

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201992460** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2020.03.18

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.05.11

---

(54) **АНТИТЕЛА-АГОНИСТЫ ВТЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

---

(31) 62/508,510

(32) 2017.05.19

(33) US

(86) PCT/US2018/032218

(87) WO 2018/213113 2018.11.22

(71) Заявитель:  
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:

Атвелл Шейн Круммен, Обунгу  
Виктор Х., Вендел Эндрю Чарльз (US)

(74) Представитель:

Парамонова К.В., Угрюмов В.М.,  
Христофоров А.А., Гизатуллин Ш.Ф.,  
Гизатуллина Е.М., Глухарёва А.О.,  
Костюшенкова М.Ю., Лебедев В.В.,  
Лыу Т.Н., Строкова О.В. (RU)

---

(57) Предлагаются антитела, которые связывают ВТЛА, и способы их применения, причем указанные антитела пригодны в качестве агентов для лечения состояний, связанных с аутоиммунными заболеваниями, включая лечение волчанки.

**201992460**  
**A1**

**201992460**

**A1**

## АНТИТЕЛА-АГОНИСТЫ ВТЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Данное изобретение относится к области медицины. Более конкретно, данное изобретение относится к антителам, направленным против В и Т лимфоцитарного аттенюатора (ВТЛА - В and Т Lymphocyte Attenuator), и их фармацевтическим композициям. Ожидается, что антитела по данному изобретению будут полезны при лечении аутоиммунных заболеваний, таких как волчанка.

Волчанка - это аутоиммунное заболевание с гетерогенными признаками, включая проявления на коже, ротовой полости, мышцах и суставах, сердце, периферической крови, легких, почках, репродуктивной системе и ЦНС. Пациенты с волчанкой подвержены риску серьезных и угрожающих жизни сердечно-сосудистых, почечных и психоневрологических заболеваний. Стандарт лечения включает в себя множество стероидов, которые имеют много неблагоприятных и/или опасных побочных эффектов. Существует необходимость в способах лечения для лечения заболеваний, позволяющих уменьшить или исключить использование стероидов.

Т и В лимфоцитарный аттенюатор (ВТЛА; CD272) является членом суперсемейства Ig и частью семейства рецепторов контрольных точек, которые отрицательно регулируют активацию иммунных клеток. ВТЛА в основном экспрессируется на В-клетках, Т-клетках и дендритных клетках. Природный лиганд для ВТЛА является членом суперсемейства рецепторов ФНО, медиатором проникновения вируса герпеса (HVEM; TNFRSF14).

Сообщалось, что человеческий HVEM-Fc связывается с человеческим ВТЛА, экспрессированным в клетках 293Т, с  $K_D$  112 нМ, как обнаружено с помощью проточной цитометрии. (Cheung et al., PNAS, 13 сентября 2005, 102: 37; 13218-13223). Связывание HVEM с ВТЛА приводит к тирозин-фосфорилированию двух консервативных иммунорецепторных доменов ингибирующего мотива на основе тирозина в цитоплазматическом домене ВТЛА. Это фосфорилирование приводит к рекрутированию через два домена Src гомологии 2 протеинтирозинфосфатаз, которые придают ингибирующую активность ВТЛА путем дефосфорилирования и подавления положительного сигналинга клеточных рецепторов (например, трансдукционных сигнальных каскадов рецептора Т-клеток

или рецептора В-клеток), таким образом приводя к подавлению активации иммунных клеток. В мышинной модели, склонной к самопроизвольному развитию волчанкоподобных заболеваний (мыши MRL-lpr), мыши с дефицитом BTLA имеют более выраженную лимфоцитарную инфильтрацию в слюнных железах, легких, 5 поджелудочной железе, почках и суставах по сравнению с мышами, экспрессирующими BTLA. Следовательно, антитела-агонисты BTLA могут быть полезны для пациентов с аутоиммунными заболеваниями, такими как волчанка.

Антитела-агонисты к BTLA известны в данной области. Например, в патенте США № 8563694 (патент '694) описаны антитела-агонисты BTLA, которые 10 либо блокируют (Mab21H6 и Mab19A7), либо не блокируют (Mab8D5 и Mab8A3) связывание HVEM с BTLA. Патент '694 описывает постоянную потребность в разработке методов лечения, которые используют ингибирующую роль BTLA в лимфоцитарных ответах, в то же время допуская связывание BTLA-HVEM. Однако не хватает антител-агонистов BTLA, которые имитируют связывание HVEM с 15 BTLA для лечения аутоиммунных заболеваний. Антитело «имитирует» связывание HVEM с BTLA, если антитело имеет эпитоп, который значительно перекрывает сайт связывания HVEM, и существует структурное сходство между антителом и HVEM. Существует также недостаток антител-агонистов BTLA, которые связывают человеческие BTLA и пригодны для исследования на доклинических 20 моделях аутоиммунных заболеваний *in vivo*, таких как мышинные модели и модели обезьян циномоглус. Таким образом, остается потребность в альтернативных антителах-агонистах BTLA.

Антитела по данному изобретению стремятся предоставить альтернативные антитела-агонисты BTLA. Такие антитела-агонисты BTLA могут быть полезны при 25 лечении аутоиммунных заболеваний, таких как волчанка. Такие антитела-агонисты BTLA способны связывать BTLA от множества видов, таких как человек, обезьяна циномоглус, и/или мышинные BTLA. Кроме того, такие антитела-агонисты BTLA демонстрируют повышенную активность *in vitro* по сравнению с антителом, имеющим такой же вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок 30 легкой цепи, что и Mab8D5. Антитела по данному изобретению обладают по меньшей мере одной из этих желательных характеристик.

Одно такое антитело-агонист BTLA способно связывать BTLA человека, обезьяны циномоглус и мыши. Удивительно, но это антитело обладает желаемой перекрестной реактивностью, поскольку оно имитирует связывание HVEM с BTLA. Это антитело также имеет более высокую аффинность связывания с BTLA по сравнению с BTLA, связывающимся с HVEM. Это может принести пользу пациентам, имеющим состояния болезни с переходными уровнями HVEM, где может быть желательно иметь антитело-агонист, имитирующее BTLA, во время, когда у пациента наблюдается снижение HVEM.

Данные изобретения обеспечивают антитела, которые связываются с BTLA и активируют и/или усиливают BTLA-опосредованный сигналинг (антитело-агонист BTLA). Данное изобретение относится к антителу, которое содержит переменный участок легкой цепи (LCVR) и переменный участок тяжелой цепи (HCVR), где LCVR содержит определяющие комплементарности участки (CDR) LCDR1, LCDR2 и LCDR3, а HCVR содержит CDR HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и где аминокислотная последовательность LCDR1 представляет собой SEQ ID NO: 22, аминокислотная последовательность LCDR2 представляет собой SEQ ID NO: 25, аминокислотная последовательность LCDR3 представляет собой SEQ ID NO: 28, аминокислотная последовательность HCDR1 представляет собой SEQ ID NO: 13, аминокислотная последовательность HCDR2 представляет собой SEQ ID NO: 16, а аминокислотная последовательность HCDR3 представляет собой SEQ ID NO: 19. В одном варианте осуществления изобретения, антитело содержит LCVR и HCVR, и при этом аминокислотная последовательность LCVR представляет собой SEQ ID NO: 4, а аминокислотная последовательность HCVR представляет собой SEQ ID NO: 3. В другом варианте осуществления изобретения, антитело содержит легкую цепь (LC) и тяжелую цепь (HC), и при этом аминокислотная последовательность LC представляет собой SEQ ID NO: 2, а аминокислотная последовательность HC представляет собой SEQ ID NO: 1. В еще одном варианте осуществления изобретения, антитело содержит 2 LC и 2 HC, где аминокислотная последовательность каждой LC представляет собой SEQ ID NO: 2, а аминокислотная последовательность каждой HC представляет собой SEQ ID NO: 1.

Данное изобретение также обеспечивает антитело-агонист BTLA, в котором аминокислотная последовательность LCDR1 представляет собой SEQ ID NO: 23,

аминокислотная последовательность LCDR2 представляет собой SEQ ID NO: 26, аминокислотная последовательность LCDR3 представляет собой SEQ ID NO: 29, аминокислотная последовательность HCDR1 представляет собой SEQ ID NO: 14, аминокислотная последовательность HCDR2 представляет собой SEQ ID NO: 17, а

5 аминокислотная последовательность HCDR3 представляет собой SEQ ID NO: 20. В одном варианте осуществления изобретения, аминокислотная последовательность LCVR представляет собой SEQ ID NO: 8, а аминокислотная последовательность HCVR представляет собой SEQ ID NO: 7. В другом варианте осуществления изобретения, аминокислотная последовательность LC представляет собой SEQ ID

10 NO: 6, а аминокислотная последовательность HC представляет собой SEQ ID NO: 5. В еще одном варианте осуществления изобретения, антитело содержит 2 LC и 2 HC, где аминокислотная последовательность каждой LC представляет собой SEQ ID NO: 6, а аминокислотная последовательность каждой HC представляет собой SEQ ID NO: 5.

15 Данное изобретение также обеспечивает антитело-агонист BTLA, в котором аминокислотная последовательность LCDR1 представляет собой SEQ ID NO: 24, аминокислотная последовательность LCDR2 представляет собой SEQ ID NO: 27, аминокислотная последовательность LCDR3 представляет собой SEQ ID NO: 30, аминокислотная последовательность HCDR1 представляет собой SEQ ID NO: 15,

20 аминокислотная последовательность HCDR2 представляет собой SEQ ID NO: 18, а аминокислотная последовательность HCDR3 представляет собой SEQ ID NO: 21. В одном варианте осуществления изобретения, аминокислотная последовательность LCVR представляет собой SEQ ID NO: 12, а аминокислотная последовательность HCVR представляет собой SEQ ID NO: 11. В другом варианте осуществления изобретения, аминокислотная последовательность LC представляет собой SEQ ID

25 NO: 10, а аминокислотная последовательность HC представляет собой SEQ ID NO: 9. В еще одном варианте осуществления изобретения, антитело содержит 2 LC и 2 HC, где аминокислотная последовательность каждой LC представляет собой SEQ ID NO: 10, а аминокислотная последовательность каждой HC представляет собой

30 SEQ ID NO: 9.

Данное изобретение также относится к антителу, которое связывает BTLA, при этом антитело производится с помощью стадий, включающих иммунизацию

кроликов Fc-меченным доменом внеклеточного домена (ECD) человеческого BTLA, и усиление белками, меченными BTLA-Fc человека и мыши. Аминокислотная последовательность ECD BTLA человека представляет собой аминокислоты 31-150 SEQ ID NO: 31.

5 Данное изобретение относится к антителу-агонисту BTLA, которое имитирует связывание HVEM с BTLA. Данное изобретение также относится к антителу-агонисту BTLA, которое способно связывать BTLA человека, обезьяны, циномоглус и мыши.

10 Данное изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело по данному изобретению и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или наполнителей. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фармацевтические композиции по данному изобретению можно использовать для лечения одного или более ревматических, нейронных и дерматологических заболеваний, причем такое лечение включает

15 введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества фармацевтической композиции по данному изобретению. В некоторых конкретных вариантах осуществления изобретения, ревматическое заболевание представляет собой по меньшей мере одно из волчаночного нефрита, системной красной волчанки и ревматоидного артрита. В других конкретных вариантах осуществления изобретения, дерматологическое заболевание представляет собой по меньшей мере

20 одно из атопического дерматита и псориаза. В других конкретных вариантах осуществления изобретения, нейрональное заболевание представляет собой рассеянный склероз.

