

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **043345**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.05.16**

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

**(21)** Номер заявки  
**201992460**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2018.05.11**

---

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

---

**(31)** **62/508,510**

**(32)** **2017.05.19**

**(33)** **US**

**(43)** **2020.03.18**

**(86)** **PCT/US2018/032218**

**(87)** **WO 2018/213113 2018.11.22**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Атвелл Шейн Круммен, Обунгу  
Виктор Х., Вендел Эндрю Чарльз (US)**

**(74)** Представитель:  
**Гизатуллина Е.М., Угрюмов В.М.,  
Христофоров А.А., Гизатуллин Ш.Ф.,  
Костюшенкова М.Ю., Строкова О.В.  
(RU)**

**(56)** **WO-A1-2011014438**

**WO-A1-2016176583**

**WO-A1-2017096017**

**GOVINDARAJAN THANGAVELU ET AL.:**  
"Divide and conquer: Blocking graft versus host but not graft versus leukemia T cells with agonist BTLA co-inhibitory signals", **CHIMERISM**, vol. 2, № 1, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 29-32, XP055485262, ISSN: 1938-1956, DOI: 10.4161/chim.15083, abstract, page 30, paragraph 2, page 31, paragraph 2

**OTSUKI N. ET AL.:** "Expression and function of the B and T lymphocyte attenuator (BTLA/CD272) on human T cells", **BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS**, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 344, № 4, 16 June 2006 (2006-06-16), pages 1121-1127, XP024925008, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/J.BBRC.2006.03.242 [retrieved on 2006-06-16], the whole document

**JÖRN C. ALBRING ET AL.:** "Targeting of B and T lymphocyte associated (BTLA) prevents graft-versus-host disease without global immunosuppression", **THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE**, vol. 207, № 12, 22 November 2010 (2010-11-22), XP055360411, US, ISSN: 0022-1007, DOI: 10.1084/jem.20102017, the whole document

---

**(57)** Предлагаются антитела, которые связывают ВТЛА, фармацевтическая композиция, содержащая эти антитела, и применение указанных антител и композиции, причем указанные антитела пригодны в качестве агентов для лечения состояний, связанных с аутоиммунными заболеваниями, включая ревматические, дерматологические заболевания и рассеянный склероз. Предложены также молекулы ДНК, кодирующие указанные антитела.

---

**B1**

**043345**

**043345 B1**

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 (мышь MRL-lpr), мыши с дефицитом ВТЛА имеют более выраженную лимфоцитарную инфильтрацию в слюнных железах, легких, поджелудочной железе, почках и суставах по сравнению с мышами, экспрессирующими ВТЛА. Следовательно, антитела-агонисты ВТЛА могут быть полезны для пациентов с аутоиммунными заболеваниями, такими как волчанка.

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

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

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

Данные изобретения обеспечивают антитела, которые связываются с ВТЛА и активируют и/или усиливают ВТЛА-опосредованный сигналинг (антитело-агонист ВТЛА). 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 после-

довательность 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 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 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.

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, 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 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 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.

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 циномогус и мыши.

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

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 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.

В данном изобретении также предложено антитело по данному изобретению или его фармацевтическая композиция для применения в терапии. В некоторых вариантах осуществления изобретения дан-





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 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 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 включает антитело, получаемое способом по изобретению, как описано непосредственно выше.

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

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).

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 позиции 134, Ala в позиции 139.

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, Asn в положении 122, и Ile в положении 124, Ser в положении 128.

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 вариативный 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"). 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. Т.е. CDR содержат большую часть остатков, кото-

рые 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 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, № 91-3242 (1991)); и Chothia (Chothia C., Lesk A.M., Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins, J. Mol. Biol., 1987, 196:901-17; Chothia C., Lesk A.M., Tramontano A., Levitt M., Smith-Gill S.J., Air G., Sheriff S., Padlan E.A., Davies D., Tulip W.R. 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 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 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 использованием известных способов. Например, последовательности к ДНК 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 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 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 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 мультимеры можно эффективно удалять обычными способами, включая эксклюзионную, с гидрофобным взаимодействием, ионообменную или гидроксиапатитную хроматографию. Продукт можно незамедлительно замораживать, например, при -70°C 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 антитело 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

- (а) ингибирование дальнейшего развития заболевания; и  
 (б) облегчение заболевания, т.е. 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 мышинового 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 гистицином. 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.

