarios pueden suministrarse en trans mediante una célula huésped o mediante otro vector introducido en la célula cuando se desea la producción de virus recombinante. En modalidades preferidas, los virus recombinantes defectuosos en la replicación defectuosa se administran para el tratamiento. Un ácido nucleico para suministro puede incorporarse en un genoma viral de origen natural o modificado (o una porción de este) o puede estar presente

dentro de una cápside viral como una molécula de ácido nucleico separada.

En ciertos casos, los vectores virales pueden diseñarse genéticamente para dirigirse a células específicas afectadas por una enfermedad, trastorno o afecciones, según sea apropiado, al usar las características de objetivos inherentes al vector de virus o diseñados genéticamente en el vector de virus. Las células específicas pueden ser “dirigidas” para el suministro y la expresión de polinucleótidos. Por lo tanto, la “dirigir”, en este caso, se relaciona con el uso de agentes de unión endógenos o heterólogos en forma de cápsides, proteínas de envoltura, anticuerpos para el suministro a células específicas, el uso de elementos reguladores específicos de tejido para restringir la expresión al (a los) subconjunto(s) específico(s) de células, o ambos.

En algunas modalidades, los vectores virales son vectores AAV. Los vectores AAV proporcionan un sistema de suministro preferido para la terapia con ácidos nucleicos de la presente solicitud ya que pueden permitir una expresión duradera y continua de alelos funcionales y el silenciamiento de los alelos mutantes correspondientes. Los vectores AAV pueden incluir o pueden modificarse para controlar la expresión del primer y segundo agentes activos a cuenta de una variedad de elementos reguladores,

que incluyen diversos elementos promotores y/o potenciadores para la expresión específica constitutiva o de tipo celular.

En otro aspecto, un método para producir la
5 proteína de fusión TACI-Fc incluye las etapas de cultivar una célula huésped que comprende un vector de expresión que codifica TACI-Fc y que recolecta la proteína de fusión TACI-Fc de la célula o de un sobrenadante de cultivo de esta.

10 Un gran número de células huésped bien conocidas, públicamente disponibles puede usarse para preparar los polipéptidos de las, p. ej., células o líneas celulares diseñadas genéticamente. La selección de una célula o línea celular depende de un número de factores reconocidos en la
15 técnica. Estos incluyen, por ejemplo, compatibilidad con el vector de expresión elegido, la toxicidad de los péptidos codificados por la molécula de ADN, velocidad de transformación, facilidad de recuperación de los péptidos, características de expresión, bioseguridad y costos.

20 En algunas modalidades, la célula huésped es una célula de mamífero. Los ejemplos de células huésped de mamíferos adecuadas incluyen células renales de mono verde africano (Vero; ATCC CRL 1587), células renales embrionarias humanas (293-HEK; ATCC CRL 1573), células
25 renales de hámster bebé (BHK-21, BHK-570; ATCC CRL 8544, ATCC CRL 10314), células renales caninas (MDCK; ATCC CCL

34), células de ovario de hámster chino (CHO-K1; ATCC CCL61; CHO DG44), células pituitarias de rata (GH1; ATCC CCL82), células HeLa S3 (ATCC CCL2.2), células de hepatoma de rata (H-4-II-E; ATCC CRL 1548), células
5 renales de mono transformadas con SV40 (COS-1; ATCC CRL 1650) y células embrionarias murinas (NIH-3T3; ATCC CRL (1658)).

En algunas modalidades, las células huésped son células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas
10 en inglés) o HEK293. En algunas modalidades, la célula huésped es una célula en suspensión, y el polipéptido se diseña genéticamente o se produce en suspensión cultivada, tal como en células CHO en suspensión cultivada, p. ej., células CHO-S. En algunos ejemplos, la
15 línea celular es una línea celular CHO que es deficiente en DHFR (DHFR-), tal como DG44 y DUXB11. En algunas modalidades, la célula es deficiente en glutamina sintasa (GS), p. ej., células CHO-S, células CHOK1 SV y células CHOZN (R)) GS-/- . En algunas modalidades, las células
20 CHO, tales como células CHO en suspensión, pueden ser células CHO-S-2H2, células CHO-S-clon 14 o células ExpiCHO-S. En otras modalidades, las células huésped son células de levadura.

En algunas modalidades, las células huésped son
25 células procariotas, tales como *E. coli*. La célula procariota transformada se cultiva bajo condiciones que

expresan polipéptidos y, después, se purifica para obtener una proteína soluble. Las células huésped pueden cultivarse bajo condiciones de fermentación convencionales de manera que se expresan los polipéptidos deseados. Las proteínas de fusión TACI-Fc pueden recuperarse y purificarse a partir de cultivos celulares recombinantes mediante métodos bien conocidos en la técnica, que incluyen precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de afinidad. Las etapas de replegamiento de proteínas pueden usarse, según se desee, para completar la configuración de la proteína madura. Finalmente, puede emplearse cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés) en las etapas de purificación finales.

III. Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, una composición farmacéutica comprende la fusión TACI-Fc de acuerdo con la presente descripción y un portador farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede contener, por ejemplo, uno o más excipientes para modificar, mantener o preservar, por ejemplo, el pH, la osmolaridad, viscosidad, claridad, color, isotonicidad, olor, esterilidad, estabilidad, velocidad de disolución o liberación, adsorción, o

penetración de la composición. Tales composiciones pueden incluir reguladores tales como solución salina regulada neutra, solución salina regulada fosfato y lo similar; carbohidratos tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; polipéptidos o aminoácidos, tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes, tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (p. ej., hidróxido de aluminio); conservantes; o combinaciones de estos.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica es un sólido, tal como un polvo, cápsula, o tableta. Por ejemplo, los componentes de la composición farmacéutica pueden liofilizarse. En algunas modalidades, la composición farmacéutica sólida se reconstituye o se disuelve en un líquido antes de la administración.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica es un líquido, por ejemplo, proteínas de fusión TACI-Fc disueltas en una solución acuosa (tal como solución salina fisiológica o solución de Ringer). En algunas modalidades, el pH de la composición farmacéutica está entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 8,5 (tal como entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 5,0, entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 5,5, entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,0, entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 6,5, entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 7,0, entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5, entre

aproximadamente 7,0 y aproximadamente 8,0, o entre aproximadamente 7,5 y aproximadamente 8,5).

En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, un relleno, aglutinante, recubrimiento, conservante, lubricante, agente saborizante, agente edulcorante, agente colorante, un solvente, un agente regulador, un agente quelante, o estabilizador. Los rellenos farmacéuticamente aceptables ilustrativos incluyen celulosa, fosfato de calcio dibásico, carbonato de calcio, celulosa microcristalina, sacarosa, lactosa, glucosa, manitol, sorbitol, maltol, almidón pregelatinizado, almidón de maíz o almidón de papa. Los aglutinantes farmacéuticamente aceptables ilustrativos incluyen polivinilpirrolidona, almidón, lactosa, xilitol, sorbitol, maltitol, gelatina, sacarosa, polietilenglicol, metilcelulosa o celulosa. Los recubrimientos farmacéuticamente aceptables ilustrativos incluyen hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC, por sus siglas en inglés), laca, proteína de maíz zeína o gelatina. Los desintegrantes farmacéuticamente aceptables ilustrativos incluyen la polivinilpirrolidona, la carboximetilcelulosa o el almidón glicolato sódico. Los lubricantes farmacéuticamente aceptables ilustrativos incluyen polietilenglicol, estearato de magnesio o ácido esteárico. Los conservantes farmacéuticamente aceptables

ilustrativos incluyen metilparabenos, etilparabenos, propilparabeno, ácido benzoico o ácido sórbico. Los agentes edulcorantes farmacéuticamente aceptables ilustrativos incluyen sacarosa, sacarina, aspartamo o
5 sorbitol. Los agentes reguladores farmacéuticamente aceptables ilustrativos incluyen carbonatos, citratos, gluconatos, acetatos, fosfatos o tartratos.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende además un agente para la liberación
10 controlada o sostenida del producto, tal como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (ácido poliláctico, ácido poliglicólico), glóbulos o liposomas.

Preferentemente, la composición farmacéutica es
15 estéril. La esterilización puede lograrse mediante filtración a través de membranas de filtración estériles o radiación. Cuando la composición se liofiliza, la esterilización que usa este método puede llevarse a cabo ya sea antes o después de la liofilización y
20 reconstitución. La composición para administración parenteral puede almacenarse en forma liofilizada o en solución. Además, las composiciones parenterales generalmente se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial
25 de solución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

El portador farmacéuticamente aceptable puede ser un material, una composición o un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, el portador puede ser un relleno líquido o sólido, diluyente, excipiente, solvente o material encapsulante, o alguna combinación de estos. Cada componente del portador debe ser “farmacéuticamente aceptable” ya que debe ser compatible con los otros ingredientes de la formulación. También debe ser adecuado para el contacto con cualquier tejido, órgano, o porción del cuerpo que pueda encontrar, lo que significa que no debe conllevar un riesgo de toxicidad, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad, o cualquier otra complicación que supere excesivamente sus beneficios terapéuticos.

15

IV. Artículos de fabricación y kits

Artículos de fabricación que comprenden las composiciones farmacéuticas descritas en la presente en envases adecuados. El envasado adecuado para las composiciones (tales como composiciones oftálmicas) descritas en la presente son conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, viales (tales como viales sellados), recipientes, ampollas, botellas, frascos, envases flexibles (p. ej., bolsas selladas de Mylar o plástico), y lo similar. Estos artículos de fabricación pueden esterilizarse y/o sellarse adicionalmente.

Además se proporcionan kits que comprenden las composiciones farmacéuticas (o artículos de fabricación) descritos en la presente, que pueden comprender además instrucción(es) sobre métodos de uso de la composición, tales como usos descritos en la presente. Los kits descritos en la presente también pueden incluir otros materiales deseables a partir de un punto de vista comercial y de usuario, que incluyen otros reguladores, diluyentes, filtros, agujas, jeringas e insertos de envase con instrucciones para realizar cualquier método descrito en la presente.

V. Métodos de tratamiento e indicaciones terapéuticas

En otro aspecto, un método para tratar una enfermedad en un paciente comprende administrar al paciente que lo necesita una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión TACI-Fc de la presente descripción. En ciertas modalidades preferidas, la enfermedad es una enfermedad o trastorno autoinmunitario.

Una composición farmacéutica de acuerdo con la presente descripción puede usarse para tratar una variedad de trastornos inflamatorios o autoinmunitarios, cáncer, trasplante de órganos, infecciones virales y/o infecciones bacterianas en un mamífero, particularmente cuando se desea una respuesta inmunitaria reducida. Por

lo tanto, en ciertas modalidades la composición farmacéutica puede ser útil en el tratamiento de trastornos inflamatorios o autoinmunitarios, o trasplante de órganos.

5 Pueden usarse métodos profilácticos o terapéuticos para tratar las indicaciones terapéuticas descritas en la presente. En un contexto terapéutico, el sujeto mamífero es típicamente uno con una enfermedad, tal como una enfermedad o afección del sistema inmunológico, y
10 la administración se lleva a cabo para prevenir una progresión adicional de la enfermedad o afección. Además, la supresión de una respuesta inmunitaria puede ser beneficiosa en métodos profilácticos y/o terapéuticos para inhibir el rechazo de un trasplante de tejido, célula u
15 órgano en un donante por un receptor.

Las proteínas de fusión TACI-Fc pueden usarse para el tratamiento de una o más enfermedades, que incluyen enfermedades autoinmunitarias, cánceres de células B, patologías mediadas por anticuerpos (*p. ej.*,
20 ITCP, miastenia gravis y lo similar), enfermedades renales, respuesta inmunitaria indirecta de células T, rechazo de injertos y enfermedad de injerto versus huésped. La administración de las proteínas de fusión TACI-Fc puede regular específicamente las respuestas de
25 las células B durante la respuesta inmunitaria. Adicionalmente, la administración de las proteínas de

fusión TACI-Fc puede usarse para modular el desarrollo de células B, el desarrollo de otras células, la producción de anticuerpos y la producción de citocinas. La administración o uso de proteínas de fusión TACI-Fc proporcionadas también puede modular la comunicación de células B, tal como al neutralizar los efectos proliferativos de BAFF o APRIL.