25 Данное изобретение также относится к способу лечения пациента с одним или более ревматическим, нейронным и дерматологическим заболеванием, включающему введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела по данному изобретению. В некоторых таких вариантах осуществления изобретения, ревматическое заболевание представляет собой по меньшей мере одно из волчаночного нефрита, системной красной волчанки и

30 ревматоидного артрита. В других конкретных вариантах осуществления изобретения, дерматологическое заболевание представляет собой по меньшей мере одно из атопического дерматита и псориаза. В других конкретных вариантах

осуществления изобретения, нейрональное заболевание представляет собой рассеянный склероз.

5 В данном изобретении также предложено антитело по данному изобретению или его фармацевтическая композиция для применения в терапии. В некоторых вариантах осуществления изобретения, данное изобретение относится к антителу по данному изобретению или его фармацевтической композиции для применения при лечении одного или более ревматических, нейрональных и дерматологических заболеваний. В некоторых таких вариантах осуществления изобретения, ревматическое заболевание представляет собой по меньшей мере одно из волчаночного нефрита, системной красной волчанки и ревматоидного артрита. В 10 других конкретных вариантах осуществления изобретения, дерматологическое заболевание представляет собой по меньшей мере одно из атопического дерматита и псориаза. В других конкретных вариантах осуществления изобретения, нейрональное заболевание представляет собой рассеянный склероз.

15 Данное изобретение также предусматривает применение антитела по данному изобретению или его фармацевтической композиции при изготовлении лекарственного средства для лечения одного или более ревматических, нейрональных и дерматологических заболеваний. В некоторых таких вариантах осуществления изобретения, ревматическое заболевание представляет собой по 20 меньшей мере одно из волчаночного нефрита, системной красной волчанки и ревматоидного артрита. В других конкретных вариантах осуществления изобретения, дерматологическое заболевание представляет собой по меньшей мере одно из атопического дерматита и псориаза. В других конкретных вариантах осуществления изобретения, нейрональное заболевание представляет собой 25 рассеянный склероз.

Данное изобретение относится к молекуле ДНК, содержащей полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 9. Данное изобретение также относится к молекуле ДНК, содержащей 30 полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 10.

Данное изобретение относится к молекуле ДНК, содержащей полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и содержащей полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Данное изобретение также относится к молекуле ДНК, содержащей полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В конкретном варианте осуществления изобретения, полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, представляет собой SEQ ID NO: 35, и полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, представляет собой SEQ ID NO: 36.

Данное изобретение также относится к молекуле ДНК, содержащей полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и содержащей полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. Данное изобретение также относится к молекуле ДНК, содержащей полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В конкретном варианте осуществления изобретения, полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, представляет собой SEQ ID NO: 37, и полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, представляет собой SEQ ID NO: 38.

Данное изобретение также относится к молекуле ДНК, содержащей полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и содержащей полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. Данное изобретение также относится к молекуле ДНК, содержащей полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В конкретном варианте осуществления изобретения, полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, представляет собой SEQ ID NO: 39, и полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, представляет собой SEQ ID NO: 40.

Кроме того, данное изобретение относится к клетке млекопитающего, содержащей молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Данное изобретение также относится к клетке млекопитающего, содержащей молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. Данное изобретение также относится к клетке млекопитающего, содержащей молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В одном варианте осуществления изобретения, клеточная линия млекопитающих представляет собой клеточную линию яичника китайского хомячка (СНО) или эмбриональной почки китайского хомячка (НЕК).

Данное изобретение также относится к клетке млекопитающего, содержащей молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID

NO: 1, и/или молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, причем клетка способна экспрессировать антитело, содержащее HC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и LC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Предпочтительно клетка млекопитающего содержит молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В одном варианте осуществления изобретения, клеточная линия млекопитающих представляет собой клеточную линию CHO или HEK.

Данное изобретение также относится к клетке млекопитающего, содержащей молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и/или молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, причем клетка способна экспрессировать антитело, содержащее HC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. Предпочтительно клетка млекопитающего содержит молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В одном варианте осуществления изобретения, клеточная линия млекопитающих представляет собой клеточную линию CHO или HEK.

Данное изобретение также относится к клетке млекопитающего, содержащей молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и/или молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, где клетка способна экспрессировать антитело, содержащее HC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и LC, имеющую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. Предпочтительно клетка млекопитающего содержит молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В одном варианте осуществления изобретения, клеточная линия млекопитающих представляет собой клеточную линию CHO или НЕК.

В другом варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к способу получения антитела, содержащего LC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и HC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, причем способ включает культивирование клетки млекопитающего, содержащей ДНК, кодирующую LC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и/или HC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, в условиях, при которых антитело экспрессируется, и восстанавливается экспрессированное антитело. Изобретение включает антитело, получаемое способом по изобретению, как описано непосредственно выше.

Данное изобретение также относится к способу получения антитела, содержащего LC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и HC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, причем способ включает культивирование клетки млекопитающего, содержащей ДНК, кодирующую LC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и/или HC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, в условиях, при которых антитело экспрессируется, и восстанавливается экспрессированное антитело. Изобретение включает антитело, получаемое способом по изобретению, как описано непосредственно выше.

Данное изобретение также относится к способу получения антитела, содержащего LC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и HC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, причем способ включает культивирование клетки млекопитающего, содержащей ДНК, кодирующую LC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и/или HC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, в

условиях, при которых антитело экспрессируется, и восстанавливается экспрессированное антитело. Изобретение включает антитело, получаемое способом по изобретению, как описано непосредственно выше.

5 Данное изобретение включает способ получения антитела, причем это антитело содержит две HC и две LC, в которых аминокислотная последовательность каждой из двух HC представляет собой SEQ ID NO: 1, а аминокислотная последовательность каждой из двух LC представляет собой SEQ ID NO: 2, и этот процесс включает: а) культивирование клетки млекопитающего по изобретению, как описано выше, в условиях, при которых антитело экспрессируется, и б) восстановление экспрессированного антитела. Изобретение  
10 включает антитело, получаемое способом по изобретению, как описано непосредственно выше.

Данное изобретение также включает способ получения антитела, причем это антитело содержит две HC и две LC, в которых аминокислотная последовательность каждой из двух HC представляет собой SEQ ID NO: 5, а аминокислотная последовательность каждой из двух LC представляет собой SEQ ID NO: 6, и этот процесс включает: а) культивирование клетки млекопитающего по изобретению, как описано выше, в условиях, при которых антитело экспрессируется, и б) восстановление экспрессированного антитела. Изобретение  
20 включает антитело, получаемое способом по изобретению, как описано непосредственно выше.

Данное изобретение также включает способ получения антитела, причем это антитело содержит две HC и две LC, в которых аминокислотная последовательность каждой из двух HC представляет собой SEQ ID NO: 9, а аминокислотная последовательность каждой из двух LC представляет собой SEQ ID NO: 10, и этот процесс включает: а) культивирование клетки млекопитающего по изобретению, как описано выше, в условиях, при которых антитело экспрессируется, и б) восстановление экспрессированного антитела. Изобретение  
25 включает антитело, получаемое способом по изобретению, как описано непосредственно выше.  
30

Данное изобретение относится к антителу, которое находится в контакте с человеческим BTLA по структурному и функциональному эпипептиду, имеющему

следующие остатки SEQ ID NO: 31: Arg в положении 42 и His в положении 127. Данное изобретение также относится к антителу, которое находится в контакте с человеческим BTLA по структурному и функциональному эпитопу, содержащему Arg в положении 42 аминокислотной последовательности, заданной SEQ ID NO: 31.

5  
10  
15  
20  
25  
30

Данное изобретение относится к антителу, которое находится в контакте с человеческим BTLA по новому структурному эпитопу, имеющему следующие остатки SEQ ID NO: 31: Asp в положении 35, Gln в положении 37, Arg в положении 42, Leu в положении 74, Gly в положении 76 , Cys в положении 79, Arg в положении 114, Phe в положении 119, Gln в положении 120, Asn в положении 122, Ser в положении 128. В предпочтительном варианте осуществления изобретения, указанное антитело 22B3 имитирует связывание HVEM с BTLA, поскольку HCDR3 антитела 22B3 структурно сходно с HVEM. Предпочтительно, когда кристаллическая структура BTLA:антитело выровнена с кристаллической структурой BTLA:HVEM в программе, такой как PyMOL™, петля CDR антитела принимает конформацию, аналогичную петле HVEM, содержащей аминокислотные остатки 69-72 (аминокислоты ELTG из SEQ ID NO: 41).

20  
25  
30

Данное изобретение относится к антителу, которое находится в контакте с человеческим BTLA по функциональному эпитопу, имеющему Asp в положении 52 SEQ ID NO: 31. Антитело связывается с новым структурным эпитопом, имеющим следующие остатки SEQ ID NO: 31: His в положении 46, Glu в положении 55, Glu в положении 103, Pro в положении 104, Leu в положении 106, Pro в положении 107, Thr в позиция 134, Ala в позиции 139.

25  
30

Данное изобретение относится к антителу, которое находится в контакте с человеческим BTLA по функциональному эпитопу, имеющему His в положении 68 и Lys в положении 81 SEQ ID NO: 31. В одном варианте осуществления изобретения, антитело связывается с новым структурным эпитопом, имеющим следующие остатки SEQ ID NO: 31: Tyr в положении 62, Ala в положении 64, His в положении 68, Arg в положении 85, Glu в положении 91, Phe в положении 98, Asn в положении 118.

Данное изобретение относится к антителу, которое находится в контакте с человеческим BTLA по новому структурному эпитопу, имеющему следующие

остатки SEQ ID NO: 31: Asp в положении 35, Gln в положении 37, Arg в положении 42, Leu в положении 74, Gly в положении 76, Cys в положении 79, Arg в положении 114, Phe в положении 119, Gln в положении 120, Asp в положении 122, и Ile в положении 124, Ser в положении 128.

5 Используемый в данном документе термин «антитело» представляет собой молекулу иммуноглобулина, содержащую 2 HC и 2 LC, связанные дисульфидными связями. Аминоконцевая часть каждой LC и HC включает варибельный участок, из около 100-120 аминокислот, в первую очередь ответственную за распознавание антигена через содержащиеся в нем CDR. CDR перемежаются с участками, которые являются более консервативными, называемыми каркасными участками (“FR”).  
10 Каждый LCVR и HCVR состоит из 3 CDR и 4 FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 3 CDR LC обозначаются как «LCDR1, LCDR2 и LCDR3», а 3 CDR HC обозначаются как «HCDR1, HCDR2 и HCDR3». CDR содержат большую часть остатков, которые образуют специфические взаимодействия с антигеном. То есть CDR содержат большую часть остатков, которые находятся в контакте (в пределах 4,5 Å) с остатками антигена. Таким образом, функциональная способность антитела связывать определенный антиген в значительной степени зависит от аминокислотных остатков в шести CDR. Назначение аминокислот доменам CDR в  
15 участках LCVR и HCVR антител по данному изобретению основано на хорошо известном соглашении нумерации по Кабат (Kabat, et al., Ann. NY Acad. Sci. 190:382-93 (1971); Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)), и Chothia (Chothia C, Lesk AM. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. J. Mol. Biol. 1987; 196 : 901–17. Chothia C, Lesk AM, Tramontano A, Levitt M, Smith-Gill SJ, Air G, Sheriff S, Padlan EA, Davies D, Tulip WR, et al. Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. Nature. 1989;342: 877-83). Начальный аминокислотный остаток HCDR1 определяется по Хотиа, а конечный аминокислотный остаток для HCDR1 определяется по Кабат. Начальные  
20 и конечные аминокислотные остатки для HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 определены по Кабат.