### 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 FIEK 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 pH (например, от 20 mM Трис-буфера, pH 7,0, до 10 mM цитратного натриевого буфера, pH 3,0, или от фосфатно-солевого буферного раствора, pH от 7,4, до 100 mM глицинового буфера, pH 3,0). 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 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°C или можно лиофилизировать. Аминокислотные SEQ ID 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

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 Healthcare). Аффинность связывания измеряют путем иммобилизации BTLA-белка около 120 RU (человека, крысы, мыши (Balbc или C57BL6) или BTLA обезьяны циномоглус) 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°C в буфере HBS-EP (GE Healthcare BR100669; 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,05% поверхностно-активного вещества P20, pH 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 мин. Поверхность чипа регенерируют с 5 мкл инъекции глицинового буфера при pH 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 соблюдены следующие параметры (показанные в табл. 2). Данные, представленные ниже, представляют собой среднее из трех экспериментов для человека, цино, крысы и мыши для 22B3.



Таблица 2

Аффинность и кинетика связывания				
Антитело	Антиген (ВТЛА)	K <sub>оп</sub> (1/Мс)	K <sub>оф</sub> (1/с)	K <sub>D</sub> (нМ)
22В3	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
23С8	Крыса	2,10E + 06	4,62E-02	24,1
	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
25F7	Мышиные (C57BL6)	Без связывания	Без связывания	Без связывания
	Крыса	Не тестировано	Не тестировано	Не тестировано
	Человек	6,8622E + 04	1,42E-02	206,2 (n = 2)
	Цино	Не тестировано	Не тестировано	Не тестировано
25F7	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 табл. 2, антитела-агонисты ВТЛА по данному изобретению связывают ВТЛА. В частности, антитело 22В3 способно связывать ВТЛА человека, мыши и макаки циномогус.

Связывание с первичными клетками.

Способность антител ВТЛА по данному изобретению (22В3, 23С8 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).

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 мин 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).

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  $50 \text{ мкл}$  ( $\sim 0,1 \times 10^6$ ) клеток в 96-луночный планшет (Greiner # 650101). Неспецифическое связывание антител предотвращают добавлением  $1 \text{ мкл}$  Fc-блокатора (например, из BD # 553142) в течение 15 мин при  $4^\circ\text{C}$  без промывания.

Связывание с антителами ВТЛА тестируют в различных концентрациях путем серийного разведения в буфере FACS. Например, очищенное антитело и контроли, начиная с разных концентраций, сначала разбавляют до  $30 \text{ мкг/мл}$ , 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 мин при  $4^\circ\text{C}$  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 мин при  $4^\circ\text{C}$  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 22В3 связывается с ВТЛА-экспрессирующими клетками человека, обезьяны циномогус, крысы и мыши, антитело 23С8 связывается с ВТЛА-экспрессирующими клетками человека и Cynomolgus, а антитело 25F7 связывается с

ВТЛА-экспрессирующими клетками человека, обезьяны циномогус и мыши.

Антитело-агонист ВТЛА индуцированное фосфорилирование.

Для определения способности антител-агонистов ВТЛА по данному изобретению (22В3 и 25F7) индуцировать фосфорилирование тирозина в линии В-клеток человека антитело ВТЛА связывают с 24-луночным культуральным планшетом при 10 мкг/мл в течение одного часа при 37°C час. Планшет промывают ФСБ для удаления любого несвязанного антитела. Линию В-клеток, экспрессирующих ВТЛА человека, такую как Ramos.2G6.4C10 клеточную линию В-лимфоцита человека (АТСС), можно добавлять в лунки при  $10 \times 10^6$  клеток/мл и инкубировать при 37°C в течение 30 мин. Клетки удаляют и лизируют в буфере для полного лизиса (MSD) и замораживают при -80°C в течение по меньшей мере 30 мин.