En ciertas modalidades, la composición farmacéutica se usa para tratar una enfermedad, tal como una enfermedad, trastorno o afección autoinmunitaria. En algunas modalidades, la administración de la composición farmacéutica que padece la enfermedad puede dar como resultado la supresión o inhibición de tal ataque del sistema inmunológico o respuestas biológicas asociadas con ello. Al suprimir este ataque del sistema inmunológico a tejidos corporales sanos, los síntomas físicos resultantes (p. ej., dolor, inflamación de articulaciones, hinchazón de articulaciones o sensibilidad) que resultan de o se asocian con tal ataque a tejidos sanos pueden disminuirse o aliviarse, y el daño biológico y físico que resulta de o se asocia con el ataque del sistema inmunológico puede disminuirse, retrasarse o detenerse. En un contexto profiláctico, el sujeto puede ser uno con, susceptible a, o se cree que presenta una enfermedad (p. ej., enfermedad, trastorno o afección del sistema inmunológico), y la administración

se lleva a cabo típicamente para prevenir la progresión de la enfermedad, enfermedad, trastorno o afección; inhibir o aliviar los síntomas, signos o respuestas biológicas asociadas con ellos; prevenir daños corporales
5 que resultan potencialmente de ello; y/o mantener o mejorar el funcionamiento físico del sujeto.

En algunas modalidades, la enfermedad que puede tratarse mediante la composición farmacéutica descrita en la presente es cualquier enfermedad mediada por depósito
10 de complejos inmunes (p. ej., nefritis lúpica, vasculitis); interferencia directa con una vía (p. ej., síndrome antifosfolípido catastrófico de anticuerpos, crisis de miastenia gravis; enfermedad anti-Jo-1); opsonización o daño directo a las células (p. ej., púrpura
15 trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica autoinmunitaria); rechazo mediado por anticuerpos de un aloinjerto (p. ej., pacientes con trasplante renal altamente sensibilizados); o anticuerpos antifármacos contra factores de reemplazo biológico, vectores (p. ej.,
20 antifactor 8).

En algunas modalidades, la enfermedad es el lupus eritematoso sistémico (LES), que incluye la prevención de brotes sin glucocorticoides; síndrome de Sjogren; cirrosis biliar primaria (CBP); esclerodermia
25 sistémica; polimiositis; prevención de la diabetes; nefropatía IgA; vasculitis IgA; cánceres de células B,

por ejemplo, mieloma; esclerosis múltiple o neuritis óptica.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica puede usarse para tratar leucemias de células pre-B o B, tales como leucemia de células plasmáticas, leucemia linfocítica crónica o aguda, mielomas tales como mieloma múltiple, mieloma de células plasmáticas, mieloma endotelial y mieloma de células gigantes, y linfomas tales como linfoma no Hodgkin. En algunas de las modalidades, el tipo de mieloma incluye mieloma múltiple, plasmocitoma, plasmocitoma solitario múltiple y/o mieloma extramedular. En algunas de las modalidades, el tipo de mieloma incluye mieloma de cadena ligera, mieloma no secretor y/o mieloma IgD o IgE.

En algunas modalidades, las proteínas de fusión TACI-Fc proporcionadas pueden usarse como inmunosupresores para bloquear selectivamente la acción de los linfocitos B para usar en el tratamiento de enfermedades. Por ejemplo, ciertas enfermedades autoinmunitarias se caracterizan por la producción de autoanticuerpos, que contribuyen a la destrucción del tejido y a la exacerbación de la enfermedad. Los autoanticuerpos también pueden conducir a la aparición de complicaciones de depósito de complejos inmunes y conducir a muchos síntomas de lupus eritematoso sistémico, que incluye insuficiencia renal, síntomas

neurálgicos y muerte. Modular la producción de anticuerpos independientemente de la respuesta celular también beneficiaría en muchos estados de la enfermedad. También se ha mostrado que las células B desempeñan un papel en la secreción de inmunoglobulinas artrógenas en la artritis reumatoide. Los métodos y usos de las proteínas de fusión TACI-Fc proporcionadas para inhibir, bloquear o neutralizar la acción de las células B para suprimir de esta manera la producción de anticuerpos serían beneficiosos en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como miastenia gravis, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil de curso poliarticular y artritis psoriásica.

En algunas modalidades, las proteínas de fusión TACI-Fc pueden usarse para bloquear o neutralizar las acciones de las células B en asociación con enfermedades renales en etapa final, que pueden o no pueden asociarse con enfermedades autoinmunitarias. Tales métodos también serían útiles para tratar enfermedades renales inmunológicas. Adicionalmente, tales métodos serían útiles para tratar la glomerulonefritis asociada a enfermedades tales como nefropatía membranosa, nefropatía IgA o enfermedad de Berger, nefropatía IgM, vasculitis IgA, enfermedad de Goodpasture, glomerulonefritis posinfecciosa, enfermedad mesangioproliferativa, leucemia linfoide crónica, síndrome nefrótico de cambio mínimo. Tales métodos

también servirían como aplicaciones terapéuticas para tratar la glomerulonefritis secundaria o vasculitis asociada a enfermedades tales como lupus, poliarteritis, Henoch-Schonlein, esclerodermia, enfermedades relacionadas con HTV, amiloidosis, o síndrome urémico hemolítico. Los métodos proporcionados también serían útiles como parte de una aplicación terapéutica para tratar la nefritis intersticial o pielonefritis asociada a pielonefritis crónica, abuso de analgésicos, nefrocalcinosis, nefropatía causada por otros agentes, nefrolitiasis, o nefritis intersticial crónica o aguda. Los métodos proporcionados en la presente también incluyen el uso de las proteínas de fusión TACI-Fc proporcionadas en el tratamiento de enfermedades hipertensivas o de vasos grandes, que incluyen estenosis u oclusión de la arteria renal y émbolos de colesterol o émbolos renales. Los métodos y usos proporcionados también pueden usarse para el tratamiento de neoplasias renales o urológicas, mielomas múltiples, linfomas, neuropatía de cadena ligera o amiloidosis.

En algunas modalidades, las proteínas de fusión TACI-Fc proporcionadas pueden usarse para el tratamiento del asma y otras enfermedades crónicas de las vías respiratorias tales como bronquitis y enfisema. En algunas modalidades, las proteínas de fusión TACI-Fc pueden usarse para la inmunosupresión en la enfermedad del injerto contra huésped y el rechazo del injerto. En

algunas modalidades, los métodos y usos de las proteínas de fusión TACI-Fc incluyen el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, tales como diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM, por sus siglas en inglés) y enfermedad de Crohn. Las aplicaciones adicionales incluyen el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas para, p. ej., disminuir el dolor articular, la hinchazón, la anemia y otros síntomas asociados, así como tratar el shock séptico.

En algunas modalidades, los trastornos inflamatorios y autoinmunitarios incluyen acalasia; enfermedad de Addison; enfermedad de Still del adulto; agammaglobulinemia; alopecia areata; amiloidosis; espondilitis anquilosante; nefritis anti-GBM/anti-TBM; síndrome antifosfolípido; adrenalitis autoinmunitaria (enfermedad de Addison); angioedema autoinmunitaria; disautonomía autoinmunitaria; encefalomielitis autoinmunitaria; hepatitis autoinmunitaria; enfermedad autoinmunitaria del oído interno (AIED, por sus siglas en inglés); miocarditis autoinmunitaria; ooforitis autoinmunitaria; orquitis autoinmunitaria; pancreatitis autoinmunitaria; síndrome poliglandular autoinmunitario tipo II (SPA II); retinopatía autoinmunitaria; enfermedad tiroidea autoinmunitaria (AITD, por sus siglas en inglés), es decir, enfermedad de Hashimoto; urticaria autoinmunitaria; neuropatía axonal y neuronal (AMAN);

enfermedad de Balo; enfermedad de Behcet; penfigoide mucoso
benigno; penfigoide bulloso; enfermedad de Castleman (EC);
enfermedad celíaca; enfermedad de Chagas; polineuropatía
desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP, por sus siglas
5 en inglés); osteomielitis multifocal recurrente crónica
(CRMO, por sus siglas en inglés); síndrome de Churg-Strauss
(CSS, por sus siglas en inglés) o granulomatosis
eosinofílica (EGPA); penfigoide cicatricial; síndrome de
Cogan; enfermedad de aglutinina fría; bloqueo cardíaco
10 congénito; miocarditis por Cocksackie; síndrome de CREST;
enfermedad de Crohn; dermatitis herpetiforme;
dermatomiositis; enfermedad de Devic (neuromielitis
óptica); lupus discoide; síndrome de Dressler;
endometriosis; esofagitis eosinofílica (EoE); fascitis
15 eosinofílica; eritema nodoso; crioglobulinemia mixta
esencial; síndrome de Evans; fibromialgia; alveolitis
fibrosante; arteritis de células gigantes (arteritis
temporal); miocarditis de células gigantes;
glomerulonefritis; síndrome de Goodpasture; granulomatosis
20 con poliangitis; enfermedad de Graves; síndrome de
Guillain-Barré; tiroiditis de Hashimoto; anemia hemolítica;
púrpura de Henoch-Schonlein (HSP, por sus siglas en
inglés); herpes gestationis o penfigoide gestationis (PG);
hidradenitis supurativa (HS) (acné inverso);
25 hipogammaglobulinemia; nefropatía IgA; vasculitis IgA;
enfermedad esclerosante relacionada con IgG4; púrpura

trombocitopénica inmune (PTI); miositis por cuerpos de
inclusión (IBM, por sus siglas en inglés); cistitis
intersticial (CI); artritis juvenil; diabetes juvenil
(diabetes tipo 1); miositis juvenil (JM); enfermedad de
5 Kawasaki; síndrome de Lambert-Eaton; vasculitis
leucocitoclástica; liquen plano; liquen escleroso;
conjuntivitis leñosa; enfermedad por IgA lineal (LAD, por
sus siglas en inglés); lupus; enfermedad de Lyme crónica;
enfermedad de Meniere; poliangeítis microscópica (MPA, por
10 sus siglas en inglés); enfermedad mixta del tejido
conectivo (EMTC); úlcera de Mooren; enfermedad de Mucha-
Habermann; neuropatía motora multifocal (NMM) o MMNCB;
esclerosis múltiple; miastenia gravis; miositis;
narcolepsia; lupus neonatal; neuromielitis óptica;
15 neutropenia; penfigoide cicatricial ocular; neuritis
óptica; reumatismo palindrómico (PR); PANDAS; degeneración
cerebelosa paraneoplásica (DCP); hemoglobinuria paroxística
nocturna (HPN); síndrome de Parry Romberg; pars planitis
(uveítis periférica); síndrome de Parsonage-Turner;
20 pénfigo, pénfigo vulgar; neuropatía periférica;
encefalomielitis perivenosa; anemia perniciosa (AP);
síndrome de POEMS; poliarteritis nodosa; síndromes
poliglandulares tipo I, II, III; polimialgia reumática;
polimiositis; síndrome de posinfarto de miocardio; síndrome
25 pospericardiotomía; cirrosis biliar primaria; colangitis
esclerosante primaria; dermatitis por progesterona;

psoriasis; artritis psoriásica; aplasia pura de glóbulos rojos (PRCA, por sus siglas en inglés); pioderma gangrenoso; fenómeno de Raynaud; artritis reactiva; distrofia simpática refleja; policondritis recidivante; 5 síndrome de piernas inquietas (SPI); fibrosis retroperitoneal; fiebre reumática; artritis reumatoide; sarcoidosis; síndrome de Schmidt; escleritis; esclerodermia; síndrome de Sjogren; autoinmunidad espermática y testicular; síndrome de la persona rígida 10 (SPR); endocarditis bacteriana subaguda (EBS); síndrome de Susac; oftalmia simpática (OS); arteritis de Takayasu; arteritis temporal/arteritis de células gigantes; púrpura trombocitopénica (PT); síndrome de Tolosa-Hunt (THS, por sus siglas en inglés); mielitis transversa; diabetes tipo 15 1; colitis ulcerosa (CU); enfermedad indiferenciada del tejido conectivo (UCTD, por sus siglas en inglés); uveítis; vasculitis; vitíligo o enfermedad de Vogt-Koyanagi-Harada, síndrome antifosfolípido Ab; esclerosis múltiple; enfermedad relacionada con IgG4; diabetes tipo I; artritis 20 reumatoide, que incluye terapia con glucocorticoides (GC) RA o nefritis lúpica aguda, esclerosis lateral amiotrófica, neuromielitis óptica, mielitis transversa, autoinmunidad CNS, síndrome de Guillain-barré, neurocistercercosis, sarcoidosis (T/seroneg), síndrome de Churg-Strauss, 25 tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, trombocitopenia inmune (PTI), enfermedad de Addison,

polimiositis o dermatomiositis; nefropatía IgA; polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP); enfermedad antisintetasa, tal como el síndrome de Jo-1 y vasculitis ANCA.