Используемый в данном документе термин «эпитоп» может относиться к структурному эпитопу (сайтам антигена, которые находятся в контакте с 5  
вариабельным участком антитела) и/или функциональному эпитопу (сайтам антигена, которые могут или не могут быть в контакте с вариабельным участком антитела и необходимы для связывания антитела). Структурный эпитоп, определяемый с помощью рентгеновской кристаллографии, где любой остаток на BTLA человека в пределах 4,5 Å от другого остатка на связанном Fab, считается сайтом контакта.

Антитела по данному изобретению могут быть получены и очищены с 10  
использованием известных способов. Например, последовательности кДНК, кодирующие HC (например, аминокислотную последовательность, заданную SEQ ID NO: 1) и LC (например, аминокислотную последовательность, заданную SEQ ID NO: 2), могут быть клонированы и встроены в вектор экспрессии GS (глутаминсинтетаза). Затем сконструированный вектор экспрессии 15  
иммуноглобулина может стабильно трансфицироваться в клетки CHO. Специалист в данной области поймет, что экспрессия антител у млекопитающих приводит к гликозилированию, как правило, в высоко консервативных сайтах N-гликозилирования в участке Fc. Стабильные клоны могут быть проверены на экспрессию антитела, специфически связывающегося с BTLA. Положительные 20  
клоны могут быть размножены в бессывороточной культуральной среде для производства антител в биореакторах. Среда, в которую было секретировано антитело, может быть очищена обычными методами. Например, среда может быть удобно нанесена на колонку с протеином А или G сефарозой FF, которая была уравновешена совместимым буфером, таким как фосфатно-солевой буферный 25  
раствор. Колонку промывают для удаления неспецифических связывающих компонентов. Связанное антитело элюируется, например, градиентом pH, и фракции антитела выявляются, например, с помощью SDS-PAGE, и затем объединяются. Антитело можно концентрировать и/или стерильно фильтровать, используя обычные методики. Растворимые агрегаты и мультивмеры можно 30  
эффективно удалять обычными способами, включая эксклюзионную, с гидрофобным взаимодействием, ионообменную или гидроксиапатитную

хроматографию. Продукт можно незамедлительно замораживать, например, при -70° С или можно лиофилизировать.

Антитело по данному изобретению может быть включено в фармацевтическую композицию, которая может быть получена способами, хорошо известными в данной области, и содержит антитело по данному изобретению и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или наполнителей.

Фармацевтическую композицию, содержащую эффективное количество антитела по данному изобретению, можно вводить пациенту с риском или проявлением заболеваний или расстройств, как описано в данном документе, первичными путями (например, подкожным, внутривенным, внутривенным, внутримышечным или трансдермальным). Эффективное количество относится к количеству, необходимому (в дозировках и в течение периодов времени и для средств введения) для достижения желаемого терапевтического результата. Эффективное количество антитела может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст, пол и масса индивида, а также от способности антитела вызывать необходимый ответ у индивида. Эффективным количеством является также количество, при котором любые токсические или вредные эффекты антитела по данному изобретению перевешиваются терапевтически благоприятными эффектами.

Антитела по данному изобретению можно использовать при лечении пациентов. Более конкретно, ожидается, что антитела по данному изобретению будут лечить одно или более заболеваний, связанных с ревматическим, нейрональным и дерматологическим заболеванием. Ревматические заболевания характеризуются воспалением, которое может поражать суставы, мышцы и/или органы человека. Одним из таких ревматических заболеваний является системная красная волчанка (СКВ).

Используемые в данном документе взаимозаменяемо «лечение» и/или «лечить» и/или «лечение» предназначены для обозначения всех процессов, в которых может происходить замедление, прерывание, сдерживание, контроль, остановка или обращение прогрессирования расстройств, описанных в данном документе, но не обязательно указывают на полное устранение всех симптомов

расстройства. Лечение включает введение антитела по данному изобретению для  
лечения заболевания или состояния у человека, на которое благоприятно влияет  
увеличение активности BTLA, и включает: (a) ингибирование дальнейшего  
развития заболевания; и (b) облегчение заболевания, то есть вызывание регрессии  
заболевания или расстройства или облегчение симптомов или их осложнений.

### Конструирование антитела

Антитела по данному изобретению были получены путем иммунизации  
кроликов Fc-меченым доменом внеклеточного домена (ECD) человеческого BTLA  
и усиления с помощью мышиногo BTLA-Fc-меченного белка (25F7) или  
поочередно человеческими и мышинными мечеными BTLA-Fc белками (22B3 и  
23C8). Для выявления перекрестной реактивности проводили скрининг BTLA  
человека, мыши и обезьяны циномоглус, меченных гистидином. Аминокислотная  
последовательность BTLA человека задана SEQ ID NO: 31, аминокислотная  
последовательность BTLA мыши Balbc задана SEQ ID NO: 32, аминокислотная  
последовательность C57BL6 задана SEQ ID NO: 33, и аминокислотная  
последовательность BTLA обезьяны циномоглус задана SEQ ID NO: 34. Затем  
антитела были гуманизированы и аффинность созрела.

20

### **Примеры**

#### **Экспрессия и очистка сконструированных антител-агонистов BTLA**

Антитела-агонисты BTLA по данному изобретению, могут быть  
экспрессированы и очищены по существу, следующим образом. Соответствующую  
клетку-хозяина, такую как НЕК 293 или CHO, можно временно или стабильно  
трансфицировать экспрессионной системой для секреции антител, используя  
оптимальное предварительно определенное отношение векторов HC:LC (например,  
1:3 или 1:2) или один вектор системы кодирования как HC, так и LC. Осветленную  
среду, в которую происходила секреция антитела, можно очищать, используя  
любой из многих обычно применяемых способов. Например, в случае фрагмента  
Fab среду удобно наносить на колонку MabSelect (GE Healthcare) или колонку  
KappaSelect (GE Healthcare), уравновешенную совместимым буфером, таким как  
фосфатно-солевой буферный раствор (pH 7,4). Колонку можно промывать для

удаления неспецифических связывающих компонентов. Связанное антитело можно элюировать, например, градиентом рН (например, от 20 мМ Трис-буфера, рН 7,0, до 10 мМ цитратного натриевого буфера, рН 3,0, или от фосфатно-солевого буферного раствора, рН от 7,4, до 100 мМ глицинового буфера, рН 3,0).

5 Обнаружение фракций антител можно проводить, например, с помощью SDS-PAGE, а затем проводить их объединение. Дальнейшая очистка является необязательной, в зависимости от предполагаемого использования. Антитело можно концентрировать и/или стерильно фильтровать, используя обычные методики. Растворимые агрегаты и мультимеры можно эффективно удалять

10 обычными способами, включая эксклюзионную, с гидрофобным взаимодействием, ионообменную, мультимодальную или гидроксиапатитную хроматографию. Чистота антитела после этих стадий хроматографии составляет между от около 95 % до около 99 %. Продукт можно хранить в холодильнике, незамедлительно замораживать при -70 °С или можно лиофилизировать. Аминокислотные SEQ ID

15 NO для приведенных в качестве примеров антител по данному изобретению показаны ниже.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности приведенных в качестве примеров антител-агонистов BTLA.

SEQ ID NO антитела						
Антитело	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
22B3	13	16	19	22	25	28
23C8	14	17	20	23	26	29
25F7	15	18	21	24	27	30

20

#### Аффинность и кинетика связывания

Аффинность и кинетику связывания антител-агонистов BTLA по данному изобретению (22B3, 23C8 и 25F7) с BTLA измеряют с помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием Biacore® 3000 (GE

25 Healthcare). Аффинность связывания измеряют путем иммобилизации BTLA-белка около 120 RU (человека, крысы, мыши (Balbc или C57BL6) или BTLA обезьяны циномомлгус) посредством аминного связывания на чипе Biacore® CM5, и

протекающего антитела-агониста BTLA, начиная с 500 нМ в 2-кратного серийного разведения до 15,6 нМ. Эксперименты проводят при 25 °С в буфере HBS-EP (GE Healthcare BR100669; 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,05 % поверхностно-активного вещества P20, рН 7,4). Для каждого цикла, 250 мкл образца антитела пропускают через ячейку потока 1 и 2 при 50 мкл/мин, а затем диссоциируют в течение 10 минут. Поверхность чипа регенерируют с 5 мкл инъекции глицинового буфера при рН 1,5 при 10 мкл/мл потока. Данные соответствуют модели связывания Ленгмюра 1:1 для получения  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  и для вычисления  $K_D$ . Следуя процедурам, по существу, как описано выше, были 5  
10  
соблюдены следующие параметры (показанные в таблице 2). Данные, представленные ниже, представляют собой среднее из трех экспериментов для человека, цино, крысы и мыши для 22В3.

Таблица 2. Аффинность и кинетика связывания

Антитело	Антиген (BTLA)	$k_{on}$ (1/Мс)	$k_{off}$ (1/с)	$K_D$ (нМ)
<b>22В3</b>	Человек	5,87E + 06	2,19E-03	0,365
	Цино	2,45E + 06	6,47E-04	0,27
	Мышиные (balbc)	2,60E + 06	8,58E-02	32,5
	Мышиные (C57BL6)	1,89E + 06	2,65E-01	147
	Крыса	2,10E + 06	4,62E-02	24,1
<b>23С8</b>	Человек	1,59E + 05	2,93E-04	1,93 (n = 3)
	Цино	8,71E + 04	3,09E-03	35,35 (n = 2)
	Мышиные (balbc)	Без связывания	Без связывания	Без связывания
	Мышиные (C57BL6)	Без связывания	Без связывания	Без связывания
	Крыса	Не тестировано	Не тестировано	Не тестировано
<b>25F7</b>	Человек	6,8622E + 04	1,42E-02	206,2 (n = 2)
	Цино	Не тестировано	Не тестировано	Не тестировано
	Мышиные (balbc)	Не тестировано	Не тестировано	Не тестировано
	Мышиные (C57BL6)	7,70E + 04	3,50E-04	4,63 (n = 1)
	Крыса	Не тестировано	Не тестировано	Не тестировано

Как показано выше в таблице 2, антитела-агонисты BTLA по данному изобретению связывают BTLA. В частности, антитело 22B3 способно связывать BTLA человека, мыши и макаки циномолгус.