Фосфорилированный-ВТЛА 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 ВТЛА (5A5) наносят на планшет в течение одного часа при комнатной температуре с последующими тремя или более стадиями трис-промывки. Клеточные лизаты инкубируют в течение 2 ч при комнатной температуре. Общий ВТЛА детектируют с помощью антитела SULFO-TAG против ВТЛА (ANC6E9), а фосфорилированный ВТЛА измеряют с помощью антифосфотриозинового антитела SULFO-TAG (PY20; MSD) с 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 22В3 приводило к 2,44-кратному увеличению фосфорилирования тирозина ВТЛА по сравнению с фоном по сравнению с отрицательным контролем, а антитело 25F7 приводило к 1,47-кратному увеличению фосфорилирования тирозина ВТЛА по сравнению с фоном по сравнению с отрицательным контролем. Эти данные демонстрируют, что антитела-агонисты ВТЛА 22В3 и 25F7 способны индуцировать фосфорилирование ВТЛА в линии В-клеток человека.

Ингибирование пролиферации первичных В-клеток человека.

Активность антител-агонистов ВТЛА по данному изобретению *in vitro* оценивают по способности ингибировать пролиферацию первичных В-клеток человека. Первичные В-клетки человека выделяют из мононуклеарных клеток 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 ВТЛА и инкубируют в течение одного часа при 37°C с последующей стадией промывки ФСБ. Изолированные человеческие В-клетки добавляют в каждую лунку и инкубируют в течение 72 ч при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> с последующим импульсом [<sup>3</sup>H]-тимидина в течение последних 18 ч. После инкубации планшеты извлекают и помещают на сухой лед на 30 мин, а затем хранят при -20°C до готовности к сбору. Клетки лизируют путем оттаивания и собирают с помощью Harvester 9600 (Tomtec). Пролиферацию оценивают путем измерения включения [<sup>3</sup>H]-тимидина с помощью микропланшетного счетчика MicroBeta<sup>2</sup> 2450 (Perkin Elmer).

Подсчеты используются для оценки относительного пролиферативного ответа в этом анализе, а процент ингибирования рассчитывается с использованием уравнения

$$[\% \text{ ингибирования} = (\text{AVGmaxsignal} - \text{signalample}) / (\text{AVGmaxsignal} - \text{signalblank}) \times 100],$$

которое можно использовать для определения значения IC<sub>50</sub> с помощью графического программного обеспечения (GraphPad Prism).

Следуя процедурам, в основном, как описано выше, антитело-агонист ВТЛА22В3 было способно ингибировать первичную пролиферацию В-клеток *in vitro* с рассчитанной IC<sub>50</sub> 0,32±0,1 нМ, антитело 23С8 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 22В3 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 ВТЛА 22В3, 23С8 и 25F7 способны ингибировать пролиферацию В-клеток *in vitro*, и что антитело 22В3 обладает большей активностью *in vitro* по сравнению с Mab8D5.

Гуманизированная NSG модель мыши GvHD.

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 дозировке

нию.

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 CD8 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.

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 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.

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 изотипический контроль или антитела к антителу 22В3 в ФСБ подкожно один раз в неделю, начиная с дня 0. В группе 5 мыши получали циклофосфамид в ФСБ внутривенно каждые 10 дней. Образцы мочи отбирают у мышей каждые 2 недели до окончания исследования через 6 недель после начала лечения. ИФА для мышиного 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 (ИФН $\alpha$  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 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%. Небольные 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 B6.SJL-Ptprc<sup>a</sup> Pepc<sup>b</sup>/BoyJ (инвентарный номер JAX: 002014) или мышью HVEM<sup>-/-</sup> (описано в Wang et al., J. Clin. Invest., 115:3, 711-717, March 2005) внутрибрюшинно вводят 3 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 мышью 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.

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 мышью, 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 мышью, 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 мышшиной модели псориазоподобного дерматита.

Определение эпитопа.

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

Методы.

ИФА: функциональный эпитоп.