5 En algunas modalidades, las proteínas de fusión TACI-Fc proporcionadas pueden usarse para tratar un cáncer de células B. En algunas modalidades, el cáncer de células B es un cáncer en el que BAFF y APRIL están involucrados o implicados en proporcionar un bucle de
10 supervivencia autocrino a las células B. En algunas modalidades, el cáncer es leucemia linfocítica crónica de células B, linfoma no Hodgkin o mieloma. En algunas modalidades, el cáncer es un mieloma.

 En modalidades preferidas, el trastorno
15 autoinmunitario se selecciona del grupo que consiste en rechazo agudo mediado por anticuerpos, síndrome de Sjogren primario, anemia hemolítica autoinmunitaria, síndrome antifosfolípido (APS), APS catastrófico, artritis reumatoide refractaria, vasculitis
20 autoinmunitaria, crioglobulinemia, autoanticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos (ANCA), vasculitis IgA, vasculitis reumatoide, síndrome antisintetasa, nefropatía membranosa primaria, artritis idiopática juvenil, esclerosis sistémica, síndrome de Guillain-Barré,
25 proteinosis alveolar pulmonar autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, enfermedad hemolítica del

feto y del recién nacido, rechazo mediado por anticuerpos, y reacción transfusional hemolítica aguda.

En otros aspectos, un método para mejorar la eliminación de inmunoglobulinas IgG en un paciente que lo
5 necesita comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión TACI-Fc de la presente descripción.

En otro aspecto, un método para reducir los niveles de células B maduras, IgG, IgM, IgA (o una
10 combinación de estas) en un paciente que lo necesita comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión TACI-Fc de la presente descripción. Además, en algunas modalidades, la administración de la composición
15 farmacéutica no disminuye significativamente los niveles de IgD o IgE.

En otro aspecto, un método para inhibir la actividad de una o más citocinas proinflamatorias en un paciente que lo necesita comprende administrar al
20 paciente una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión TACI-Fc de la presente descripción. En una modalidad, las citocinas proinflamatorias incluyen BAFF y/o APRIL.

Generalmente, las dosificaciones y vías de
25 administración de la composición farmacéutica se determinan de acuerdo con el tamaño y estado del sujeto, de acuerdo

con la práctica farmacéutica estándar. Por ejemplo, la dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente ya sea en ensayos de cultivo celular o en modelos animales tales como ratones, ratas, conejos, 5 perros, cerdos o monos. Un modelo animal también puede usarse para determinar el rango de concentración y la vía de administración adecuados. Después, tal información puede usarse para determinar las dosis y vías útiles de administración en humanos. La dosificación exacta puede 10 determinarse en vista de factores relacionados con el sujeto que requiere tratamiento. La dosificación y administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes del compuesto activo o para mantener el efecto deseado. Los factores por considerar para el tratamiento 15 incluyen la gravedad del estado patológico, la salud general del sujeto, la edad, peso y sexo del sujeto, tiempo y frecuencia de administración, combinación(es) de fármacos, sensibilidades de reacción y respuesta a la terapia.

20 Las composiciones farmacéuticas de acción prolongada pueden administrarse cada 3 a 4 días, cada semana, o quincenalmente dependiendo de la vida media y la tasa de aclaramiento de la formulación. La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos 25 de la molécula en la formulación usada. Típicamente, se administra una composición hasta que se alcanza una

dosificación que logra el efecto deseado. Por lo tanto, la composición puede administrarse como una dosis única, o como dosis múltiples (a las mismas o diferentes concentraciones/dosificaciones) con el tiempo, o como una
5 infusión continua. Se realiza rutinariamente un refinamiento adicional de la dosificación adecuada. Las dosificaciones adecuadas pueden determinarse a través del uso de datos de respuesta a la dosis adecuados.

En algunas modalidades, la composición
10 farmacéutica se administra a un sujeto a través de cualquier vía, que incluye por vía oral, transdérmica, por inhalación, por vía intravenosa, por vía intraarterial, intramuscular, aplicación directa a un sitio de herida, aplicación a un sitio quirúrgico, por vía intraperitoneal,
15 por supositorio, por vía subcutánea, intradérmica, transcutánea, por nebulización, por vía intrapleural, intraventricular, intraarticular, intraocular, o intraespinal. En algunas modalidades, la composición farmacéutica se administra en una forma adecuada para
20 infusión intravenosa.

En algunas modalidades, una dosis administrada de la composición farmacéutica es aproximadamente 1 mg de proteína por kg de masa corporal del sujeto o más (tal como aproximadamente 2 mg de proteína por kg de masa
25 corporal del sujeto o más, aproximadamente 5 mg de proteína por kg de masa corporal del sujeto o más,

aproximadamente 10 mg de proteína por kg de masa corporal del sujeto o más, aproximadamente 25 mg de proteína por kg de masa corporal del sujeto o más, aproximadamente 50 mg de proteína por kg de masa corporal del sujeto o más, aproximadamente 100 mg de proteína por kg de masa corporal del sujeto o más, aproximadamente 250 mg de proteína por kg de masa corporal del sujeto o más, aproximadamente 500 mg de proteína por kg de masa corporal del sujeto o más, aproximadamente 1000 mg de proteína por kg de masa corporal del sujeto o más, aproximadamente 2000 mg de proteína por kg de masa corporal del sujeto o más, o aproximadamente 5000 mg de proteína por kg de masa corporal del sujeto o más).

Una dosificación de la composición farmacéutica puede administrarse como una dosis única o una dosis repetida. En algunas modalidades, las dosis se administran a un sujeto una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, o cuatro o más veces al día. En algunas modalidades, aproximadamente 1 o más (tal como aproximadamente 2 o más, aproximadamente 3 o más, aproximadamente 4 o más, aproximadamente 5 o más, aproximadamente 6 o más, o aproximadamente 7 o más) dosis se administran en una semana. En algunas modalidades, se administran múltiples dosis en el transcurso de días, semanas, meses o años. En algunas modalidades, un curso de tratamiento es aproximadamente 1 o más dosis (tal como

aproximadamente 2 o más dosis, aproximadamente 3 o más dosis, aproximadamente 4 o más dosis, aproximadamente 5 o más dosis, aproximadamente 7 o más dosis, aproximadamente 10 o más dosis, aproximadamente 15 o más dosis, aproximadamente 25 o más dosis, aproximadamente 40 o más dosis, aproximadamente 50 o más dosis, o aproximadamente 100 o más dosis).

VI. Evaluación de las respuestas inmunitarias a las

composiciones de proteínas de fusión TACI-Fc

Las proteínas de fusión TACI-Fc modulan la actividad de las células B, como la proliferación, diferenciación o supervivencia de las células B. La evaluación de estas actividades puede llevarse a cabo in vitro o in vivo para monitorear las respuestas a la terapia con TACI-Fc.

La actividad funcional de las proteínas de fusión TACI-Fc puede examinarse usando una variedad de enfoques para evaluar la capacidad de las proteínas para unirse a socios de unión afines. Por ejemplo, las proteínas de fusión TACI-Fc pueden evaluarse para unirse a APRIL o BAFF. Se conoce una variedad de ensayos para evaluar la afinidad de unión y/o determinar si la proteína de fusión TACI-Fc se une específicamente a APRIL, BAFF o FcRn. Se pueden utilizar un número de ensayos de unión bien conocidos en la técnica, que

incluyen, pero no se limitan a, métodos que involucran BIAcore®, OCTET® y otros dispositivos y metodologías de resonancia de plasmón de superficie (SPR); citometría de flujo, ensayo de exclusión cinética (KinExA) y ensayos
5 inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés). Por ejemplo, en algunas modalidades, puede usarse un instrumento BIAcore® para determinar la cinética de unión y las constantes de un complejo entre la proteína de fusión TACI-Fc y APRIL, BAFF o FcRn usando
10 el análisis de resonancia de plasmón de superficie. La SPR mide los cambios en la concentración de moléculas en la superficie de un sensor a medida que las moléculas se unen o se disocian de la superficie. El cambio en la señal de SPR es directamente proporcional al cambio en la
15 concentración de masa cerca de la superficie, lo que permite de esta manera la medición de la cinética de unión entre dos moléculas. La constante de disociación para el complejo puede determinarse al monitorear los cambios en el índice de refracción con respecto al tiempo
20 a medida que se pasa el regulador sobre el chip. Otros ensayos adecuados para medir la unión de una proteína a otra incluyen, por ejemplo, inmunoensayos, tales como ensayos de ELISA, radioinmunoensayos (RIA, por sus siglas en inglés), o determinación de unión al monitorear el
25 cambio en las propiedades espectroscópicas u ópticas de

las proteínas a través de fluorescencia, absorción UV, dicroísmo circular, o resonancia magnética nuclear (RMN).

Las proteínas de fusión TACI-Fc también pueden evaluarse en cualquiera de una variedad de ensayos bien conocidos en la técnica para evaluar la modulación de la actividad de las células B. Uno de tales ensayos es un ensayo de proliferación celular. Las células se cultivan en presencia o ausencia de un compuesto de prueba (p. ej., proteína de fusión TACI-Fc), y la proliferación celular se detecta, por ejemplo., al medir la incorporación de timidina tritiada o mediante ensayo colorimétrico basado en la descomposición metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT). Un formato de ensayo alternativo usa células que se diseñan genéticamente además para expresar un gen reportero. El gen reportero está ligado a un elemento promotor que responde a la vía ligada al receptor, y el ensayo detecta la activación de la transcripción del gen reportero. Numerosos genes reporteros que se evalúan fácilmente en extractos celulares son conocidos en la técnica, por ejemplo, la E. coli lacZ, cloroanfenicol acetil transferasa (CAT) y el elemento de respuesta sérica (SRE, por sus siglas en inglés). Un gen reportero ilustrativo es un gen de luciferasa. La expresión del gen de luciferasa se detecta

por luminiscencia usando métodos y kits bien conocidos en la técnica.

Las proteínas de fusión TACI-Fc pueden caracterizarse por la capacidad de inhibir la estimulación de células B humanas mediante APRIL o BAFF soluble, como lo describen Gross et al, publicación internacional núm. WO00/40716. Brevemente, las células B humanas se aíslan de células mononucleares de sangre periférica, tales como el uso de la separación de perlas magnéticas CD19 (p. ej., Miltenyi Biotec Auburn, Calif). Las células B purificadas pueden incubarse bajo condiciones de estimulación, p. ej., en presencia de APRIL soluble y, además, en presencia de concentración titulada de proteína de fusión TACI-Fc. Las células B pueden etiquetarse con un tinte de proliferación o pueden etiquetarse con 1 μ Ci³H-timidina para medir la proliferación. El número de células B puede determinarse con el tiempo.

Se pueden elaborar líneas celulares reporteras que expresan un gen reportero bajo el control operable de un factor de transcripción, tal como NF- κ B, NFAT-1 y AP-1, que expresen TACI o BCMA. Por ejemplo, Jurkat y otras líneas celulares de linfoma B pueden usarse como células reporteras adecuadas. La incubación de estas células con ligandos BAFF o APRIL solubles se señalan a través de los genes reporteros en estos constructos. Se puede evaluar

el efecto de proporcionar las proteínas de fusión TACI-Fc para modular esta señalización.