5

### **Связывание с первичными клетками**

Способность антител BTLA по данному изобретению (22B3, 23C8 и 25F7) связывать первичные клетки разных видов определяют с помощью FACS. Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) выделяют из образца донорской крови (Банк крови Сан-Диего, # LRS-WBC) с использованием пробирок Ficoll (GE # 17-1440-02) и SepMate (STEMCELL # 15450) в соответствии с протоколом производителя. PBMC цино (WorldWide Primates # CA-10) оттаивают после жидкого азота и промывают один раз буфером FACS (таким же, как указано выше).

15 Селезенки самцов мышей C57BL6 (JAX) или самок крыс Sprague Dawley (Harlan) собирают, объединяют и диссоциируют на суспензии отдельных клеток с использованием клеточного сита и поршня шприца через коническую пробирку объемом 50 мл, промытую RPMI 1640, дополненной 10 % инактивированной теплом FBS и 2 мМ ЭДТА. Клетки осаждают, среду удаляют, и эритроциты лизируют путем ресуспендирования осадка в 2 мл лизирующего буфера ACK (gibco # A10492-01) в течение приблизительно 2 минут перед гашением полной RPMI. Лизированные клетки можно осадить и промыть один раз в буфере FACS (DPBS 1X, содержащий 3 % FBS, 20 мМ HEPES и 2 мМ ЭДТА).

25 Выделенные первичные клетки определяют количественно с использованием счетчика клеток Countess, и ресуспендируют при  $2 \times 10^6$  клеток на мл в буфере FACS. Эксперименты с проточной цитометрией проводят в тот же день, что и выделение клеток, с помощью высева 50 мкл ( $\sim 0,1 \times 10^6$ ) клеток в 96-луночный планшет (Greiner # 650101). Неспецифическое связывание антител предотвращают добавлением 1 мкл Fc-блокатора (например, из BD # 553142) в течение 15 минут при 4 °C без промывания.

30 Связывание с антителами BTLA тестируют в различных концентрациях путем серийного разведения в буфере FACS. Например, очищенное антитело и

контроли, начиная с разных концентраций, сначала разбавляют до 30 мкг/мл, а серийные разведения 1:3 исходного материала проводят в общей сложности до 10 титрований (плюс необработанный контроль). Титры антител инкубируют с клетками в течение 20 минут при 4 °С и промывают буфером FACS до окрашивания. Клетки окрашивают с использованием антител, конъюгированных с флуорохромом, для идентификации конкретных типов клеток (например, CD19 В-клеток, CD4 Т-клеток или CD8 Т-клеток) или с использованием вторичного антитела для выявления наличия или отсутствия связывания антител с этим подмножеством. Окрашивание проводят в течение 20 минут при 4 °С и промывают 3 раза буфером FACS перед анализом на проточном цитометре. Результаты анализируют с использованием стандартного программного обеспечения для анализа FACS (например, FACSDiva) и сообщают как среднюю интенсивность флуоресценции вторичного антитела для каждого титрования. Положительный результат, который указывает на связывание, определяется средней интенсивностью флуоресцентного окрашивания выше фона.

Следуя процедурам, в основном, как описано выше, антитело 22B3 связывается с BTLA-экспрессирующими клетками человека, обезьяны циномогус, крысы и мыши, антитело 23C8 связывается с BTLA-экспрессирующими клетками человека и *Synomolgus*, а антитело 25F7 связывается с BTLA-экспрессирующими клетками человека, обезьяны циномогус и мыши.

#### **Антитело-агонист BTLA индуцированное фосфорилирование**

Для определения способности антител-агонистов BTLA по данному изобретению (22B3 и 25F7) индуцировать фосфорилирование тирозина в линии В-клеток человека, антитело BTLA связывают с 24-луночным культуральным планшетом при 10 мкг/мл в течение одного часа при 37 °С час. Планшет промывают ФСБ для удаления любого несвязанного антитела. Линию В-клеток, экспрессирующих BTLA человека, такую как Ramos.2G6.4C10 клеточную линию В-лимфоцита человека (ATCC), можно добавлять в лунки при  $10 \times 10^6$  клеток/мл и инкубировать при 37 °С в течение 30 мин. Клетки удаляют и лизируют в буфере для полного лизиса (MSD) и замораживают при -80 °С в течение по меньшей мере 30 минут.

Фосфорилированный-BTLA обнаруживают при помощи Meso Sector S 600. Планшеты для определения стрептавидина готовят путем инкубации в блокирующем растворе (MSD) в течение одного часа при комнатной температуре. Биотинилированное антитело для захвата BTLA (5A5) наносят на  
5 планшет в течение одного часа при комнатной температуре с последующими тремя или более стадиями трис-промывки. Клеточные лизаты инкубируют в течение двух часов при комнатной температуре. Общий BTLA детектируют с помощью антитела SULFO-TAG против BTLA (ANC6E9), а фосфорилированный BTLA измеряют с помощью антифосфотриозинового антитела SULFO-TAG (PY20; MSD) с  
10 последующими тремя или более этапами трис-промывки. Добавление 2x Read Buffer T (MSD) затем добавляют в лунки непосредственно перед анализом с использованием Meso Sector S 600.

Следуя процедурам, в основном, как описано выше, антитело 22B3 приводило к 2,44-кратному увеличению фосфорилирования тирозина BTLA по  
15 сравнению с фоном по сравнению с отрицательным контролем, а антитело 25F7 приводило к 1,47-кратному увеличению фосфорилирования тирозина BTLA по сравнению с фоном по сравнению с отрицательным контролем. Эти данные демонстрируют, что антитела-агонисты BTLA 22B3 и 25F7 способны индуцировать фосфорилирование BTLA в линии В-клеток человека.

20

### **Ингибирование пролиферации первичных В-клеток человека**

Активность антител-агонистов BTLA по данному изобретению *in vitro* оценивают по способности ингибировать пролиферацию первичных В-клеток человека. Первичные В-клетки человека выделяют из мононуклеарных клеток  
25 периферической крови здорового человека с использованием набора для выделения В-клеток человека (EasySep) и ресуспендируют в соответствующих средах первичных клеток человека. Анти-IgM наносят на планшеты вместе с титрами изотипического контроля или антителом BTLA и инкубируют в течение одного часа при 37 °C с последующей стадией промывки ФСБ. Изолированные  
30 человеческие В-клетки добавляют в каждую лунку и инкубируют в течение 72 часов при 37 °C с 5 % CO<sub>2</sub> с последующим импульсом [<sup>3</sup>H]-тимидина в течение последних 18 часов. После инкубации планшеты извлекают и помещают на сухой

лед на 30 минут, а затем хранят при -20 °С до готовности к сбору. Клетки лизируют путем оттаивания и собирают с помощью Harvester9600 (Tomtec). Пролиферацию оценивают путем измерения включения [<sup>3</sup>H]-тимидина с помощью микропланшетного счетчика MicroBeta<sup>2</sup> 2450 (Perkin Elmer).

5 Подсчеты используются для оценки относительного пролиферативного ответа в этом анализе, а процент ингибирования рассчитывается с использованием уравнения [% ингибирования = (AVGmaxsignal-signalample)/AVGmaxsignal x 100], которое можно использовать для определения значения IC<sub>50</sub> с помощью графического программного обеспечения (GraphPad Prism).

10 Следуя процедурам, в основном, как описано выше, антитело-агонист BTLA 22B3 было способно ингибировать первичную пролиферацию В-клеток *in vitro* с рассчитанной IC<sub>50</sub> 0,32 ± 0,1 нМ, антитело 23C8 было способно ингибировать первичную пролиферацию В-клеток *in vitro* с рассчитанной IC<sub>50</sub> 0,14 нМ, и антитело 25F7 было способно ингибировать первичную пролиферацию В-клеток *in vitro* с рассчитанной IC<sub>50</sub> 0,17 нМ. В аналогичном эксперименте антитело 22B3 было способно ингибировать первичную пролиферацию В-клеток с рассчитанной IC<sub>50</sub> 0,32 нМ, и антитело, имеющее тот же HCVR и LCVR, что и Mab8D5 (SEQ ID NO: 11 и 18 в патенте '694, соответственно) ингибировало первичную пролиферацию В-клеток с рассчитанной IC<sub>50</sub> 6,38 нМ. Эти данные демонстрируют, что антитела-агонисты BTLA 22B3, 23C8 и 25F7 способны ингибировать пролиферацию В-клеток *in vitro*, и что антитело 22B3 обладает большей активностью *in vitro* по сравнению с Mab8D5.

### **Гуманизированная NSG модель мыши GvHD**

25 Предотвращение заболевания трансплантат против хозяина, вызванного РВМС человека, определяется *in vivo*.

Вкратце, самок мышей NSG (JAX Labs, Stock # 05557), возрастом приблизительно 8-10 недель, нормализуют и делят на группы лечения (n = 8 мышей на группу лечения) на основании базовых измерений массы тела. Мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) выделяют из программы доноров крови (Банк крови Сан-Диего, # LRS-WBC) с использованием пробирок Ficoll (GE # 17-1440-02) и SepMate (STEMCELL # 15450) в соответствии с протоколом

производителя. РВМС ресуспендируют в количестве примерно  $150 \times 10^6$  клеток на мл ФСБ. Группы лечения ослеплены по отношению к дозированию.

В день 1 100 мкл ( $15 \times 10^6$  клеток) РВМС, суспендированных в ФСБ (как описано выше) (или 100 мкл ФСБ для не приживленных контролей), вводят внутривенно (в/в) в хвост каждой мыши. Мышам еженедельно (QW) вводят антитело по данному изобретению (22В3 или 23С8) или контроли в различных концентрациях в носителе ФСБ путем подкожных (п/к) инъекций. Три независимых исследования выполняются по существу, как описано в данном документе. Дозирующие концентрации для каждого исследования составляют [Исследование 1 (антитело 22В3): 0,1, 1,0, 5,0, 10,0 и 20,0 мг/кг; Исследование 2 (антитело 22В3 или 23С8): 0,001, 0,01, 10,0 и 100 мпк; и исследование 3: 0,001, 0,005, 0,01, 0,1, 0,5 и 1,0 мпк].

Исследование прекращают, и мышей умерщвляют до того, как животные изотипического контроля теряют 20 % от исходной массы тела (исследования 1 и 2) или день 28 (исследование 3). Массу записывают (исследование 1 и исследование 2), сыворотку собирают для анализа цитокинов (исследование 1; анализ проводят с помощью MSD ИФА; анализируются цитокины ФНО $\alpha$ , ИЛ-10, ИЛ-6, ИЛ-4, ИЛ12p70, ИЛ-13, ИЛ-2 и ИЛ-8) и селезенки собирают для фенотипирования/фармакодинамического анализа (измеренного по уменьшению популяции CD 8 Т-клеток; исследование 1 и исследование 3).

Следуя процедурам, по существу, как описано выше, были получены следующие данные.

Животные, обработанные антителом 22В3 в исследовании 1, продемонстрировали следующее (в дозах 0,1, 1,0, 5,0, 10,0 или 20,0 мг/кг антитела): (i) схожую массу тела в конце исследования по сравнению с массой тела контрольных животных без трансплантации; (ii) снижение цитокинов ФНО $\alpha$ , ИЛ-10, ИЛ-6, ИЛ-4 и ИЛ-12p70 по сравнению с животными изотипического контроля; и (iii) снижение популяции CD 8 Т-клеток по сравнению с животными изотипического контроля (фенотипирование/фармакодинамический анализ).