Следующий набор поверхностных мутаций BTLA был введен индивидуально в человеческий белок BTLA, 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 22B3 и 23C8 определяли с использованием ИФА, в котором антитело для картирования эпитопа захватывали иммобилизованным антителом против кролика и после промывки каждого мутанта BTLA инкубировали в виде 4-точечной 4-кратной серии разведений с захваченным антителом и детектировали с ферментом связанным с античеловеческим 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 22B3 был иммобилизован, мутанты BTLA были захвачены и связаны кроличьим 25F7. Это дало намного более сильный сигнал, и эпитоп 25F7 мог быть идентифицирован после удаления эпитопа 22B3.

Рентгеновская кристаллография: структурный эпитоп.

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

Две структуры 22B3 были определены в комплексе с BTLA человека. В первой использовалось исходное кроличье антитело 22B3 Fab, меченное гистидином и очищенное мутантом S47H (стабилизи-

рующая мутация) человеческого BTLA, экспрессированного в виде слияния Fc, а затем расщепленного и очищенного. Эти два белка были смешаны в приблизительно эквимольном 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) гуманизированного 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.

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 гуманизированного 25F7 с улучшенным связыванием с человеческим BTLA (гуманизированный 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 Å от 22B3 в комплексе кристаллической структуры между BTLA человека и Fab 22B3 кролика, и являются структурным эпитопом, представляют собой следующие остатки SEQ ID NO: 31. Asp в положении 35, Gln в положении 37 до Arg в положении 42, Leu в положении 74, Gly в положении 76 до Cys в положении 79, Arg в положении 114, Phe в положении 119, Gln в положении 120 и Asn в положении 122 до Ser в положении 128. Остатки BTLA, которые находятся в пределах 4,5 Å от 22B3 в комплексе кристаллической структуры между BTLA человека и вариантом 22B3 человека (HC I56Q/T57H/G98A LC S95H), представляют собой Asp в положении 35, Gln в положении 37 и Arg в положении 42, Leu в положении 74, Gly в положении 76 и 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 до 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 до 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 до Ser в положении 128, и Thr в положении 130. Структурное сходство между антителом 22B3 и HVEM оценивали путем наложения кристаллической структуры антитело:VTEA 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 Å.

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 человеческим BTLA в ИФА. Функциональный эпитоп содержит Asp в положении 52 BTLA человека (SEQ ID NO: 31). Остатки BTLA, которые находятся в пределах 4,5 Å от 23C8 в комплексе кристаллической структуры между BTLA человека (S47H) и Fab 23C8 кролика, и является структурным эпитопом, представляют собой His в положении 46 до Glu в положении 55, Glu в положении 103, Pro в положении 104, Leu в положении 106, Pro в положении 107, Thr в положении 134 до 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 (содержащее 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 Å от 25F7 в комплексе кристаллической структуры между BTLA человека и вариантом Fab гуманизированного 25F7 (HC S30W, LC E27R), и является структурным эпитопом, представляют собой Thr в положении 62, Ala в положении 64 до His в положении 68, Arg в положении 85 до 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)**

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFSLSYGVSWVRQAPGQGLEWMGAISYDGITYY  
ASWAKSRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDNAVYYCARGDYDDYVYVYALDIWQGQTL  
VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  
QSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEAAGGPS  
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST  
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK  
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG  
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

**LC антитела 22B3 (SEQ ID NO: 2)**

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCQASQSISTALAWYQQKPGQAPRLLIYAASSTLASGIPDRFS  
GSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQGYSSSNLDNVFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE  
QLKSGTASVYVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLTK  
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**HCVR антитела 22B3 (SEQ ID NO: 3)**

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFSLSYGVSWVRQAPGQGLEWMGAISYDGITYY  
ASWAKSRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDNAVYYCARGDYDDYVYVYALDIWQGQTL  
VTVSS

**LCVR антитела 22B3 (SEQ ID NO: 4)**

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCQASQSISTALAWYQQKPGQAPRLLIYAASSTLASGIPDRFS  
GSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQGYSSSNLDNVFGGGKVEIK

**HC антитела 23C8 (SEQ ID NO: 5)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAASGFDISKYNIQWVRQAPGKGLEWVGFINYGGSAYYA  
SRAKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDNAVYYCARGLSNSDLWGQGLTVTVSSASTKG  
PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS  
VTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEAAGGPSVFLFPPKPK  
DTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV  
LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV  
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH  
EALHNHYTQKSLSLGLG

**LC антитела 23C8 (SEQ ID NO: 6)**

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQASQSISWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRF  
SGSGSGTDFFTISSLPEDIAITYYCQSTYGGVVGSTSDDNPFGGGKVEIKRTVAAPSVFIF

PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTL  
 TLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**HCVR антитела 23C8 (SEQ ID NO: 7)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDISKYNIQWVRQAPGKGLEWVGFINYGGSAYYA  
 SRAKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARGLSNSDLWGQGLTLTVSS

**LCVR антитела 23C8 (SEQ ID NO: 8)**

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQASQSISSWLSWYQKPKGKAPKLLIYRASTLASGVPSRF  
 SGSGSGTDFFTISSLQPEDIATYYCQSTYGGVVGSTSDDNPFGGGKVEIK

**HC антитела 25F7 (SEQ ID NO: 9)**

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSLSTYAMNWVRQAPGQGLEWMGIISDDGTTY  
 ATWAKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARDAGAGGVQDYTLTWGQGLTV  
 TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ  
 SGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEAAGGPSV  
 FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY  
 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN  
 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN  
 VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG

**LC антитела 25F7 (SEQ ID NO: 10)**

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCQASENIYNFLAWYQQKPGQPPKLLIYSASTLASGVPDFR  
 SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQGSSNSNIDNPFGGGKVEIKRTVAAPSVFIAPPD  
 EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLSTL  
 TSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

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

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSLSTYAMNWVRQAPGQGLEWMGIISDDGTTY  
 ATWAKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARDAGAGGVQDYTLTWGQGLTV  
 TVSS

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

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCQASENIYNFLAWYQQKPGQPPKLLIYSASTLASGVPDFR  
 SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQGSSNSNIDNPFGGGKVEIK

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

GFSLSYGVV

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

GFDISKYNIQ

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

GFSLSYAMN

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

AISYDGITYYASWAKS

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

FINYGGSAYYASRAKG

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

IISDDGTTYATWAKG

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

GDYYDDYVYVYALDI

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

GLSNSDL

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

DAGAGGVQDYLT

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

QASQSISTALA

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

QASQSISSWLS

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

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

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

QQGYSSNLDNV

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

QSTYGGVVGSTDDNP

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

QQGSSNSNIDNP

**BTLA человека (SEQ ID NO: 31)**

MKTLPAMLGTGKLFVFFLIPYLDIWNHKGESCDVQLYIKRQSEHSILAGDPFELECPVKY  
CANRPHVTWCKLNGTTCVKLEDRQTSWKEEKNIFFILHFEPVLPNDNGSYRCSANFQSNL  
IESHSTTLVVDVKSASERPSKDEMASRPWLLYRLLPLGGLPLLITTCFLCFLCCLRRHQGKQ



NELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNP  
CLEENKPGIVYASLNHNSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS

**ВТЛА мыши Balbc (SEQ ID NO: 32)**

MKTVPAMLGTPRFLFREFFILHLGLWSILCEKATKRNDEECEVQLNIKRNKHSASWTGELFK  
IECPVKYCVHRPNVTWCKHNGTIWVPLEVGPQLYTSWEENRSVPVFLHFKPIHLSDNNGSY  
SCSTNFNSQVINSHSVTIHVRETRQNSSEHPLITVSDIPDATNASGPSTMEERPGRTWLWLYTL  
LPLGALLLLLACVCLLCFLKRIQKKEKKPSDLAGRDTNLVDIPASSRTNHQALPSGTGIYDN  
DPWSSMQDESELTISLQSERNNQGIVYASLNHCVIGRNPRQENNMQEAPTEYASICVRS