Por ejemplo, en algunas modalidades, pueden usarse modelos de ratón para el síndrome de Sjogren. La enfermedad del síndrome de Sjogren, así como un inicio acelerado de diabetes, puede inducirse en ratones hembra diabéticos no obesos (NOD) propensos a la diabetes usando dosificación repetida con anticuerpo antirratón (m) PD-L1, basada en una versión modificada de un protocolo publicado por Zhou et al., 2016; Sci. Rep. 6, 39105. A partir de las 6 semanas de edad, los ratones son inyectados vía intraperitoneal (IP) en los días de estudio 0, 2, 4 y 6 con 100 µg de anticuerpo anti-PD-L1 y son tratados en varios días con proteínas de fusión TACI-Fc proporcionadas. Se incluyen ratones sin tratamiento previo como controles para los análisis de puntos finales. Típicamente, todos los ratones se eliminan el día de estudio 10 y se recolectan las glándulas submandibulares (SMG, por sus siglas en inglés) y el páncreas de cada ratón para su evaluación histopatológica para evaluar los signos y la gravedad de la sialadenitis y la insulitis. Los niveles de glucosa en sangre pueden medirse en varios días.

En algunas modalidades, puede usarse un modelo de artritis inducida por colágeno (CIA, por sus siglas en inglés) en el que los ratones desarrollan artritis

inflamatoria crónica que se parece mucho a la artritis reumatoide (AR) humana. Dado que la CIA comparte características inmunológicas y patológicas similares a la AR, esto la convierte en un modelo ideal para el
5 cribado de composiciones antiinflamatorias humanas potenciales. Otra ventaja en el uso del modelo de CIA es que se conocen los mecanismos de patogénesis. Se han identificado los epítomos de células T y B en colágeno tipo II, y se han determinado diversos parámetros
10 inmunológicos (hipersensibilidad retardada y anticuerpo anticolágeno) e inflamatorios (citocinas, quimiocinas y enzimas degradantes de matriz) que se relacionan con la artritis inmunomediadora y pueden usarse para evaluar la eficacia del compuesto de prueba en los modelos (Wooley,
15 Curr. Opin. Rheum. 3:407-20, 1999; Williams et al., Immunol. 89:9784-788, 1992; Myers et al., Life Sci. 61:1861-78, 1997; y Wang et al., Immunol. 92:8955-959, 1995). Se puede evaluar la administración de proteínas de fusión TACI-Fc para mejorar los síntomas y las
20 alteraciones en el curso de una enfermedad o enfermedad.

Los estudios farmacocinéticos pueden usarse en asociación con las proteínas de fusión TACI-Fc radioetiquetadas para determinar la distribución y vida media de tales polipéptidos in vivo.

25 La presente invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos que no deben

interpretarse además como limitantes. La lista de secuencias, figuras y todas las referencias, patentes y solicitudes de patentes publicadas citadas a lo largo de esta solicitud se incorporan expresamente en la presente
5 como referencia. Las listas de las secuencias referenciadas a lo largo de la aplicación se describen en los siguientes Ejemplos y en las Figuras 20A-20K.

Ejemplos

10

Ejemplo 1: Ingeniería del dominio extracelular de TACI para potenciar la unión dependiente del pH de las citoquinas BAFF y APRIL

15 El activador transmembrana o receptor del interactor de ligando de ciclofilina modulador de calcio (TACI) tiene una alta afinidad a las citocinas BAFF y APRIL. Se ha demostrado que el dominio extracelular de TACI bloquea BAFF y ARPIL como una fusión Fc, el bloqueo
20 de BAFF y APRIL previene la activación de los receptores en esta familia (Merrill et al. (2018) Arthritis & Rheumatology vol. 70, núm. 2, págs. 266-276).

Guiado por la estructura cristalina publicada del dominio CRD2 rico en cisteína TACI en combinación con
25 APRIL de ratón (PDB: 1XU1), se generaron mutantes de histidina de adición simple (fusionados a un dominio Fc

con etiqueta Flag C-terminal) para reemplazar secuencialmente todos los residuos sin cisteína en o cerca de la interfaz de unión formada con APRIL (Figura 1). Estos mutantes de histidina se expresaron a partir de pCDNA3.1 (que contiene una secuencia señal) en células Expi293 y se purificaron de los sobrenadantes celulares usando columnas de afinidad de 1 ml HiTraP MabSelect SuRe en un sistema de purificación AKTApure 25 M2 con elución de proteínas en 100 mM de citrato con pH 3,2.

La dependencia del pH a la unión de los mutantes de histidina de TACI a BAFF y APRIL se determinó usando la resonancia de plasmón de superficie (SPR) (instrumento Biacore™ T200) como se muestra en las Figuras 2A-2B. Después de inmovilizar el BAFF biotinilado (Figura 2A) o APRIL biotinilado (Figura 2B) a un sensor de estreptavidina, la BAFF-biotina y APRIL-biotina fluyeron sobre 100 nM en PBS + 0,05 % de Tween® a un pH 7,4. Después, se midieron las tasas de disociación a un pH 7,4, después se inyectó PBS + 0,05 % de Tween®20 a un pH 6,0, y las nuevas tasas de disociación se midieron como se muestra en la Figura 2. Al comparar las tasas relativas de disociación a un pH 6,0 a un pH 7,4 (Figura 2), se identificaron las variantes más prometedoras TACI-DR1/DR2 Fc de histidina de adición simple (con disociación relativamente más rápida a un pH 6,0) como se resume en la Tabla 1. Las variantes de TACI se nombran

basándose en la posición de aminoácidos en la secuencia nativa de aminoácidos de TACI (sec. con núm. de ident.: 39; secuencia de referencia NCBI NP_036584).

Tabla 1. La unión de SPR resulta de mutantes de TACI sustituidos con histidina simple a un pH 6,0 y 7,4.

ID. de muestra	Mutación His	BAFF, tasa de desactivación, pH 7,4	BAFF, tasa de desactivación, pH 6,0	Cambio de veces	APRIL, tasa de desactivación, pH 7,4	APRIL, tasa de desactivación, pH 6,0	Cambio de veces
TPP--	Parental	-0,0183	-0,0269	1,47	-0,014	-0,06151	4,39
TPP-4287	K77H	-0,0118	-0,0214	1,81	-0,009602	-0,03442	3,58
TPP-4288	F78H	-0,0219	-0,0544	2,49	-0,01385	-0,05775	4,17
TPP-4289	Y89H	-0,0132	-0,0391	2,97	-0,01037	-0,0308	2,97
TPP-4290	D80H	-0,027	-0,07	2,60	-0,02558	-0,0559	2,18
TPP-4291	L82H	-0,006	-0,1106	18,32	-0,007817	-0,06348	8,12
TPP-4292	L83H	-0,0138	-0,0586	4,25	-0,01175	-0,03185	2,71
TPP-4293	R84H	-0,0197	-0,0275	1,40	-0,01094	-0,0364	3,33
TPP-4294	D85H	-0,0313	-0,0575	1,84	-0,03452	-0,05319	1,54
TPP-4295	I87H	-0,0202	-0,0515	2,54	-0,01377	-0,02647	1,92
TPP-4296	S88H	-0,0332	-0,0739	2,22	-0,02895	-0,04626	1,60
TPP-4297	S91H	-0,0213	-0,0505	2,37	-0,01564	-0,03406	2,18
TPP-4298	I92H	-0,0155	-0,0659	4,25	-0,01403	-0,04342	3,09
TPP-4299	Q95H	-0,0247	-0,0798	3,23	-0,02726	-0,06321	2,32
TPP-4300	P97H	-0,0224	-0,0498	2,22	-0,0168	-0,03858	2,30
TPP-4301	K98H	-0,0149	-0,0201	1,34	-0,008894	-0,01039	1,17
TPP-4302	Q99H	-0,0272	-0,0454	1,67	-0,02152	-0,04155	1,93
TPP-4303	A101H	-0,0194	-0,0467	2,41	-0,01843	-0,03889	2,11
TPP-4313	G94H	-0,0201	-0,0451	2,24	-0,01471	-0,03796	2,58

A continuación, se diseñó un panel de segunda ronda de variantes TACI-Fc de histidina de adición doble y triple basado en la combinación de las mutaciones más efectivas identificadas en la primera ronda. Estas nuevas variantes se evaluaron análogamente para la unión a BAFF mediante el mismo método Biacore como se describió anteriormente para determinar la tasa de desactivación relativa a un pH 6,0 y pH 7,4, así como la estabilidad de unión general (Figura 3).

Tabla 2. La unión de SPR resulta de mutantes de TACI sustituidos con histidina múltiple a un pH 6,0 y 7,4.

ID. de muestra	Mutaciones His	Tasa de desactivación, pH 7,4	Tasa de desactivación, pH 6,0	Cambio de veces	Estabilidad de unión
TPP-4543	D80H, L82H	-0,009351	-0,03705	3,96	24,87
TPP-4549	F78H, D80H	-0,002507	-0,03875	15,46	27,72
TPP-4554	D80H, L83H	-0,006068	-0,0262	4,32	20,27
TPP-4555	D80H, I87H	-0,009252	-0,03223	3,48	21,10
TPP-4563	F78H, D80H, L82H	0,002041	-0,03224	15,80	27,44
TPP-4566	Y79H, D80H, L82H	-8,80E-06	-0,04192	4764,18	27,98
TPP-4568	D80H, L82H, L83H	-0,003081	-0,03421	11,10	25,27
TPP-4577	Y79H, D80H, L83H	0,0009488	-0,03859	40,67	26,49
TPP-4578	D80H, L83H, I87H	0,0009337	-0,0414	44,34	23,53

Todo el panel de variantes TACI-Fc de histidina de adición simple, doble y triple en un ensayo ELISA para determinar la dependencia del pH de la unión de BAFF. El BAFF

biotinilado (1 µg/ml en PBST 1X) se inmovilizó en placas de 96 pocillos prebloqueadas recubiertas con estreptavidina. Los pocillos se lavaron 3 veces y, después, se aplicaron diluciones en serie del panel de TACI-Fc (0,003 a 10 µg/ml en PBST 1X a ya sea un pH 5,5 o 7,4) durante 45 min. Los pocillos se lavaron 3 veces, se aplicó un anticuerpo de ratón anti-FLAG M2 conjugado con HRP (diluido 1:20.000 en PBST 1X), los pocillos se lavaron 3 veces, y se añadió la solución de sustrato TMB y, después, se inactivó con ácido sulfúrico 2N después de 15 minutos antes de que se leyera la absorbancia a 450 nm en un lector de placas Spectramax i3x.

La Tabla 3 resume los cambios relativos en la afinidad de unión a BAFF observada en comparación con el WT a un pH 5,5 y 7,4 para los mutantes His según lo determinado por el ensayo ELISA. Un mayor cambio neto de dependencia del pH indica una mayor diferencia en la afinidad de un pH 7,4 a pH 5,5 (afinidad más débil a un pH 5,5). Estos resultados demuestran una afinidad reducida de las proteínas de fusión TACI-Ig Fc con BAFF bajo las condiciones de pH bajo (*p. ej.*, pH 5,5) con una afinidad más alta bajo condiciones de pH neutro (*p. ej.*, pH 7,4). Los resultados de este análisis permitieron la identificación de varias variantes prometedoras TACI-Fc de histidina de adición doble y triple para una caracterización adicional.

Tabla 3: Ensayo de unión ELISA de mutantes de sustitución de histidina de TACI a un pH 5,5 y 7,4.