Данные исследования 2 демонстрируют, что мыши, получавшие 0,01 мг/кг антитела 22В3, или 1,0, 5,0 или 10,0 мг/кг антитела 23С8, имели сходные массы тела в конце исследования по сравнению с массами тела контрольных животных

без трансплантации. Исследование 2 не продемонстрировало активность 22В3 в отношении массы тела при 10,0 мг/кг, что может отражать естественную изменчивость доноров этой модели. В исследовании 3 антитело 22В3 продемонстрировало фармакодинамическую активность *in vivo* при следующих дозах антитела: 0,01, 0,1, 0,5 и 1,0 мг/кг. Взятые вместе, эти данные демонстрируют, что антитело 22В3 и антитело 23С8 были эффективными в предотвращении GvHD *in vivo*.

### **MIFN $\alpha$ -индуцированный волчаночный нефрит**

10 Модель интерферона-альфа (ИФН $\alpha$ )-индуцированного волчаночного нефрита представляет собой мышиную модель системной красной волчанки (СКВ), в которой ИФН $\alpha$  используется для синхронизации начала и ускорения прогрессирования заболевания при скрещивании с новозеландским черным и новозеландским белым (NZB/W) мышами. Мышиная модель NZB/W является классической моделью спонтанного волчаночного нефрита. Прогрессирование 15 заболевания у этих мышей может быть ускорено с помощью экзогенного введения ИФН $\alpha$  с использованием аденовирусных векторов. Эта модель волчаночного нефрита используется для демонстрации активности антител-агонистов BTLA по данному изобретению.

20 За один день до начала исследования одиннадцатинедельных самок мышей NZB/W сортируют случайным образом в зависимости от массы тела. Мышей распределяют по следующим группам лечения: (1) аденоассоциированный вирус LacZ (AAV + 10 мг/кг PAA изотипического контроля человеческого IgG4 (PAA представляет собой мутации S228P, F234A и L235A), (2) ИФН $\alpha$  AAV + 10 мг/кг PAA изотипического контроля человеческого IgG4, (3) ИФН $\alpha$  AAV + 3 мг/кг 22В3 антитела, (4) ИФН $\alpha$  AAV + 10 мг/кг 22В3 антитела или (5) ИФН $\alpha$  AAV + 50 мг/кг циклофосфамида. В день начала исследования (день 0) мышам вводят один раз  $10^{11}$  копий генома (GC) AAV, экспрессирующего ген LacZ (не больного), или мышиный ИФН $\alpha$  (больного) в ФСБ внутривенно. В группах 1-4 мыши получали 25 изотипический контроль или антитела к антителу 22В3 в ФСБ подкожно один раз в 30 неделю, начиная с дня 0. В группе 5 мыши получали циклофосфамид в ФСБ внутрибрюшинно каждые 10 дней. Образцы мочи отбирают у мышей каждые 2

недели до окончания исследования через 6 недель после начала лечения. ИФА для мышинового микроальбумина Kamiya Biomedical™ используют для количественного определения уровня альбумина в моче. Креатинин мочи измеряется с помощью ферментативного анализа креатинина (Roche Diagnostics). Альбуминурия, биомаркер почечной функции, определяется как более чем 300 мкг альбумина на мг креатинина, обнаруженного в моче.

Следуя процедурам, в основном, как описано выше, к 4-й неделе заболеваемость альбуминурией в группе с болезнью, получавшей изотип (ИФНа AAV + hIgG4 PAA), достигла 100 % и оставалась повышенной до конца исследования, в то время как мыши, не обработанные LacZ AAV (не больные), не проявляли каких-либо случаев альбуминурии. Циклофосфамид, который может быть остро нефротоксичным, вызывал кратковременное увеличение альбуминурии у больных мышей, но частота альбуминурии в группе циклофосфамида была снижена до нуля к концу исследования. Антитело 22B3 в дозе 3 мг/кг и 10 мг/кг было в состоянии снизить заболеваемость альбуминурией до 50 % и 20 %, соответственно, на 28-й день, и на 60 % и 70 %, соответственно, на 42-й день. Эти результаты показали, что антитело 22B3 способно сохранять почечную функцию в модели.

График Каплана-Мейера (данные не показаны) процентной выживаемости во время исследования показал, что почечная недостаточность в группе лечения, получавшей изотип, приводила к смерти, начиная с 28-го дня. К концу исследования выживаемость в группе лечения, получавшей изотип, составляла 60 %. Не больные и получавшие циклофосфамид группы имели 100 % выживаемость. Мыши, получавшие 10 мг/кг антитела 22B3, также показали 100 % выживаемость в конце исследования, тогда как мыши, получавшие 3 мг/кг, показали 80 % выживаемость. Эти результаты показали, что антитело 22B3 способно предотвратить смертельные исходы, связанные с заболеванием, в этой модели.

### **Имиквимод-индуцированная модель псориаза**

Протестирована способность антитела по данному изобретению ограничивать тяжесть псориазоподобного дерматита, индуцированного применением агониста TLR7/8 имиквимода (IMQ). Семинедельным самкам мышей

В6.SJL- *Ptprc<sup>a</sup> Pepc<sup>b</sup>*/BoyJ (инвентарный номер JAX: 002014) или мышей HVEM<sup>-/-</sup> (описано в Wang et al., J. Clin. Invest., 115: 3, 711-717, March 2005) внутрибрюшинно вводят 3 мг/кг или 1 мг/кг антитела 22B3 или антитела 25F7, соответственно, в день 0, и спины мышей выбривают. Животные, которым вводили изотипический контроль hIgG4, служили в качестве контроля. В дни 1-3 мышей анестезируют ингаляционным изофлюраном (VetOne), а затем наносят 5 % крем IMQ (50 мг, Fougera) на определенную область выбритой кожи. На 4-й день обработанный участок кожи иссекают и анализируют на предмет тяжести заболевания и экспрессии генов, связанных с воспалением.

10 Следуя процедурам, в основном, как описано выше, гистологический анализ продемонстрировал утолщение эпидермального слоя с паракератозом и гиперкератозом в группах, обработанных изотипическим контролем hIgG4 или антителом 22B3 1 мг/кг. У мышей, получавших 3 мг/кг антитела 22B3 или 3 мг/кг антитела 25F7, наблюдалось значительное уменьшение толщины эпидермиса, при этом некоторые участки выглядели гистологически нормальными. Экспрессию генов в коже анализировали с помощью кПЦР с использованием iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad). У мышей, получавших 3 мг/кг антитела 22B3, наблюдалось значительное снижение экспрессии ИФН типа I (ИФН  $\alpha$  , ИФН  $\beta$  ) и ИФН  $\gamma$  , а также генов ИФН-ответа (*Isg15*, *Mx1*, *Mx2*, *Oas2*). Анализ цитокинов, участвующих в установлении IMQ-индуцированного дерматита, также продемонстрировал значительное снижение экспрессии ИЛ-22 и ИЛ-23 в группе лечения антителом 22B3 3 мг/кг. Эти данные демонстрируют, что антитела-агонисты BTLA 22B3 и 25F7 способны уменьшать толщину эпидермиса в мышинной модели псориазоподобного дерматита.

25

### **Определение эпитопа**

Функциональные эпитопы антител-агонистов BTLA по данному изобретению определяют с помощью ИФА, а структурные эпитопы определяют с помощью рентгеновской кристаллографии.

30

### Методы

*ИФА: Функциональный эпитоп*

Следующий набор поверхностных мутаций ВТЛА был введен индивидуально в человеческий белок ВТЛА, слитый с (человеческим) Fc: D35R, Q37R, Y39E, R42D, Q43A, E45R, S47H, L49R, D52R, E55R, E57R, D84R, N65R, H68A, V80R, K81E, E83R, S88H, K90H, E91H, I95R, E103H, L106R, N108R, R114V, S121Y, N122R, E125H, H127E, T130R, Y132R и T134H.

Связывание 22В3 и 23С8 определяли с использованием ИФА, в котором антитело для картирования эпитопа захватывали иммобилизованным антителом против кролика и после промывки каждого мутанта ВТЛА инкубировали в виде 4-точечной 4-кратной серии разведений с захваченным антителом и детектировали с ферментом связанным с анти-человеческим Fc реагентом. Полученный сигнал сравнивали среди антител и контрольных антител. Функциональный эпитоп обычно указывал на себя резким снижением сигнала для одного или двух мутантов. Для антитела 25F7 проводили сэндвич-ИФА, в котором гуманизированный 22В3 был иммобилизован, мутанты ВТЛА были захвачены и связаны кроличьим 25F7. Это дало намного более сильный сигнал, и эпитоп 25F7 мог быть идентифицирован после удаления эпитопа 22В3.

#### *Рентгеновская кристаллография: Структурный эпитоп*

Чтобы определить взаимодействующие интерфейсы и, следовательно, физический эпитоп на ВТЛА различных антител, человеческий ВТЛА совместно кристаллизовали с Fab-частью антитела по данному изобретению и определяли кристаллическую структуру. Из полученной кристаллической структуры остатки ВТЛА в пределах 4,5 Å от любого атома антитела были подсчитаны как часть эпитопа (с использованием программного обеспечения PyMol для визуализации). 4,5 ангстрем измеряется от центра атома до центра атома. Любой остаток по меньшей мере с одним атомом, который на 4,5 ангстрем близок к любому атому в антителе, является частью эпитопа.

Две структуры 22В3 были определены в комплексе с ВТЛА человека. В первой использовалось исходное кроличье антитело 22В3 Fab, меченное гистидином и очищенное мутантом S47H (стабилизирующая мутация) человеческого ВТЛА, экспрессированного в виде слияния Fc, а затем расщепленного и очищенного. Эти два белка были смешаны в приблизительно

эквимолярном соотношении и скринированы на коммерчески доступных экранах для кристаллизации. Кристаллы были получены и дифракционные данные были собраны в Advanced Photon Source. Эти данные были уменьшены и решены путем молекулярной замены и уточнены, чтобы получить структуру комплекса с высоким разрешением между 22B3 и BTLA. Второй комплекс находился между аффинно-зрелой версией (с мутациями HC I56Q/T57H/G98A и LC S95H) гуманизованного 22B3 (Fab-часть) и BTLA человека. Они были совместно экспрессированы, очищены как комплекс и подвергнуты аналогичному скринингу. Полученная структура и эпитоп были аналогичны первой структуре.

10 Структура 23C8 в комплексе была получена так же, как и первый комплекс 22B3, а именно путем очистки His-меченого исходного Fab кролика, смешивания с мономерным S47H человеческого BTLA и кристаллизации.

Структура 25F7 в комплексе с BTLA человека была получена в соответствии со вторым комплексом 22B3, а именно путем совместной экспрессии, совместной очистки и кристаллизации. Был использован двойной мутант гуманизованного 25F7 с улучшенным связыванием с человеческим BTLA (гуманизованный 25F7, используемый для определения эпитопа, имеет мутации в HC S30W/LC E27R).

### Результаты

Антитело 22B3: Среди ряда поверхностных мутантов BTLA, R42D и H127E оказали значительное негативное влияние на связывание с антителом 22B3 кролика (содержащее те же CDR, что и 22B3, но с каркасом кролика). Функциональный эпитоп содержит Arg в положении 42 и His в положении 127 BTLA человека (SEQ ID NO: 31). Остатки BTLA, которые находятся в пределах 4,5 ангстрем от 22B3 в комплексе кристаллической структуры между BTLA человека и Fab 22B3 кролика, и является структурным эпитопом, представляют собой следующие остатки SEQ ID NO: 31: Asp в положении 35, Gln в положении 37, Arg в положении 42, Leu в положении 74, Gly в положении 76, Cys в положении 79, Arg в положении 114, Phe в положении 119, Gln в положении 120 и Asn в положении 122, Ser в положении 128. Остатки BTLA, которые находятся в пределах 4,5 ангстрем от 22B3 в комплексе кристаллической структуры между BTLA человека и вариантом 22B3 человека (HC I56Q/T57H/G98A LC S95H) Fab, представляют собой Asp в положении 35, Gln в положении 37, Arg в положении 42, Leu в положении 74, Gly в

положении 76, Cys в положении 79, Arg в положении 114, Phe в положении 119, Gln в положении 120, Asn в положении 122 и Ile в положении 124, Ser в положении 128 SEQ ID NO: 31.

В аналогичном исследовании структурным эпитопом для связывания HVEM с BTLA были следующие аминокислоты BTLA: Gln в положении 37, Arg в положении 42, Leu в положении 74, Gly в положении 76, Thr в положении 77, Ser в положении 112, Arg в положении 114, Asn в положении 118, Ser в положении 121, Ser в положении 128 и Thr в положении 130. Структурное сходство между антителом 22B3 и HVEM оценивали путем наложения кристаллической структуры антитело:BTLA на кристаллическую структуру HVEM:BTLA, выравнивая молекулы BTLA. Среднеквадратичное отклонение остова в участке HVEM, содержащем аминокислотные остатки 69-72, и соответствующем участке антитела было определено как 1,4 ангстрем.

Антитело 23C8: D52R блокирует связывание 23C8 кролика (содержащего тот же HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1 и LCDR2, что и 23C8, имеющий LCDR3 QCTYGGVVGSTSDNP и имеющий каркас кролика) с BTLA человека в ИФА. Функциональный эпитоп содержит Asp в положении 52 BTLA человека (SEQ ID NO: 31). Остатки BTLA, которые находятся в пределах 4,5 ангстрем от 23C8 в комплексе кристаллической структуры между BTLA человека (S47H) и Fab кролика 23C8 и являются структурным эпитопом, представляют собой His в положении 46, Glu в положении 55, Glu в положении 103, Pro в положении 104, Leu в положении 106, Pro в положении 107, Thr в положении 134 и Ala в положении 139 SEQ ID NO: 31. Антитело 23C8 не имитирует связывание HVEM.

Антитело 25F7: Среди ряда поверхностных мутантов BTLA, H68A и K61E оказали значительное негативное влияние на связывание с антителом 25F7 кролика (включающее те же CDR, что и 25F7, но с каркасом кролика). Функциональный эпитоп содержит His в положении 68 и Lys в положении 81 BTLA человека (SEQ ID NO: 31). Остатки BTLA, которые находятся в пределах 4,5 ангстрем от 25F7 в комплексе кристаллической структуры между BTLA человека и вариантом Fab гуманизированного 25F7 (HC S30W, LC E27R) и являются структурным эпитопом, представляют собой Thr в положении 62, Ala в положении 64, His в положении 68,

Arg в положении 85, Glu в положении 91, Phe в положении 98 и Asn в положении 118 SEQ ID NO: 31. Антитело 25F7 не имитирует связывание HVEM.

## Последовательности

### HC антитела 22B3 (SEQ ID NO: 1)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSLSSYGVSWVRQAPGQGLEWMGAISY  
5 DGITYYASWAKSRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDNAVYYCARGDYDDYVY  
VYALDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT  
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK  
VDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVDSQ  
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
10 CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD  
IAVEWESNGQPENNYKTPPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE  
ALHNHYTQKSLSLGLG

### LC антитела 22B3 (SEQ ID NO: 2)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCQASQSISTALAWYQQKPGQAPRLLIYAASLAS  
15 GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGYSSSNLDNVFGGGTKVEIKRT  
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV  
TEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

### HCVR антитела 22B3 (SEQ ID NO: 3)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSLSSYGVSWVRQAPGQGLEWMGAISY  
20 DGITYYASWAKSRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDNAVYYCARGDYDDYVY  
VYALDIWGQGTLVTVSS

### LCVR антитела 22B3 (SEQ ID NO: 4)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCQASQSISTALAWYQQKPGQAPRLLIYAASLAS  
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGYSSSNLDNVFGGGTKVEIK

### 25 HC антитела 23C8 (SEQ ID NO: 5)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDISKYNIQWVRQAPGKGLEWVGFINYG  
GSAYYASRAKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDNAVYYCARGLSNSDLWGQ  
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS  
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG  
30 PPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVDSQEDPEVQFNWY  
VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS  
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ

PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS  
LSLSLG

**LC антитела 23C8 (SEQ ID NO: 6)**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISSWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLAS  
5 GVPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQSTYGGVVGSTSDDNPFGGGKVE  
IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**HCVR антитела 23C8 (SEQ ID NO: 7)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDISKYNIQWVRQAPGKGLEWVGFINYG  
10 GSAYYASRAKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARGLSNSDLWGQ  
GTLVTVSS

**LCVR антитела 23C8 (SEQ ID NO: 8)**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISSWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLAS  
GVPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQSTYGGVVGSTSDDNPFGGGKVE  
15 IK

**HC антитела 25F7 (SEQ ID NO: 9)**

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSLSTYAMNWRQAPGQGLEWMGIISD  
DGTYYATWAKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARDAGAGGVQ  
DYLTLWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV  
20 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKV  
DKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE  
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYKC  
KVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI  
AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA  
25 LHNHYTQKSLSLSLG

**LC антитела 25F7 (SEQ ID NO: 10)**

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCQASENIYNFLAWYQQKPGQP KLLIYSASTLAS  
GVPDRFSGSGSGTDFLTISSLQAEDVAVYYCQQGSSNSNIDNPFGGGKVEIKRT  
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV  
30 TEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**HCVR антитела 25F7 (SEQ ID NO: 11)**

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFSLSSTYAMNWVRQAPGQGLEWMGIISD  
DGTYYATWAKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARDAGAGGVQ  
DYLTWLGQGLVTVSS

**LCVR антитела 25F7 (SEQ ID NO: 12)**

5 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCQASENIYNFLAWYQQKPGQPPKLLIYSASTLAS  
GVPDRFSGSGSGTDFLTISLQAEDVAVYYCQQGSSNSNIDNPFGGGTKVEIK

**HCDR1 антитела 22B3 (SEQ ID NO: 13)**

GFSLSYGVV

**HCDR1 антитела 23C8 (SEQ ID NO: 14)**

10 GFDISKYNIQ

**HCDR1 антитела 25F7 (SEQ ID NO: 15)**

GFSLSYAMN

**HCDR2 антитела 22B3 (SEQ ID NO: 16)**

AISYDGITYYASWAKS

15 **HCDR2 антитела 23C8 (SEQ ID NO: 17)**

FINYGGSAYYASRAKG

**HCDR2 антитела 25F7 (SEQ ID NO: 18)**

IISDDGTTYATWAKG

**HCDR3 антитела 22B3 (SEQ ID NO: 19)**

20 GDYYDDYVYVYALDI

**HCDR3 антитела 23C8 (SEQ ID NO: 20)**

GLSNSDL

**HCDR3 антитела 25F7 (SEQ ID NO: 21)**

DAGAGGVQDYLT

25 **LCDR1 антитела 22B3 (SEQ ID NO: 22)**

QASQSISTALA

**LCDR1 антитела 23C8 (SEQ ID NO: 23)**

QASQSISSWLS

**LCDR1 антитела 25F7 (SEQ ID NO: 24)**

30 QASENIYNFLA

**LCDR2 антитела 22B3 (SEQ ID NO: 25)**

AASTLAS

**LCDR2 антитела 23C8 (SEQ ID NO: 26)**

RASTLAS

**LCDR2 антитела 25F7 (SEQ ID NO: 27)**

SASTLAS

5 **LCDR3 антитела 22B3 (SEQ ID NO: 28)**

QQGYSSSNLDNV

**LCDR3 антитела 23C8 (SEQ ID NO: 29)**

QSTYGGVVGSTSDNP

**LCDR3 антитела 25F7 (SEQ ID NO: 30)**

10 QGSSNSNIDNP

**BTLA человека (SEQ ID NO: 31)**

MKTLPAMLGTGKLFVFFLIPYLDIWNHIGKESCDVQLYIKRQSEHSILAGDPFEL

ECPVKYCANRPHVTWCKLNGTTCVKLEDRQTSWKEEKNISFFILHFEPVLPNDN

GSYRCSANFQSNLIESHSTTLVYTDVKSASERPSKDEMASRPWLLYRLLPLGGLP

15 LLITTCFLFCCLRRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLS

ETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSVIGPNSRLARNVK

EAPTEYASICVRS

**BTLA мыши Balbс (SEQ ID NO: 32)**

MKTVPAMLGTPRLFREFFILHLGLWSILCEKATKRNDDEECEVQLNIKRNSKHS AW

20 TGELFKIECPVKYCVHRPNVTWCKHNGTIWVPLEVGPQLYTSWEENRSVPVFL

HFKPIHLSDNNGSYSCSTNFNSQVINSHSVTIHVRERTQNSSEHPLITVSDIPDATNA

SGPSTMEERPGRTWLLYTLLPLGALLLLACVCLLCFLKRIQGKEKKPSDLAGR D

TNLVDIPASSRTNHQALPSGTGIYDNDPWSSMQDESELTISLQSERNNQGIVYASL

NHCVIGRNPRQENNMQEAPTEYASICVRS

25 **BTLA мыши C57BL6 (SEQ ID NO: 33)**

MKTVPAMLGTPRLFREFFILHLGLWSILCEKATKRNDDEECPVQLTITRNSKQSART

GELFKIQCPVKYCVHRPNVTWCKHNGTICVPLEVSPQLYTSWEENQSVPVFLHF

KPIHLSDNNGSYSCSTNFNSQVINSHSVTIHVTERTQNSSEHPLITVSDIPDATNASGP

STMEERPGRTWLLYTLLPLGALLLLACVCLLCFLKRIQGK

30 EKKPSDLAGRDTNLVDIPASSRTNHQALPSGTGIYDNDPWSSMQDESELTISLQSE

RNNQGIVYASLNHCVIGRNPRQENNMQEAPTEYASICVRS

**BTLA обезьяны циномологус (SEQ ID NO: 34)**

MKTLPAMLGSGRLFVVFLIPYLDIWNHIGKESCDVQLYIKRQSYHSIFAGDPFK  
LECPVKYCAHRPQVTWCKLNGTTCVKLEGRHTSWKQEKNLSEFFILHFEPVLP  
NGSYRCSANFLSAIHESHSTTLVYTDVKSASERPSKDEMASRPWLLYSLPLGGLP  
LLITTCFCLFCFLRRHQGKQNELSDTTGREITLVDVPFKSEQTEASTRQNSQVLLS  
5 ETGIYDNEPDFCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIYASLNHSHIIGLNSRQARNVKE  
APTEYASICVRS