ID núm.	Variante TACI_D1/D2	Disminución de veces en la afinidad a un pH 7,4 (órdenes de magnitud)	Disminución de veces en la afinidad a un pH 5,5 (órdenes de magnitud)	Cambio neto de dependencia del pH
TPP-4286	WT TACI-D2	--	--	1
TPP-4287	K77H	1	2,2	2,2
TPP-4288	F78H	2,2	5	2,2
TPP-4289	Y79H	2,2	5	2,2
TPP-4290	D80H	5	25	5
TPP-4291	L82H	5	11	2,2
TPP-4292	L83H	1	5	5
TPP-4293	R84H	1	2,2	2,2
TPP-4294	D85H	1	1	1
TPP-4295	I87H	1	1	1
TPP-4296	S88H	1	1	1
TPP-4297	S91H	1	1	1
TPP-4298	I92H	1	1	1
TPP-4299	Q95H	1	1	1
TPP-4300	P97H	2,2	2,2	1
TPP-4301	K98H	1	1	1
TPP-4302	Q99H	1	1	1
TPP-4303	A101H	1	1	1
TPP-4313	G94H	2,2	5	2,2
TPP-4541	F78H, L82H	25	280	11
TPP-4542	Y79H, L82H	25	280	11
TPP-4543	D80H, L82H	5	25	5
TPP-4544	L82H, L83H	25	280	11
TPP-4545	L82H, I87H	11	125	11
TPP-4546	L82H, I92H	11	280	25
TPP-4547	L82H, Q95H	11	280	25
TPP-4548	F78H, Y79H	11	25	2,2
TPP-4549	F78H, D80H	5	25	5
TPP-4550	F78H, L83H	11	56	5
TPP-4551	F78H, I87H	5	25	5

TPP-4552	Y79H, D80H	2,2	5	2,2
TPP-4553	Y79H, L83H	5	25	5
TPP-4554	D80H, L83H	5	25	5
TPP-4555	D80H, I87H	56	280	5
TPP-4556	L83H, I87H	5	56	11
TPP-4557	I87H, I92H	2,2	11	5
TPP-4558	S88H, S91H	1	2,2	2,2
TPP-4559	S91H, I92H	1	2,2	2,2
TPP-4560	I92H, Q95H	1	2,2	2,2
TPP-4561	G94H, Q95H	2,2	5	2,2
TPP-4562	F78H, Y79H, L82H	280	625	2,2
TPP-4563	F78H, D80H, L82H	5	25	5
TPP-4564	F78H, L82H, L83H	280	280	1
TPP-4565	F78H, L82H, I87H	280	280	1
TPP-4566	Y79H, D80H, L82H	5	25	5
TPP-4567	Y79H, L82H, L83H	280	280	1
TPP-4568	D80H, L82H, L83H	5	25	5
TPP-4569	D80H, L82H, I87H	5	25	5
TPP-4570	L82H, L83H, I87H	125	625	5
TPP-4571	L82H, I87H, I92H	125	625	5
TPP-4572	L82H, S88H, S91H	25	280	11
TPP-4573	L82H, S91H, I92H	125	625	5
TPP-4574	L82H, I92H, Q95H	25	125	5
TPP-4575	L82H, G94H, Q95H	25	125	5
TPP-4576	F78H, Y79H, L83H	125	625	5
TPP-4577	Y79H, D80H, L83H	5	25	5
TPP-4578	D80H, L83H, I87H	5	11	2,2
TPP-4579	L83H, I87H, I92H	56	625	11
TPP-4580	Y79H, L82H, Q95H	56	625	11
TPP-4581	Y79H, L82H, I92H	125	625	5

Ejemplo 2: Las proteínas de fusión TACI-FC se unen a BAFF y APRIL de manera dependiente del pH

Las proteínas de fusión compuestas por regiones TACI y Fc de Ig se diseñaron usando el software Geneious (Biomatters

LLC), se enviaron a GeneArt para optimización de codones, se clonaron en pCDNA3.1 (con una secuencia de señal incluida) usando enzimas de restricción HindIII y ApaI, se expresaron usando sistemas de expresión celular ExpiCHO-S o Expi293F (Thermo Fisher Scientific), y se purificaron en un sistema de purificación AKTApure 25 M2 (Cytiva) mediante cromatografía de afinidad de proteína A MabSelect SuRe (Cytiva) con una elución de citrato a un pH 3,8, seguida de cromatografía de exclusión por tamaño en PBS en una columna empaquetada con resina Superdex 200 pg (Cytiva).

Análisis de unión de octetos

La interferometría de biocapas se realizó usando un sistema Octet RED96e (ForteBio) para examinar la cinética de la proteína de fusión TACI-Fc que se une a los ligandos TACI, BAFF y APRIL, así como que se une al receptor Fc neonatal (FcRn) como se describe en el Ejemplo 3 más abajo. En este ensayo, la adición de masa proteica a un biosensor se detecta mediante interferometría de biocapas (BLI, por sus siglas en inglés) como una deflexión o aumento en la señal detectable observada en un sensorgrama. Donde no hay cambio de masa, se observa un valor plano o valor inicial, como se muestra solo en las etapas del regulador. Además, cuando las proteínas se disocian del biosensor, se observa una pendiente negativa en

el sensorgrama. Un sensorgrama puede representar las siguientes fases temporales en un ensayo ilustrativo mostrado en la Figura 4: (1) valor inicial (solo regulador); (2) analito biotinilado de carga; (3) valor inicial (solo regulador); (4) asociación de proteínas de fusión TACI-Fc; y (5) disociación de proteínas de fusión TACI-Fc.

Para demostrar la unión de una proteína de fusión TACI-Fc ilustrativa (es decir, TPP-6269, sec. con núm. de ident.: 22) a BAFF, se diluyó TPP-6269 (20 µg/ml) en solución salina regulada con fosfato (PBS) pH 6,0 o 7,4 y se analizó para unirse a BAFF biotinilado humano (Biotechne, catálogo núm. 7537-BF-025/CF) cargado en biosensores de estreptavidina (Sartorius, catálogo núm. 18-5019) usando un sistema Octet RED96e (ForteBio). Los ensayos de control negativo se llevaron a cabo a un pH 6,0 y pH 7,4 usando solo el regulador PBS. Los resultados de este experimento de unión se muestran en el sensorgrama representado en la Figura 5.

El sensorgrama en la Figura 5 representa las últimas tres fases que se muestran en la Figura 4, que incluyen solo el valor inicial del regulador, la fase de asociación TACI-Fc/BAFF, y la fase de disociación TACI-Fc/BAFF. De estas trazas se determinaron los perfiles de unión de la tasa de activación y la tasa de desactivación de las proteínas de fusión TACI-Fc variantes al BAFF.

La inhibición de BAFF por TPP-6269 se evaluó además en un ensayo funcional llevado a cabo en una línea celular HEK293 reportera de BCMA/factor nuclear kappa B (NF- κ B)-luciferasa. Esta línea celular incluye un ADNc de BCMA humano de longitud completa integrado de manera estable (Genbank núm. NM_001192) bajo el control de un promotor de CMV (Amsbio Llc) y reportero en el que la expresión de un gen de luciferasa de luciérnaga (en unidades relativas de luz (RLU, por sus siglas en inglés)) está bajo el control de cuatro copias de un elemento de respuesta a NF- κ B corriente arriba de un promotor mínimo. En este ensayo, la unión del ligando BAFF a BCMA activa la vía de señalización de NF- κ B, lo que conlleva a la expresión del reportero de luciferasa controlado por NF- κ B. La inhibición de la unión de BAFF mediante la proteína de fusión TACI-Fc inhibe la señalización de NF- κ B, que se refleja en una señal de luciferasa reducida (es decir, RLU).

TPP-6269 (sec. con núm. de ident.: 25) contiene una porción de dominio extracelular de TACI que consiste en una región DR1-DR2 que carece de una porción N-terminal de DR1 y una porción C-terminal de DR2. Para comparación, TPP-6269 se evaluó contra una proteína de fusión TACI-Fc (TPP-4217) que contiene un dominio extracelular de TACI de longitud completa. Los resultados de este ensayo se muestran en la

Figura 6. En este ensayo, se descubrió que TPP-6269 inhibe completamente la expresión de luciferasa a una concentración de 5,3 nM y a un nivel mayor de inhibición en comparación con TPP-4217. Como se esperaba, una proteína Fc de control sin un dominio TACI no mostró inhibición.

Similarmente, se descubrió que las variantes de TACI-Fc adicionales exhiben una potente inhibición de BAFF que se une a las células BCMA-HEK293 (Figura 7). Además, en un ensayo funcional análogo que usa la línea celular HEK293 reportera de BCMA/NF- κ B-luciferasa con APRIL (Biotechne, catálogo núm. 5860-AP/CF) como el ligando BCMA, se descubrió que las variantes TACI TPP-4286 (sec. con núm. de ident.:57) y TPP-4291 (sec. con núm. de ident.: 58) exhiben una inhibición potente de la activación de BCMA mediada por APRIL, como se muestra en la Figura 8.

Ejemplo 3: Las variantes de secuencia de fragmentos
cristalizables (Fc) de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humana mejoran
la unión al receptor Fc neonatal

Para investigar si se pudieran diseñar genéticamente perfiles de unión mejorados y propiedades dependientes del pH, se diseñaron genéticamente y se purificaron una serie de proteínas de fusión TACI-Fc que comprenden regiones Fc quiméricas ensambladas a partir de

diferentes porciones de la subclase de IgG1/IgG2/IgG4, esencialmente como se describió en el Ejemplo 2. Las proteínas de fusión de la subclase de IgG quimérica de TACI-Fc resultantes que comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en las sec. con núms. de ident.: 20 y 39-45 se diluyeron en solución salina regulada con fosfato (PBS) pH 6,0 o 7,4 y se analizaron para unirse a FcRn biotinilado humano (Biotechne, catálogo núm. 8639-FC) cargado en biosensores de estreptavidina (Sartorius, catálogo núm. 18-5019) esencialmente como se describió en el Ejemplo 2. Los ensayos de control negativo se llevaron a cabo a un pH 6,0 y pH 7,4 usando solo el regulador PBS.

Estas proteínas de fusión Fc quiméricas variantes se evaluaron similarmente por la unión y la dependencia del pH al FcRn neonatal mediante interferometría de biocapas usando el sistema Octet Red96 (ForteBio) como se describió en el Ejemplo 2. Los resultados de estos ensayos se muestran en las Figuras 9A-9H. Los ensayos adicionales emplearon resonancia de plasmón de superficie (SPR/Biacore). Al igual que los ensayos en la Figura 5, los sensorgramas en las Figuras 9A-9G representan solo la fase de valor inicial de regulador, la fase de asociación de la variante de Fc y la fase de disociación de Fc. De estos datos, pueden determinarse los perfiles de unión de la

tasa de activación y la tasa de desactivación de las proteínas de fusión TACI-Fc variantes al FcRn.

Como se muestra en las Figuras 9A-9H, las variantes de fusión TACI-Fc demostraron diversos niveles de unión a FcRn con diferencias observables en los perfiles de la tasa de activación y la tasa de desactivación a un pH 6,0 y pH 7,4. Por ejemplo, la fusión de diferentes regiones de la subclase de IgG1/IgG2/IgG4 con mutaciones M252Y, S254T y T256E exhibió una unión mejorada como se ilustra mediante TPP-5260 (sec. con núm. de ident.: 50) en comparación con TPP-5272 (sec. con núm. de ident.: 51) como se muestra en las Figuras 9A y 9D, respectivamente. Un ejemplo que demuestra esta observación para una variante de la subclase de Fc de IgG1/IgG4 Fc se ilustra mediante TPP-5262 (sec. con núm. de ident.: 49), que se descubrió exhibía una mayor tasa de activación y amplitud a un pH 7,4 en comparación con TPP-5274 (sec. con núm. de ident.: 45) (ver las Figuras 9B y 9F, respectivamente).

Las variantes TACI-Fc en las Figuras 9A-9H ilustran tasas de desactivación más lentas al FcRn humano cuando las mutaciones M252Y, S254T y T256E están presentes en las diferentes proteínas de fusión de la subclase híbrida. TPP-6269 (sec. con núm. de ident.: 25), que contiene un dominio Fc de IgG1/IgG4 híbrida en combinación

con las mutaciones L234F, L235E, M252Y, S254T, T256E y N434H, exhibió una dependencia excepcional del pH con una disminución observada en la tasa de activación y la amplitud total de unión y una tasa de desactivación más rápida a un pH 7,4 en comparación con pH 6,0 (Figura 9H) como lo confirma la resonancia de plasmón de superficie (SPR/Biacore) en la Figura 13 del Ejemplo 4.