**Иллюстративная ДНК для экспрессии тяжелой цепи антитела 22B3 с SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 35)**

caggtgcagctggtgcagctctgggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaggcttctgcaaggcatctggattctc  
10 ctcagtagctatggagtgagctgggtgcgacaggccctggacaaggcctgagtgatggagccattagttatgatggtatta  
cactactacgcgagctgggcgaaaagcagagtcaccatgaccaggacacgtccacgagcacagtctacatggagctgagcag  
cctgagatctgaggacacggcctgtattactgtgcgagaggggactactacgatgattatgtttatgtttatgctttagacatctgg  
ggccagggcaccctggtcaccgtctcctcagcttctaccaagggccatcggtcttccgctagcgcctgctccaggagcacc  
tccgagagcacagccgctgggctgctggtcaaggactactccccgaaccggtgacggtgctgctggaactcaggcgcct  
15 gaccagcggcgtgcacacctcccggtgtctacagctcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccag  
cagcttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaagccagcaaacaccaaggtggacaagagagttgagtcaaaa  
tatggtccccatgccaccctgccagcacctgaggccgccggggaccatcagcttctctgttcccccaaaaccaagga  
cactctcatgatctcccggaccctgaggtcacgtgcgtggtggtggacgtgagccaggaagaccccagggtccagtcaactg  
gtacgtggatggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagc  
20 gtcctcaccgtctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaaggcctcccgtcctccatc  
gagaaaaccatctccaaagccaaaggcagccccgagagccacaggtgtacacctgccccatcccaggaggagatgacc  
aagaaccaggctcagcctgacctgcctggtcaaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggaaagcaatgggcagc  
cggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttctctctacagcaggtaaccgtggacaaga  
gaggtggcaggagggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacagaagagcctctccc  
25 tgtctctgggt

**Иллюстративная ДНК для экспрессии легкой цепи антитела 22B3 с SEQ ID NO: 2 (SEQ ID NO: 36)**

Gaaattgtgtgacgcagctccaggcaccctgtctttgtctccaggggaaagaccacctctctgcccaggccagtcagagc  
30 attagtagctcattagcctggtaccagcagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatgctgcatcactctggcatctgg  
catcccagacaggttcagtggcagtggtctgggacagactcactctcaccatcagcagactggagcctgaagattttgagtg  
tattactgtcaacagggttatagtagtagtaacttgataatgtttcggcggaggaccacaaaggtggagatcaaacggaccgtggct

gcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgtgaataacttctatccc  
agagaggccaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagc  
aaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaaagcagactacgagaaacacaagcttacgcctgcgaa  
gtcaccatcagggcctgagctcgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagtgc

5

**Иллюстративная ДНК для экспрессии тяжелой цепи антитела 23С8 с SEQ ID NO: 5 (SEQ ID NO: 37)**

gaggtgcagctggtggagtctggggaggcttgggtccagcctggagggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcgac  
atcagtaagtaacaatccaatgggtccgccaggctccaggaaggggctggagtgggttggcttcattaattatggtgtagcg  
10 catactacgcgagccggggcgaaggcagattcaccatctcaagagatgattcaaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcct  
gaaaaccgaggacacggccgtgtattactgtgctagaggactaagtaatagcgacctctggggccagggcaccctggtcaccg  
tctcctcagcttctaccaagggcccatcggcttcccgtagcgcctctcctcaggagcacctccgagagcacagccgcctgg  
gctgcctggtcaaggactactccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacctc  
ccggctgtcctacagtctcaggactctactcctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacgaagacctac  
15 acctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagtccaatatggtccccatgcccaccctg  
cccagcacctgaggccggggggaccatcagcttctcttcccccaaaaccaaggacactctcatgatctcccggacccc  
tgaggtcacgtgcgtggtggtggacgtgagccaggaagaccccagggtccagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtg  
cataatgccaagacaagccgcgggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccagg  
actggctgaacggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaaggcctcccgtcctccatcgagaaaaccatctcaaagcc  
20 aaagggcagccccgagagccacaggtgtacacctgccccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacc  
tgcttggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggaaagcaatgggcagccggagaacactacaagacca  
cgctcccgtgctggactccgacggctccttctcctctacagcaggctaaccgtggacaagagcaggtggcaggaggggaat  
gtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacagaagagcctctcctgtctctgggt

25 **Иллюстративная ДНК для экспрессии легкой цепи антитела 23С8 с SEQ ID NO: 6 (SEQ ID NO: 38)**

gacatccagatgaccagctccatcctcctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccaggccagtcagagca  
ttagtagttggttatcctggatcagcagaaaccagggaaagcccctaagctcctgatctacaggcatcactctggcatctggg  
gtccatcaagggtcagtggaagtggatctgggacagattttactttcaccatcagcagcctgcagcctgaagatattgcaacat  
30 tactgtcaatccacttatggtggtgttggcagtagttagataatccttccggcggaggaccgaaggtggagatcaaacg  
gaccgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctga  
aacttctatcccagagaggccaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacaga

gcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaaagcagactacgagaaacacaaagtcta  
cgctcggaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagtgc

**Иллюстративная ДНК для экспрессии тяжелой цепи антитела 25F7 с SEQ ID NO: 9 (SEQ ID NO: 39)**

5

caggtgcagctggtgagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtttctgcaaggcatctggattctcc  
ctcagtacctatgcaatgaactgggtgacagggcccctggacaagggcctgagtgatgggaatcattagtgatgatgtacca  
cactactacgcgacctgggcaaaaggcagagtcacccatgaccagggacacgtccacgagcacagtctacatggagctgagcag  
cctgagatctgaggacacggcctgtattactgtgcgagagatgctggtgctggtggtgtccaagactacttaaccttgggggc  
10 cagggcaccctggtcaccgtctctcagcttctaccaagggccatcggtcttcccgtagcgcctgctccaggagcacctcc  
gagagcacagccgcctgggctgcctggtaaggactactccccgaaccggtgacgggtgctggaactcaggcgcctga  
ccagcggcgtgcacacctcccggctgtctacagctctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacctgccctccagca  
gcttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaaacaccaaggtggacaagagagttgagccaatat  
ggtccccatgccaccctgccagcacctgaggccgcccggggaccatcagcttctgtcccccaaaaccaaggacac  
15 tctcatgatctccggaccctgaggtcacgtgctggtggtggacgtgagccaggaagaccccagggtccagttcaactggta  
cgtggatggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagttcaacagcacgtaccgtggtgagcgtc  
ctcaccgtctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtcaaggtctccaacaaaaggcctcccgtcctccatcga  
gaaaacctctccaaagccaaaggcagccccgagagccacaggtgtacacctgccccatcccaggaggagatgaccaa  
gaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggaaagcaatgggcagccc  
20 gagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttctctctacagcaggtaaccgtggacaagagc  
aggtggcaggaggggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacagaagagcctctccctgt  
ctctgggt

10

15

20

**Иллюстративная ДНК для экспрессии легкой цепи антитела 25F7 с SEQ ID NO: 10 (SEQ ID NO: 40)**

25

Gacatcgtgatgaccagctccagactccctggctgtgtctctgggcgagagggccaccatcaactgccaggccagtgagaa  
tattacaacttttggcctggtaccagcagaaaccaggacagcctcctaagctgctcattactctgcatccactctggcatctggg  
gtccctgaccgattcagtggcagcgggtctgggacagatttactctcaccatcagcagcctgcaggtgaagatgtggcagttt  
attactgtcaacaggggtctagtaatagtaatattgataatccttccggcggaggaccacaaggtggagatcaaacggaccgtggct  
30 gcaccatctgtcttcatctcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgctctgtgtgctgctgtaataacttctatccc  
agagaggccaaagtagcagtggaaggtggataacgcctccaatcgggtaactcccaggagagtgatcaacagagcaggacagc

30

aaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaa  
gtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagctcaacaggggagagtgc

**HVEM человека (SEQ ID NO: 41)**

5 MEPPGDWGPPPWRSTPKTDVLRLLVLYLTFLGAPCYAPALPSCKEDEYPVGSECCP  
KCSPGYRVKEACGELTGTVCEPCPPGTYIAHLNGLSKCLQCQMCDPAMGLRASR  
NCSRTENAVCGCSPGHFCIVQDGDHCAACRAYATSSPGQRVQKGGTESQDTLCQ  
NCPPGTFSPNGTLEECQHQTCSWLVTKAGAGTSSSHWVWWFLSGSLVIVIVCS  
TVGLIICVKRRKPRGDVVKVIVSVQRKRQEAEGEATVIEALQAPPDVTTVAVEETI  
10 PSFTGRSPNH

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое связывает BTLA, содержащее HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, HCDR2, имеющий  
5 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.
- 10 2. Антитело по п. 1, содержащее переменный участок тяжелой цепи (HCVR), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и переменный участок легкой цепи (LCVR), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.
3. Антитело по п. 1 или п. 2, содержащее тяжелую цепь (HC), имеющую  
15 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и легкую цепь (LC), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.
4. Антитело по любому из пп. 1-3, содержащее две HC и две LC, где каждая HC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и каждая легкая цепь (LC) имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.
- 20 5. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1-4 и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или наполнителей.
6. Способ лечения пациента с ревматическим, нейронным и/или  
дерматологическим заболеванием, включающий введение эффективного  
25 количества антитела по любому из пп. 1-4.
7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что ревматическим заболеванием является по меньшей мере одно из волчаночного нефрита, системной красной волчанки и ревматоидного артрита.
8. Способ по п. 6, отличающийся тем, что дерматологическим заболеванием  
30 является по меньшей мере одно из атопического дерматита и псориаза.
9. Способ по п. 6, отличающийся тем, что нейронным заболеванием является рассеянный склероз.

10. Антитело по любому из пп. 1-4 для применения в терапии.
11. Антитело по любому из пп. 1-4 для применения при лечении одного или более из ревматического, нейронного и дерматологического заболевания.
12. Антитело по п. 11, отличающееся тем, что ревматическим заболеванием является по меньшей мере одно из волчаночного нефрита, системной красной волчанки и ревматоидного артрита.
- 5
13. Антитело по п. 11, отличающееся тем, что дерматологическим заболеванием является по меньшей мере одно из атопического дерматита и псориаза.
14. Антитело по п. 11, отличающееся тем, что нейронным заболеванием является
- 10 рассеянный склероз.
15. Применение антитела по любому из пп. 1-4 в производстве лекарственного средства для лечения одного или более из ревматического, нейронного и дерматологического заболевания.
16. Применение антитела по п. 15, отличающееся тем, что ревматическим
- 15 заболеванием является по меньшей мере одно из волчаночного нефрита, системной красной волчанки и ревматоидного артрита.
17. Применение антитела по п. 15, отличающееся тем, что дерматологическим заболеванием является по меньшей мере одно из атопического дерматита и псориаза.
- 20
18. Применение антитела по п. 15, отличающееся тем, что нейронным заболеванием является рассеянный склероз.
19. Фармацевтическая композиция для применения при лечении состояния, выбранного из волчаночного нефрита, системной красной волчанки и ревматоидного артрита, содержащая эффективное количество антитела по любому
- 25 из пп. 1-4.
20. Фармацевтическая композиция для применения при лечении состояния, выбранного из атопического дерматита и псориаза, содержащая эффективное количество антитела по любому из пп. 1-4.
21. Фармацевтическая композиция для применения при лечении рассеянного
- 30 склероза, содержащая эффективное количество антитела по любому из пп. 1-4.
22. Молекула ДНК, содержащая полинуклеотид, который кодирует тяжелую цепь антитела, которая задана аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1.