Ejemplo 4: Mutagénesis diseñada racionalmente de Fc de IgG1/IgG4 humana para mejorar la unión dependiente del pH al FcRn

Guiados por la estructura cristalina publicada del complejo FcRn:Fc (PDB: 4N0U; Figura 10), se diseñó una serie de mutantes Fc de IgG1/4 de histidina de sustitución simple y doble (a medida que Fc TACI-D1/D2 se fusiona con etiquetas His C-terminales) para dirigirse a la interfaz con FcRn, especialmente a los residuos ácidos E115, E116, D130 y E133 en el FcRn humano procesado (E138, E139, D253, E256 en UniprotKB/Swiss-Prot: P55899.1). Las mutaciones seleccionadas se introdujeron en constructos que contenían una región de dominio TACI D1/D2, una región Fc de IgG1/IgG4 quimérica, y una etiqueta His 6x. Estas proteínas se expresaron a partir de pCDNA3.1 en células Expi293 y se purificaron a partir de sobrenadantes celulares usando las columnas de afinidad de

níquel de 1 ml HiStrap HP en un sistema de purificación AKTApure 25 M2 usando un gradiente de imidazol para separar proteínas monoméricas de agregados.

El efecto relativo de las mutaciones sobre la unión de FcRn a un pH 7,4 y 6,0 se evaluó usando el sistema Octet. Las puntas de estreptavidina se remojaron en PBS durante 15 minutos, se registró un valor inicial de 60 segundos, se cargó FcRn biotinilado (10 µg/ml en PBS) durante 200 segundos, después de una inmersión de 30 segundos en PBS las variantes Fc (400 nM en PBS) se asociaron durante 120 segundos seguido de una disociación de 120 segundos, con todas las etapas realizadas a un pH 6,0 o 7,4.

Las Figuras 11A-11D muestran trazas de octeto que representan la cinética de unión de variantes de TACI-Fc de histidina de adición simple y doble en comparación con TPP-5274 “WT” (sec. con núm. de ident.: 45), que contiene un Fc híbrido de IgG1/IgG4 parental sin las mutaciones añadidas en las variantes. Las trazas de octeto en las Figuras 11A-11B se llevaron a cabo a un pH 7,4; las trazas de octeto en las Figuras 11C-11D se llevaron a cabo a un pH 6,0. Los resultados de este estudio identificaron una variante N434H novedosa, TPP-5721 (sec. con núm. de ident.: 60) a medida que se mejora la afinidad de unión a FcRn de una manera dependiente del pH (ver las Figuras 11A, 11C).

Para investigar además las propiedades de unión dependientes del pH mejoradas conferidas por la mutación N434H, se llevaron a cabo estudios de unión adicionales con el sistema Octet RED96e (ForteBio) usando TPP-5957 (sec. con núm. de ident.: 30) y TPP-5958 (sec. con núm. de ident.: 31) a un pH 6,0 (Figura 12A) y pH 7,4 (Figura 12B). Tanto TPP-5957 como TPP-5958 contienen las sustituciones de aminoácidos, L234F, L235E, M252Y, S254T y T256E. Sin embargo, TPP-5958 incluye además la mutación N434H. Los resultados de esta comparación son consistentes con la mutación N434H que confiere propiedades de unión dependientes del pH mejoradas.

Las propiedades de unión de las variantes de TACI-Fc se evaluaron además mediante el análisis SPR/ Biacore. En estos experimentos, las variantes de TACI-Fc se inmovilizaron directamente en la superficie de un chip CM5 expuesto a inyecciones de FcRn (Biotechne, catálogo núm. 8639-FC) en diversas concentraciones a un pH 7,4 y pH 6,0 usando un sistema Biacore T200. Las superficies se regeneraron con 50 mM de NaOH y se determinaron los parámetros cinéticos de unión. Todos los análisis Biacore se realizaron siguiendo WPD-PC-050-02D, "Análisis cinético de interacciones proteína-proteína con inmovilización directa de ligando usando resonancia de plasmón de superficie". Los datos de pH 7,4 y pH 6,0 se procesaron de acuerdo con el

protocolo Biacore usando el software de evaluación Biacore con doble referenciación.

En una modalidad ilustrativa, TPP-6269 se evaluó mediante SPR/Biacore. TPP-6269 (sec. con núm. de ident.: 25) se diseñó genéticamente con una región Fc de IgG1/ IgG4 híbrida con las mutaciones antes mencionadas en TPP-5958 (L234F, L235E, M252Y, S254T, T256E y N434H). A partir de este análisis, se descubrió que TPP-6269 exhibía una unión excepcional dependiente del pH al FcRn humano mediante SPR/Biacore (Figuras 13A, 13B). A un pH de 7,4 en solución salina regulada con fosfato (PBS), TPP-6269 se unió al FcRn a una afinidad de unión (K_D) de 928 nM a un pH 7,4 y una afinidad de unión (K_D) de 3,82 nM a un pH 6,0, un diferencial de 244 veces (Figura 13C).

ejemplo 5: unión simultánea de variantes de TACI-Fc a una línea celular que expresa FcRn humano y BAFF por citometría de flujo

Se llevó a cabo un análisis de citometría de flujo para determinar si las variantes de TACI-Fc pueden unirse simultáneamente a BAFF (Biotechne, catálogo núm. 7537-BF-025/CF, biotinilado) y FcRn humano usando una línea celular estable de FcRn humano CHO-K1 (Genscript, cat. núm. M00603). Las células CHO-K1/FcRn se colocaron en placas a 100.000

células por pocillo en PBS (pH 6,0), se combinaron con 1 μ M de variantes de TACI-Fc en 0,5 % de BSA (pH 6,0), y se incubaron durante 60 minutos a 4 °C. Las células se lavaron 3x con 100 μ l 0,5 % de BSA (pH 6,0) y se añadió 10 μ g/ml de BAFF-biotina en 0,5 % de BSA (pH 6,0) a las células que se incubaron después durante 60 minutos a 4 °C. Las células se lavaron 3x y se añadió 5 μ g/ml de 0,5 % de BSA (pH 6,0) a las células que se incubaron después durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron, se etiquetaron con 5 μ g/ml de Streptavidin-Alexa-Fluor™ 488 (Invitrogen, catálogo núm. 532354) en 0,5 % de BSA (pH 6,0), y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron 3x, se resuspendieron en 100 μ l 0,5 % de BSA (pH 6,0) y se analizaron usando un citómetro de flujo LSRII Fortessa (BD, configuración personalizada).

En este ensayo, una intensidad media de fluorescencia (MFI, por sus siglas en inglés) positiva mayor que el BAFF etiquetado demuestra la unión simultánea de las variantes de TACI-Fc al BAFF así como FcRn en las células. La Figura 14A muestra un gráfico que resume la relación de intensidad media de fluorescencia (MFI), consistente con la unión simultánea del dominio TACI tanto al BAFF como FcRn etiquetados en una línea celular que expresa FcRn humano. Las Figuras 14B-14D son histogramas que muestran la unión

simultánea de TPP-5954 (Figura 14B), TPP-5957 (Figura 14C) y TPP-5958 (Figura 14D) a la unión de FcRn y BAFF en comparación con el BAFF etiquetado (es decir, BAFF-biotina + Streptavidin-Alexa-Fluor™ 488 (SA-488)) que se une solo a las variantes de TACI-Fc.

Ejemplo 6: Las variantes TACI-Fc bloquean la unión de IgG a una línea celular que expresa FcRn humano

Un análisis de citometría de flujo se empleó para examinar la capacidad de las variantes de TACI-Fc para bloquear la unión de IgG1 a FcRn en una línea celular de FcRn CHO-K1/hU. Brevemente, las células de FcRn HO-K1/hu se colocaron en placas a 100.000 células por pocillo en PBS (pH 6,0), se combinaron con 1 μ M de variantes de Fc de FcRn en 0,5 % de BSA (pH 6,0) y se incubaron después durante 60 minutos a 4 °C. Las células se lavaron 3x con 100 μ l 0,5 % de BSA (pH 6,0). Se añadió IgG1 humana etiquetada con ficoeritrina (IgG1-PE, Southern Biotech, catálogo núm. 0151K-09) a 100 μ g/ml en 0,5 % de BSA (pH 6,0) en diversas cantidades y se incubó durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron 2x, se resuspendieron en 100 μ l 0,5 % de BSA (pH 6,0) y se analizaron usando un citómetro de flujo LSRII Fortessa (BD, configuración personalizada).

Las células CHO-K1 que expresan FcRn tratadas con IgG exhibieron un nivel de referencia de fluorescencia (MFI)

que refleja la unión de IgG1-PE a FcRn celular. Sin embargo, como se muestra en las Figuras 15A y 15B, cuando las proteínas de fusión TACI-Fc se titularon en los cultivos celulares a una concentración creciente, se redujeron (es decir, superaron) la señal producida a partir de la unión de IgG1-PE a FcRn. La reducción de señal de IgG1-PE se grafica como una relación de intensidad media de fluorescencia (MFI) con señal de fondo (Figura 15A) o MFI sin procesar (Figura 15B). Los diferentes perfiles de unión de las variantes de TACI-Fc a FcRn en la Figura 15B muestran que las afinidades más débiles con FcRn se trasladan en potencias más bajas en este ensayo de competencia de IgG1 humana basado en células.

Los resultados en las Figuras 15A y 15B confirman que las proteínas de fusión TACI-Fc pueden bloquear la unión de IgG a una línea celular que expresa FcRn humano.

Ejemplo 7: La secuencia enlazadora entre los dominios TACI y Fc aumenta la estabilidad de las proteínas

Para examinar si la inclusión de ciertos aminoácidos o péptidos puede aumentar el punto isoeléctrico de las proteínas de fusión TACI-Fc puede aumentar la estabilidad de la proteína, se insertó un enlazador polipeptídico de punto isoeléctrico alto (pI) entre el dominio TACI y el dominio Fc de IgG y se comparó con otras variantes sin el enlazador. Entre

las variantes de TACI-Fc evaluadas que se identifican en las Figuras 16A-16B, TPP-5776 (sec. con núm. de ident.: 28) y TPP-5780 (sec. con núm. de ident.: 35) incluyen el enlazador de pI alto GGRSSKARSSSRGGGRGG (“enlazador PI”, sec. con núm. de ident.: 8). TPP-5776 incluye además las mutaciones M252Y, S254T, y T256E. TPP-5777 (sec. con núm. de ident.: 71) y TPP-5779 (sec. con núm. de ident.: 36) no contienen el enlazador PI, mientras que TPP-5791 (sec. con núm. de ident.: 34) contiene el enlazador (AGGGG)₃ (sec. con núm. de ident.: 7).

Se realizaron pruebas de estabilidad acelerada sobre las proteínas de fusión TACI-Fc anteriores al incubarlas a 37 °C durante un total de 3 semanas. Se realizó cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) usando un regulador de fase móvil de 0,15 M de regulador de fosfato de sodio a un pH 7,0 en fusiones TACI-Fc en columna de 20 µg con una velocidad de flujo de 0,7 ml/min a una longitud de onda de 280 nm. Como se muestra en las Figuras 16A-16B, cuando se incubaron a 37 °C durante un total de 3 semanas, las proteínas de fusión TPP-5776 (sec. con núm. de ident.: 28) y TPP-5780 (sec. con núm. de ident.: 35) que contenían el enlazador de punto isoeléctrico alto (PI) exhibieron mayor porcentaje de monómeros y una agregación reducida con el tiempo en comparación con TPP-5777 (sec. con núm. de ident.: 71) y TPP-5779 (sec. con núm. de ident.: 36:), que

no contienen el enlazador PI. Se observó además que la inclusión del enlazador PI dio como resultado una menor agregación durante el proceso de purificación.

Ejemplo 8: La unión mejorada a FcRn con bloqueo de BAFF y APRIL reduce aditivamente los niveles de inmunoglobulina *in vitro* e *in vivo*

Se evaluó TPP-6269 (sec. con núm. de ident.: 25) por su capacidad de reducir las IgG, las IgM y células B maduras después del tratamiento *in vivo* de ratones con hemocianina de lapa ojo de cerradura (KLH). La Figura 17A muestra el diseño de estudio *in vivo* de este experimento. El día 0, los ratones se inmunizaron por vía subcutánea con 0,5 mg de KLH en 0,1 ml de PBS. Los ratones de control recibieron solo PBS. Los días 1-7, se administró por vía intravenosa TPP-6269 a los ratones a dosis diarias de 5 mg/kg. El suero se recolectó después de la dosis del día 7 para medir IgM e IgG anti-KLH, así como los niveles totales de IgM e IgG. El día 8, se sacrificaron 5 ratones por grupo y se recolectaron sus bazos y se procesaron individualmente como suspensiones unicelulares. Se contabilizaron los números absolutos de células B220+ y células T CD4+ de esplenocitos de ratón mediante citometría de flujo, cuyos resultados se muestran en la Figura 17B. Los niveles séricos resultantes de anticuerpos de IgM e IgG anti-KLH se

muestran en la Figura 17C. Los niveles séricos resultantes de anticuerpos de IgM e IgG totales se muestran en la Figura 17D.

Los resultados en las Figuras 17B-17D muestran que TPP-6269 exhibe resultados similares a los componentes proteicos individuales evaluados en los ensayos funcionales. La Figura 17B muestra que los niveles de células B220+ de ratón se redujeron significativamente en respuesta a la administración de 5 mg/kg de TPP-6269. En contraste, los niveles de células T CD4+ no se vieron afectados significativamente. Las Figuras 17C y 17D muestran que el bloqueo mediado por TPP-6269 de la actividad de FcRn dio como resultado niveles significativamente reducidos de IgM anti-KLH e IgG anti-KLH (Figura 17C), así como niveles significativamente reducidos de IgM total e IgG total (Figura 17D).

Ejemplo 9: Efectos del dominio Fc mejorado sobre el aclaramiento de IgG humana *in vivo* en ratones con FcRn humano

Con su dominio Fc mejorado, TPP-6269 se evaluó además por su capacidad para promover la eliminación de anticuerpos de IgG humana (biotina-hIgG) en un ratón transgénico Tg32 con $\mu\text{FcRn}/-/-$, huFcRn. En la medida en que los ratones Tg32 sufren de hipogammaglobulinemia debido a la baja afinidad de las IgG de ratón para hFcRn, proporcionan un

modelo útil para rastrear directamente la disminución de IgG *in vivo*.

La Figura 18A muestra el diseño de un experimento para evaluar la disminución de IgG por TPP-6269 *in vivo*. El día 0, se administró una dosis en bolo grande de biotina-hIgG (245 mg/kg) a los ratones transgénicos Tg32 por inyección intravenosa (i.v.). Se administró TPP-6269 (20 mg/kg y 60 mg/kg) o un control de vehículo por i.v. 49 horas después de la dosificación de IVIg, mientras que las muestras de suero se recolectaron en serie 48 horas, 72 horas, 96 horas y 120 horas después de la dosificación de IVIg. Los niveles circulantes de biotina-IgG restantes en el suero en los diversos puntos de recolección se midieron usando el kit PK genérico Gyrolab (Gyrolab, catálogo núm. P0020499). Al ejecutar el suero como la primera etapa sobre las perlas recubiertas con estreptavidina en la columna de captura de afinidad de acuerdo con la CD de Gyrolab Bioaffy, la IgG biotina-humana en circulación se capturó directamente de manera que las IgG pudieran detectarse con el reactivo de detección incluido para determinar el % de IgG humanas totales en los ratones.

Como se muestra en la Figura 18B, el tratamiento de ratones Tg32 con TPP-6269 (20 mg/kg y 60 mg/kg) redujo significativamente la concentración plasmática de biotina-hIVIg

en comparación con el grupo de control tratado con vehículos de una manera dependiente de la dosis.

Ejemplo 10: Farmacocinética mejorada del dominio Fc en ratones con FcRn humano

Para determinar si un dominio Fc mejorado proporciona propiedades farmacocinéticas (PK) mejoradas, se utilizaron ratones con FcRn humano (mFcRn-/-, hacen Tg32) y se evaluó TPP-6269 como un ejemplo. Después de la inyección de TPP-6269 en los ratones, se determinó la C_{máx.} a partir de sangre recolectada 10 min después de la inyección del fármaco. Se obtuvieron extracciones de sangre en serie durante un periodo de 21 días y se midieron directamente los niveles de fármaco circulantes usando el kit PK genérico Gyrolab (cat. núm. P0020499). Basándose en los resultados mostrados en la Figura 19, se descubrió que la variante de Fc diseñada genéticamente exhibía una vida $\frac{1}{2}$ de 53,7 horas calculadas usando una regresión no lineal de desintegración en dos fases en GraphPad Prism, versión 9.3.1.

SÍNTESIS DE SECUENCIAS

Sec. con núm. de ident.: 1

TACI_DR1/DR2-1

SLSCRKEQGKFYDHLRLDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRS

Sec. con núm. de ident.: 2

TACI_DR1/DR2-2

SLSCRKEQGKFYDHLRLDCISCASICGQHPKQCAYFCEN

Sec. con núm. de ident.: 3

Enlazador EPKSS

EPKSS

Sec. con núm. de ident.: 4

Enlazador EPKSS-(AGGGG) 2

EPKSS-(AGGGG) 2

Sec. con núm. de ident.: 5

Enlazador EPKSS-(AGGGG) 3

EPKSS-(AGGGG) 3

Sec. con núm. de ident.: 6

Enlazador (AGGGG) 2

(AGGGG) 2

Sec. con núm. de ident.: 7

Enlazador (AGGGG) 3

(AGGGG) 3

Sec. con núm. de ident.: 8

Enlazador PI

GGRSSKARSSSRGGGRGG

Sec. con núm. de ident.: 9

Enlazador enlazado a N

GKTKPREEQYNSTYRVVSVLTG

Sec. con núm. de ident.: 10

Enlazador A-(EAAAK)2-AGGGG

A-(EAAAK)2-AGGGG

Sec. con núm. de ident.: 11

Enlazador A-EAAAK-AGGGG

A-EAAAK-AGGGG

Sec. con núm. de ident.: 12

Enlazador SA-(EAAAK)2-AGGGG

SA-(EAAAK)2-AGGGG

Sec. con núm. de ident.: 13

Enlazador SA-EAAAK-AGGGG

SA-EAAAK-AGGGG

Sec. con núm. de ident.: 14

Enlazador GGNGSAEAAAKEAAAKANG**T**GG

GGNGSAEAAAKEAAAKANG**T**GG

Sec. con núm. de ident.: 15

Enlazador GGNGSAEAAAKEAAAKANG**S**GG

GGNGSAEAAAKEAAAKANG**S**GG

Sec. con núm. de ident.: 16

IgG1/IgG4-Fc

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

Sec. con núm. de ident.: 17

IgG1/IgG4-Fc -- T307A, E380A, N434A

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL**A**VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV**A**WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH**A**HYTQKSLSLGLGK

Sec. con núm. de ident.: 18

IgG1/IgG4-Fc -- Y436L

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNH**L**TQKSLSLSLGK

Sec. con núm. de ident.: 19

IgG1/IgG4-Fc - L234F, L235E, M252Y, S254T, T256E, N434H

DKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTL**YITRE**PEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALH**H**HYTQKSLSLSLG

Sec. con núm. de ident.: 20

IgG1/IgG4-Fc -- L234F, L235E, M252Y, S254T, T256E

DKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTL**YITRE**PEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

Sec. con núm. de ident.: 21

IgG1/IgG4-Fc -- L234F, L235E, N434H

DKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALH**H**HYTQKSLSLSLGK

Sec. con núm. de ident.: 22

IgG1/IgG4-Fc -- M252Y, S254T, T256E, N434H

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**YITRE**PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALH**H**HYTQKSLSLSLGK

Sec. con núm. de ident.: 23

IgG1/IgG4-Fc - L234F, L235E

DKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALH**N**HYTQKSLSLSLGK

Sec. con núm. de ident.: 24

IgG1/IgG4-Fc - M252Y, S254T, T256E

DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTL**YITRE**PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ

PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHHHYTQKSLSLSLGK

Sec. con núm. de ident.: 25

TPP-6269

TACI_DR1/DR2-1, enlazador EPKSS-(AGGGG)2, L234F, L235E, M252Y,
S254T, T256E, N434H

SLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAAYFCENKLRSEEPKSSAGGGGAGGGGDKT
HTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTLY**ITRE**PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH**H**HYTQKSLSLSLG

Sec. con núm. de ident.: 26

TPP-6270

TACI_DR1/DR2-1, enlazador EPKSS-(AGGGG)3, L234F, L235E, M252Y,
S254T, T256E, N434H

SLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAAYFCENKLRSEEPKSSAGGGGAGGGGAGGG
GDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTLY**ITRE**PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH**H**HYTQKSLSLSLG

Sec. con núm. de ident.: 27

TPP-6267

TACI_DR1/DR2-1, sin enlazador, L234F, L235E, M252Y, S254T, T256E, N434H

SLSCRKEQGKFYDHLRLDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSDKTHTCPPCPAPE**FE**GGP
SVFLFPPKPKDTLY**ITRE**PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALH**HH**Y**TQ**KSLSLSLG

Sec. con núm. de ident.: 28

TPP-5776

TACI_DR1/DR2-2, enlazador PI, M252Y, S254T, T256E

SLSCRKEQGKFYDHLRLDCISCASICGQHPKQCAYFCENGGGRSSKARSSSRGGGRGGDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLY**ITRE**PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT**Q**KSLSLSLGK

Sec. con núm. de ident.: 29

TPP-5954

TACI_DR1/DR2-2, enlazador PI, M252Y, S254T, T256E, N434H

SLSCRKEQGKFYDHLRLDCISCASICGQHPKQCAYFCENGGGRSSKARSSSRGGGRGGDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLY**ITRE**PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP

QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH**H**HYTQKSLSLSLGK

Sec. con núm. de ident.: 30

TPP-5957

TACI_DR1/DR2-2, enlazador PI, L234F, L235E, M252Y, S254T, T256E
SLSCRKEQGKFYDHLRLDCISCASICGQHPKQCA YFCENGGRSSKARSSSRGGGRGGDKTH
TCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTL**YITRE**PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH**N**HYTQKSLSLSLGK

Sec. con núm. de ident.: 31

TPP-5958

TACI_DR1/DR2-2, enlazador PI, L234F, L235E, M252Y, S254T,
T256E, N434H
SLSCRKEQGKFYDHLRLDCISCASICGQHPKQCA YFCENGGRSSKARSSSRGGGRGGDKTH
TCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTL**YITRE**PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH**H**HYTQKSLSLSLGK

Sec. con núm. de ident.: 32

TPP-5975

TACI_DR1/DR2-2, enlazador PI, L234F, L235E

SLSCRKEQGKFYDHLRLDCISCASICGQHPKQCAYFCENGGGRSSKARSSSRGGGRGGDKTH
TCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

Sec. con núm. de ident.: 33

TPP-5977

TACI_DR1/DR2-2, enlazador PI, L234F, L235E, N434H

SLSCRKEQGKFYDHLRLDCISCASICGQHPKQCAYFCENGGGRSSKARSSSRGGGRGGDKTH
TCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH**H**HYTQKSLSLGLGK

Sec. con núm. de ident.: 34

TPP-5791

TACI_DR1/DR2-2, enlazador enlazado a N

SLSCRKEQGKFYDHLRLDCISCASICGQHPKQCAYFCENGKTKPREEQYNSTYRVVSVLTGD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE
PQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

Sec. con núm. de ident.: 35

TPP-5780

TACI_DR1/DR2-2, enlazador PI

SLSCRKEQGKFYDHLRLDCISCASICGQHPKQCAYFCENGGRSSKARSSSRGGGRGGDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

Sec. con núm. de ident.: 36

TPP-5779

TACI_DR1/DR2-2, sin enlazador

SLSCRKEQGKFYDHLRLDCISCASICGQHPKQCAYFCENDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

Sec. con núm. de ident.: 37

TPP-5792

TACI_DR1/DR2-2, enlazador enlazado a N, N434A

SLSCRKEQGKFYDHLRLDCISCASICGQHPKQCAYFCENGKTKPREEQYNSTYRVVSVLTGD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE

VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLAVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVAWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH**A**HYTQKSLSLSLGK

Sec. con núm. de ident.: 38

TPP-5298

TACI_DR1/DR2-2, sin enlazador, Y436L

SLSCRKEQGKFYDHLRLDCISCASICGQHPKQCA YFCENDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
SVMHEALHNH**L**TQKSLSLSLGK

SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 39

Proteína TACI

MSG LGRSRRGGRSRVDQEERFPQGLWTGVAMRSCPEEQYWDPLLGT C MSCKTICNHQSQRTCA
AFCRSLSCRKEQGKFYDHLRLDCISCASICGQHPKQCA YFCENKLRSPVNLPPELRRQRSGEV
ENNSDNSGRYQGLEHRGSEASPALPGLKLSADQVALVYSTLGLCLCAVLCCFLVAVACFLKKR
GDPCSCQPRSRPRQSPAKSSQDHAMEAGSPVSTSPPEPVETCSFCFPECRAPTQESAVTPGTPD
PTCAGRWGCHTRTTVLQPCPHIPDSGLGIVCVPAQEGGPGA

Sec. con núm. de ident.: 40

Dominio extracelular de TACI con péptido señal

MSG LGRSRRGGRSRVDQEERFPQGLWTGVAMRSCPEEQYWDPLLGTCTMSCKTICNHQSQRT
CAAFCRSLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPVNLPPELRRQR
SGEVENNSDMSGRYQGLEHRGSEASPALPGLKLSADQVALVYS

Sec. con núm. de ident.: 41

TACI CRD1

CPEEQYWDPLLGTCTMSCKTICNHQSQRTCAAFCRSLSCRKEQGKFYDHLLRDC

Sec. con núm. de ident.: 42

Repetición de TNFR rica en cisteína por TACI (DR1)

CPEEQYWDPLLGTCTMSCKTICNHQSQRTCAAF

Sec. con núm. de ident.: 43

TACI_CRD2

CASICGQHPKQCAYFCENKLRSPVNLPPELRRQRSGEVENNSDMSGRYQGLEHRGSEASPA
LPGLKLSADQVALVYS

Sec. con núm. de ident.: 44

Repetición de TNFR rica en TACI_cisteína (DR2)

CRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCEN

Sec. con núm. de ident.: 45

TPP-5274

TACI_DR1/DR2-2, sin enlazador, M228L, N434S

SLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
SVLHEALHSHYTQKSLSLSLGKHHHHHH

Sec. con núm. de ident.: 46

TPP-7165

TACI_DR1/DR2-1, A-(EAAAK)2-AGGGG, L234F, L235E, M252Y,
S254T, T256E, N434H

SLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSAEAAAKEAAAKAGGGGDK
THTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHSHYTQKSLSLSLG

Sec. con núm. de ident.: 47

TPP-7166

TACI_DR1/DR2-2, enlazador SA-(EAAAK)2-AGGGG, L234F, L235E,
M252Y, S254T, T256E, N434H

SLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENSAEAAAKEAAAKAGGGGDKTHT
CPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ

VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH**H**HYTQKSLSLSLG

Sec. con núm. de ident.: 48

TPP-7167

TACI_DR1/DR2-2, enlazador SA-EAAAK-AGGGG, L234F, L235E,
M252Y, S254T, T256E, N434H

SLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENSAEAAAKAGGGGDKTHTCPPCP
APE**F**EGGPSVFLFPPKPKDTL**YITRE**PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLP
PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD
KSRWQEGNVFSCSVMHEALH**H**HYTQKSLSLSLG

Sec. con núm. de ident.: 49

TPP-5262

TACI_DR1/DR2-2, enlazador (AGGGG)3, M252Y, S254T, T256E, ,
6xHis

SLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTL**YITRE**PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKHHHHHH

Sec. con núm. de ident.: 50

TPP-5260

TACI_DR1/DR2-2, sin enlazador, M252Y, S254T, T256E, 6xHis

SLSCRKEQGKFYDHLRLDCISCASICGQHPKQCAYFCENDKHTCPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTL**YITRE**PEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVV
SVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYNTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKHHHHHH

Sec. con núm. de ident.: 51

TPP-5272

TACI_DR1/DR2-2, sin enlazador, 6xHis

SLSCRKEQGKFYDHLRLDCISCASICGQHPKQCAYFCENDKHTCPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVV
SVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYNTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKHHHHHH

Sec. con núm. de ident.: 52

TPP-5317

TACI_DR1/DR2-2, sin enlazador (AGGGG)3, M252Y, S254T, T256E,
6xHis

SLSCRKEQGKFYDHLRLDCISCASICGQHPKQCAYFCENDKHTCPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTL**YITRE**PEVTCVVVDVSHEDPQVQFKWYVDGVEVHNAKTKLREEQYNSTFRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS

LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYNTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKHHHHHH

Sec. con núm. de ident.: 53

TPP-5273

TACI_DR1/DR2-2, enlazador (AGGGG)3, 6xHis

SLSCRKEQGKFYDHLRLDCISCASICGQHPKQCAYFCENDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPQVQFKWYVDGVEVHNAKTKLREEQYNSTFRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYNTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
SVMHEAL,HNHYTQKSLSLGLGKHHHHHH

Sec. con núm. de ident.: 54

TPP-5275

TACI_DR1/DR2-2, sin enlazador, 6xHis

SLSCRKEQGKFYDHLRLDCISCASICGQHPKQCAYFCENDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPQVKFNWYVDGVQVHNAKTKPREQQYNSTYRVV
SVLTVLHQNWLDGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNDGEPENYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGHHHHHH

Sec. con núm. de ident.: 55

TPP-6265

TACI_DR1/DR2-1, enlazador (AGGGG)3, M252Y, S254T, T256E

SLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSAGGGGAGGGGAGGGGDKT
HTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHHHYTQKSLSLSLG

Sec. con núm. de ident.: 56

TPP-6458

TACI_DR1/DR2-1, L234F, L235E, M252Y, S254T, T256E, N434H
SLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSDKTHTCPPCPAPEFEGGP
SVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHHHYTQKSLSLSLGK

Sec. con núm. de ident.: 57

TPP-4286

TACI_DR1/DR2-1, enlazador EPKSS, etiqueta FLAG
SLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAE
GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSGGSGGDYKDDDDK

Sec. con núm. de ident.: 58

TPP-4291

TACI_DR1/DR2-1 (L82H), enlazador EPKSS, etiqueta FLAG

SLSCRKEQGKFYDHLRDCISCASICGQHPKQCAAYFCENKLRSEEPKSSDKTHTCPPCPAPEAE
GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSGGSGGDYKDDDDK

Sec. con núm. de ident.: 59

TPP-5726

TACI-DR1/DR2-2, sin enlazador, M252H, N434H

SLSCRKEQGKFYDHLRDCISCASICGQHPKQCAAYFCENDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLHISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
SVMHEALHHHYTQKSLSLSLKGHHHHHH

Sec. con núm. de ident.: 60

TPP-5721

TACI-DR1/DR2-2, sin enlazador, N434H

SLSCRKEQGKFYDHLRDCISCASICGQHPKQCAAYFCENDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS

LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
SVMHEALHH**HY**TQKSLSLSLGKHHHHHH

Sec. con núm. de ident.: 61

enlazador EPKSS-(AGGGG)2, L234F, L235E, M252Y, S254T, T256E,
N434H

*EPKSSAGGGGAGGGGDKHTTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTL**YITRE**PEVTCVVVDV*
SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG
LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
*NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHH**HY**TQKSLSLSLG*

Sec. con núm. de ident.: 62

enlazador EPKSS-(AGGGG)3, L234F, L235E, M252Y, S254T, T256E,
N434H

*EPKSSAGGGGAGGGGAGGGGDKHTTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTL**YITRE**PEVTC*
VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
*NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHH**HY**TQKSLSL*
LG

Sec. con núm. de ident.: 63

enlazador PI, L234F, L235E, M252Y, S254T, T256E, N434H

*GGRSSKARSSSRGGGRGGDKHTTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTL**YITRE**PEVTCVV*
VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS

NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH**HH**YHQKSLSLSLG
K

Sec. con núm. de ident.: 64

enlazador A-(EAAAK)2-AGGGG, L234F, L235E, M252Y, S254T, T256E,
N434H

AEAAAKEAAAKAGGGGDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTL**YITRE**PEVTCVVVD
VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH**HH**YHQKSLSLSLG

Sec. con núm. de ident.: 65

enlazador SA-(EAAAK)2-AGGGG, L234F, L235E, M252Y, S254T, T256E,
N434H

SAEAAAKEAAAKAGGGGDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTL**YITRE**PEVTCVVV
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH**HH**YHQKSLSLSLG

Sec. con núm. de ident.: 66

SA-EAAAK-AGGGG, L234F, L235E, M252Y, S254T, T256E, N434H
SAEAAAKAGGGGDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTL**YITRE**PEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS

SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH**HH**Y**TQKSLSLSLG**

Sec. con núm. de ident.: 67

TPP-6419

TACI_DR1/DR2-1, enlazador EPKSS-(AGGGG)2, L234F, L235E, M252Y,
S254T, T256E, N434H

SLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSE**EPKSSAGGGGAGGGGDKT**
HTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTLY**YITRE**PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH**HH**Y**TQKSLSLSLGK**

Sec. con núm. de ident.: 68

TPP-6777

TACI_DR1/DR2-2, sin enlazador, M252Y, S254T, T256E, M247L,
N253S

SLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENDK**HT**TCPPCPAPE**LLGGPSVFL**
FPPKPKDTLY**YITRE**PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV**HNAKTKPREEQFNSTYRVV**
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
SVLHEALH**SHYTQKSLSLSLGK**

Sec. con núm. de ident.: 69

TPP-6269

Secuencia de nucleótidos

AGCCTGTCTTGTAGAAAAGAGCAGGGCAAGTTCTACGACCATCTGCTGAGAGACTGCATCA
GCTGCGCCAGCATTTGCGGACAGCACCCCTAAGCAGTGCGCCTACTTCTGCGAGAACAAGCT
GAGAAGCGAGCCTAAATCTTCTGCCGGCGGAGGCGGAGCTGGTGGTGGCGGAGATAAGACA
CACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAGTTTGAAGGCGGCCCTAGCGTGTTCTGTTC
CTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGTACATCACCCGCGAGCCTGAAGTGACATGTGTGGTGGT
GGACGTGTCCCAAGAGGACCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTG
CACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTTCAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCG
TGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAA
CAAGGGCCTGCCTAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAAGGGAA
CCTCAGGTTTACACCCTGCCTCCAAGCCAAGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGA
CCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCA
GCCTGAGAACAACACTACAAGACCACACCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTTCTG
TACTCCCGGCTGACAGTGGACAAGAGCAGATGGCAAGAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCTCTG
TGATGCACGAAGCCCTGCACCACCACTACACCCAGAAGTCTTTGAGCCTGAGCCTGGGC

Sec. con núm. de ident.: 70

TPP-6419

Secuencia de nucleótidos

AGCCTGTCTTGTAGAAAAGAGCAGGGCAAGTTCTACGACCATCTGCTGAGAGACTGCATCA
GCTGCGCCAGCATTTGCGGACAGCACCCCTAAGCAGTGCGCCTACTTCTGCGAGAACAAGCT
GAGAAGCGAGCCTAAATCTTCTGCCGGCGGAGGCGGAGCTGGTGGTGGCGGAGATAAGACA
CACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAGTTTGAAGGCGGCCCTAGCGTGTTCTGTTC

CTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGTACATCACCCGCGAGCCTGAAGTGACATGTGTGGTGGT
GGACGTGTCCCAAGAGGACCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTG
CACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTTCAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCG
TGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAA
CAAGGGCCTGCCTAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAAGGGAA
CCTCAGGTTTACACCCTGCCTCCAAGCCAAGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGA
CCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCA
GCCTGAGAACAACACTACAAGACCACACCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTTCTG
TACTCCCGGCTGACAGTGGACAAGAGCAGATGGCAAGAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCTCTG
TGATGCACGAAGCCCTGCACCACCACTACACCCAGAAGTCTTTGAGCCTGAGCCTGGGCAA
G

Sec. con núm. de ident.: 71

TPP-5777

TACI_DR1/DR2-2, sin enlazador, M428L/N434S

SLSCRKEQGKFYDHLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
SV**L**HEALH**S**HYTQKSLSLSLGK

Sec. con núm. de ident.: 72

IgG1/IgG4-Fc - L234F, L235E, M252Y, S254T, T256E, N434H

DKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTL**YITRE**PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH**H**HYTQKSLSLSLGK

Equivalentes

Los expertos en la técnica reconocerán o podrán determinar, usando no más que experimentación rutinaria, muchos equivalentes de las modalidades específicas de la invención descritas en la presente. Tales equivalentes pretenden estar incluidos en las siguientes reivindicaciones.