23. Молекула ДНК, содержащая полинуклеотид, который кодирует легкую цепь антитела, которая задана аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2.
24. Молекула ДНК, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь антитела, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и полинуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь антитела, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.
25. Молекула ДНК по п. 24, отличающаяся тем, что полинуклеотидная последовательность, кодирующая тяжелую цепь антитела, представляет собой SEQ ID NO: 35, а полинуклеотидная последовательность, кодирующая легкую цепь антитела, представляет собой SEQ ID NO: 36.
26. Клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК по п. 22 и молекулу ДНК по п. 23, отличающаяся тем, что клетка способна экспрессировать антитело, содержащее две тяжелые цепи и две легкие цепи, где аминокислотная последовательность каждой тяжелой цепи задана SEQ ID NO: 1, и аминокислотная последовательность каждой легкой цепи задана SEQ ID NO: 2.
27. Клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК по п. 24 или п. 25, отличающаяся тем, что клетка способна экспрессировать антитело, содержащее две тяжелые цепи и две легкие цепи, где аминокислотная последовательность каждой тяжелой цепи задана SEQ ID NO: 1 и аминокислотная последовательность каждой легкой цепи задана SEQ ID NO: 2.
28. Способ получения антитела, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность каждой из двух HC представляет собой SEQ ID NO: 1, а аминокислотная последовательность каждой из двух LC представляет собой SEQ ID NO: 2, и отличающийся тем, что указанный способ включает: а) культивирование клетки млекопитающего по п. 26 или п. 27 в условиях, при которых антитело экспрессируется, и б) выделение экспрессированного антитела.
29. Антитело, которое возможно получить способом по п. 28.
30. Антитело, которое связывает BTLA, содержащее HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, LCDR2, имеющий

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

31. Антитело по п. 30, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи (HCVR), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и вариабельный  
5 участок легкой цепи (LCVR), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

32. Антитело по п. 30 или п. 31, содержащее тяжелую цепь (HC), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и легкую цепь (LC), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

10 33. Антитело по любому из пп. 30-32, содержащее две HC и две LC, где каждая HC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и каждая легкая цепь (LC) имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

34. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 30-33 и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или  
15 наполнителей.

35. Способ лечения пациента с ревматическим, нейронным и/или дерматологическим заболеванием, включающий введение эффективного количества антитела по любому из пп. 30-33.

36. Способ по п. 35, отличающийся тем, что ревматическим заболеванием является  
20 по меньшей мере одно из волчаночного нефрита, системной красной волчанки и ревматоидного артрита.

37. Способ по п. 35, отличающийся тем, что дерматологическим заболеванием является по меньшей мере одно из атопического дерматита и псориаза.

38. Способ по п. 35, отличающийся тем, что нейронным заболеванием является  
25 рассеянный склероз.

39. Антитело по любому из пп. 30-33 для применения в терапии.

40. Антитело по любому из пп. 30-33 для применения при лечении одного или более из ревматического, нейронного и дерматологического заболевания.

41. Антитело по п. 40, отличающееся тем, что ревматическим заболеванием  
30 является по меньшей мере одно из волчаночного нефрита, системной красной волчанки и ревматоидного артрита.

42. Антитело по п. 40, отличающееся тем, что дерматологическим заболеванием является по меньшей мере одно из atopического дерматита и псориаза.
43. Антитело по п. 40, отличающееся тем, что нейронным заболеванием является рассеянный склероз.
- 5 44. Применение антитела по любому из пп. 30-33 в производстве лекарственного средства для лечения одного или более из ревматического, нейронного и дерматологического заболевания.
45. Применение антитела по п. 44, отличающееся тем, что ревматическим заболеванием является по меньшей мере одно из волчаночного нефрита, системной  
10 красной волчанки и ревматоидного артрита.
46. Применение антитела по п. 44, отличающееся тем, что дерматологическим заболеванием является по меньшей мере одно из atopического дерматита и псориаза.
47. Применение антитела по п. 44, отличающееся тем, что нейронным заболеванием  
15 является рассеянный склероз.
48. Фармацевтическая композиция для применения при лечении состояния, выбранного из волчаночного нефрита, системной красной волчанки и ревматоидного артрита, содержащая эффективное количество антитела по любому из пп. 30-33.
- 20 49. Фармацевтическая композиция для применения при лечении состояния, выбранного из atopического дерматита и псориаза, содержащая эффективное количество антитела по любому из пп. 30-33.
50. Фармацевтическая композиция для применения при лечении рассеянного склероза, содержащая эффективное количество антитела по любому из пп. 30-33.
- 25 51. Молекула ДНК, содержащая полинуклеотид, который кодирует тяжелую цепь антитела, которая обеспечивается аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5.
52. Молекула ДНК, содержащая полинуклеотид, который кодирует легкую цепь антитела, которая обеспечивается аминокислотной последовательностью SEQ ID  
30 NO: 6.
53. Молекула ДНК, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь антитела, имеющую аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 5, и полинуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь антитела, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

54. Молекула ДНК по п. 53, отличающаяся тем, что полинуклеотидная последовательность, кодирующая тяжелую цепь антитела, представляет собой SEQ ID NO: 37, а полинуклеотидная последовательность, кодирующая легкую цепь антитела, представляет собой SEQ ID NO: 38.

55. Клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК по п. 51 и молекулу ДНК по п. 52, отличающаяся тем, что клетка способна экспрессировать антитело, содержащее две тяжелые цепи и две легкие цепи, где аминокислотная последовательность каждой тяжелой цепи задана SEQ ID NO: 5, и аминокислотная последовательность каждой легкой цепи задана SEQ ID NO: 6.

56. Клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК по п. 53 или п. 54, отличающаяся тем, что клетка способна экспрессировать антитело, содержащее две тяжелые цепи и две легкие цепи, где аминокислотная последовательность каждой тяжелой цепи задана SEQ ID NO: 5 и аминокислотная последовательность каждой легкой цепи задана SEQ ID NO: 6.

57. Способ получения антитела, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность каждой из двух HC представляет собой SEQ ID NO: 5, а аминокислотная последовательность каждой из двух LC представляет собой SEQ ID NO: 6, и отличающийся тем, что указанный способ включает: а) культивирование клетки млекопитающего по п. 55 или п. 56 в условиях, при которых антитело экспрессируется, и б) выделение экспрессированного антитела.

58. Антитело, которое возможно получить способом по п. 57.

59. Антитело, которое связывает BTLA, содержащее HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

60. Антитело по п. 59, содержащее переменный участок тяжелой цепи (HCVR), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и переменный

участок легкой цепи (LCVR), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

- 5 61. Антитело по п. 59 или п. 60, содержащее тяжелую цепь (HC), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и легкую цепь (LC), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.
62. Антитело по любому из пп. 59-61, содержащее две HC и две LC, где каждая HC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и каждая легкая цепь (LC) имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.
- 10 63. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 59-62 и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или наполнителей.
64. Способ лечения пациента с ревматическим, нейронным и/или дерматологическим заболеванием, включающий введение эффективного количества антитела по любому из пп. 59-62.
- 15 65. Способ по п. 64, отличающийся тем, что ревматическим заболеванием является по меньшей мере одно из волчаночного нефрита, системной красной волчанки и ревматоидного артрита.
66. Способ по п. 64, отличающийся тем, что дерматологическим заболеванием является по меньшей мере одно из атопического дерматита и псориаза.
- 20 67. Способ по п. 64, отличающийся тем, что нейронным заболеванием является рассеянный склероз.
68. Антитело по любому из пп. 59-62 для применения в терапии.
69. Антитело по любому из пп. 59-62 для применения при лечении одного или более из ревматического, нейронного и дерматологического заболевания.
- 25 70. Антитело по п. 69, отличающееся тем, что ревматическим заболеванием является по меньшей мере одно из волчаночного нефрита, системной красной волчанки и ревматоидного артрита.
71. Антитело по п. 69, отличающееся тем, что дерматологическим заболеванием является по меньшей мере одно из атопического дерматита и псориаза.
- 30 72. Антитело по п. 69, отличающееся тем, что нейронным заболеванием является рассеянный склероз.

73. Применение антитела по любому из пп. 59-62 в производстве лекарственного средства для лечения одного или более из ревматического, нейронного и дерматологического заболевания.
- 5 74. Применение антитела по п. 73, отличающееся тем, что ревматическим заболеванием является по меньшей мере одно из волчаночного нефрита, системной красной волчанки и ревматоидного артрита.
75. Применение антитела по п. 73, отличающееся тем, что дерматологическим заболеванием является по меньшей мере одно из атопического дерматита и псориаза.
- 10 76. Применение антитела по п. 73, отличающееся тем, что нейронным заболеванием является рассеянный склероз.
77. Фармацевтическая композиция для применения при лечении состояния, выбранного из волчаночного нефрита, системной красной волчанки и ревматоидного артрита, содержащая эффективное количество антитела по любому
- 15 из пп. 59-62.
78. Фармацевтическая композиция для применения при лечении состояния, выбранного из атопического дерматита и псориаза, содержащая эффективное количество антитела по любому из пп. 59-62.
79. Фармацевтическая композиция для применения при лечении рассеянного
- 20 склероза, содержащая эффективное количество антитела по любому из пп. 59-62
80. Молекула ДНК, содержащая полинуклеотид, который кодирует тяжелую цепь антитела, которая обеспечивается аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9.
81. Молекула ДНК, содержащая полинуклеотид, который кодирует легкую цепь
- 25 антитела, которая обеспечивается аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10.
82. Молекула ДНК, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь антитела, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и полинуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую
- 30 цепь антитела, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.
83. Молекула ДНК по п. 82, отличающаяся тем, что полинуклеотидная последовательность, кодирующая тяжелую цепь антитела, представляет собой SEQ

ID NO: 39, а полинуклеотидная последовательность, кодирующая легкую цепь антитела, представляет собой SEQ ID NO: 40.

84. Клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК по п. 80 и молекулу ДНК по п. 81, отличающаяся тем, что клетка способна экспрессировать антитело, содержащее две тяжелые цепи и две легкие цепи, где аминокислотная последовательность каждой тяжелой цепи задана SEQ ID NO: 9, и аминокислотная последовательность каждой легкой цепи задана SEQ ID NO: 10.

85. Клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК по п. 82 или п. 83, отличающаяся тем, что клетка способна экспрессировать антитело, содержащее две тяжелые цепи и две легкие цепи, где аминокислотная последовательность каждой тяжелой цепи задана SEQ ID NO: 9 и аминокислотная последовательность каждой легкой цепи задана SEQ ID NO: 10.

86. Способ получения антитела, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность каждой из двух HC представляет собой SEQ ID NO: 9, а аминокислотная последовательность каждой из двух LC представляет собой SEQ ID NO: 10, и отличающийся тем, что указанный способ включает: а) культивирование клетки млекопитающего по п. 84 или п. 85 в условиях, при которых антитело экспрессируется, и б) восстановление экспрессированного антитела.

87. Антитело, которое возможно получить способом по п. 86.