**ВТЛА мыши C57BL6 (SEQ ID NO: 33)**

MKTVPAMLGTPRFLFREFFILHLGLWSILCEKATKRNDEECPVQLTITRNSKQSARTGELFKI  
QCPVKYCVHRPNVTWCKHNGTICVPLEVSPQLYTSWEENQSVPVFLHFKPIHLSDNNGSYS  
CSTNFNSQVINSHSVTIHVRETRQNSSEHPLITVSDIPDATNASGPSTMEERPGRTWLWLYTL  
PLGALLLLLACVCLLCFLKRIQK  
EKKPSDLAGRDTNLVDIPASSRTNHQALPSGTGIYDNDPWSSMQDESELTISLQSERNNQGI  
VYASLNHCVIGRNPRQENNMQEAPTEYASICVRS

**ВТЛА обезьяны циномогус (SEQ ID NO: 34)**

MKTLPAMLGSGRFLWVFLIPYLDIWNHIGKESCDVQLYIKRQSYHSIFAGDPFKLECPVK  
YCAHRPQVTWCKLNGTTCVKLEGRHTSWKQEKNLFFILHFEPLVPSDNNGSYRCSANFLSA  
IIESHSTTLTYVDVKSASERPSKDEMASRPWLLYSLLPLGGLPLLITTCFLCFLRRHQKQ  
NELSDTTGREITLVDVVPKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNEPDFCFRMQEGSEVYSNP  
LEENKPGIYASLNHSIIGLNSRQARNVKEAPTEYASICVRS

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

cagggtgcagctggtgcagctctgggctgaggtgaagaagcctgggctcagtgaaaggttctcgaaggcatctggattctcctcagtagct  
atggagtgagctgggtgcgacagggcccctggacaaggctgagtgatgggagccattagttatgatggtattacatactacgcgagctggg  
cgaaaagcagagtcaccatgaccaggacacgtccacgacagctctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggcctgtga  
ttactgtgcgagaggggactactacgatgattatgtttatgtttatgctttagacatctggggccaggccacctggtcaccgtctcctcagctcta  
ccaaggcccctcgtctcccgctagcgcctgctccaggagcacctccgagagcacagcccctggctgctgtaaggactactc  
cccgaaccgggtgacgggtgctgctggaactcaggcgcctgaccagggcgtgcacacctcccggctgctcctacagctcctcaggactctactcc  
ctcagcagcgtggtgaccgtgcccctccagcagctgggacgaaagacctacacgtgcaacgtagatcacaagcccgaacaccaaggtgg  
acaagagaggtgagtcacaatatgtcccccatgccccacctgcccagcacctgaggccgcccggggaccatcagctcttctgtccccca  
aacccaaggacactctcatgctcccggaccctgaggtcacgtgctggtggtgacgtgagccaggaagaccccagggtccagttcaac  
tggtactgtgagtgctgaggtgcataatgccaagacaagccgcccggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtctcac  
cgtcctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtcaaggctcacaagaagcctcccctcctcctcagagaaaacctcctca  
agccaaggcagccccgagagccacaggtgtacacctgccccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagctgacctgct

ggtcaaaaggctctaccagcgacatcgccgtggagtggaagaatggcgagccggagaacaactacaagaccacgctcccgtgctg  
gactccgacggctccttctctctacagcaggtaccgtggacaagagcaggtggcaggagggaatgtcttctcatgctccgtgatgatg  
aggctctgcacaaccactacacagaagagcctctccctgtctctgggt

**Иллюстративная ДНК для экспрессии легкой цепи антитела 22В3 с SEQ ID NO: 2 (SEQ ID NO: 36)**

Gaaattgtgtgacgcagctccaggcacctgtctttgtctccaggggaaagagccacctctcctccaggccagtcagagcattagtactgc  
attagcctgtaccagcagaaacctggccagctcccaggctcctatctatgctgcatccactctggcatctggcatcccagacagggtcagtg  
gcagtgggctctgggacagactcactctaccatcagcagactggagcctgaagattttgcagtgtattactgtcaacaggggtatagtagtagta  
atcttgataatgttttcggcggaggaccaagggtggagatcaaacggaccgtggctgcaccatctgtcttcatctcccoccatctgatgagcagt  
tgaatctggaactgcctctgtgtgctgctgaataactctatccagagaggcacaagtacagtggaaggtggataaacgccctccaatcg  
ggtaactcccaggagagtgacagagcaggacagcaagacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaagcagactac  
gagaacaacaagctacgcctgcgaagtaccatcaggcctgagctcgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagtgcc

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

gagtgacagctgggtgagctgggggggcttgggtccagcctggagggtcctgagactcctctgtgagcctctggattcgacatcagtaagt  
acaacatccaatgggtccagcctccaggaagggtctggagtggtggcttcattaatatgtgtgtagcgataactacgcagccggg  
cgaagcagattaccatctcaagagatgattcaaaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgaaaaccgagacagccctgtattat  
ctgtgctagaggactaagtaatagcagcctctggggccaggcacctgggtaccgtctcctcagcttctaccaagggcccatcggtctccc  
ctagcgcctgtctcaggagcacctccagagcacagccgctgggtcctgggtcaaggactactccccgaaccgggtgacgggtgctgtg  
gaaactcaggccctgaccagcggcgtgacacactcccgggtgtcctacagctcctcaggactctactcctcagcagcgtgtgaccgtgcc  
ctccagcagcttgggacgaagacctacacctgcaacgtatgacacaagcccagcaacaacaagggtggacaagagaggtgagtcacaatag  
gtccccatgcccacctgcccagcacctgaggccggggaccatcagcttctctgttcccccaaaaccgaagcactctcatgatctc  
ccggaccctgaggtcacgtgctgtgtgtgagctgagccaggaagaccggaggtccagttcaactgggtacgtggatggcgtggaggtg  
cataatgccaaagacaagccggggaggagcagttcaacagcagctaccgtgtgtgagcgtcctaccgtcctgaccaggactggctgaa  
cggcaaggagtagaagtgcaaggtctccaacaaggcctcccgtcctcatcgagaaaaccatctccaagccaaaggcagccccgagag  
ccacaggtgtaccctgccccatcccaggagagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtaaaaggcttctaccagcga  
catcgccgtggagtggaagaatgggagccgggagaacaactacaagaccgcctcccgtgctggactccgacggctccttctctcta  
cagcaggctaacctggacaagagcaggtggcaggagggaatgtcttctcatgctccgtgatgatgaggtctgcacaaccactacac  
agaagagcctctccctgtctctgggt

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

gacatccagatgaccagctccatccctctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcactgccagccagtcagagcattagtagttg  
 gttatcctggtatgacagaaccagggaagccctaaagctctgatctacagggcatccactctggcatctgggtccatcaagggtcagtg  
 gaagtggatctgggacagattttaccatcagcagcctgagcctgaagatattgcaacatattactgcaatccattatggtgtgtgtg  
 gcagtagctgtagataatcctttcggcggaggaccaggtggagatcaaacggaccgtggctgcaccatctgtcttctctcccctct  
 gatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgctgctgtaataacttctatcccagagagccaaagtacagtggaagtgataacgc  
 cctcaatcgggtaactccaggagaggtcacagagcaggacagcaagacagcactacagcctcagcagcaccctgacgtgagcaaa  
 gcagactacgagaacaagaagctctacgcctgcgaagtcaccatcagggcctgagctgccccgtcacaagaagcttcaacaggggagagt  
 gc

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

caggtgcagctggtgagctggtggaagcctgggctcagtgaaaggttctgcaaggcatctggattctccctcagtagct  
 atgcaatgaactgggtgcagagccctggacaaggctgagtgatgggaatcattagtgatgtaggtaccacatactacgcagctggg  
 cgaaggcagagtcaccatgaccaggacacgtccacagcagcagctctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggcctgta  
 ttactgtgcagagatgctggtgctggtggtccaagactactaaactgtggggccaggccaccctgctcaccgtctctcagcttctcaaa  
 gggcccatcgctctcccgtagcgcctgctccaggagcactccgagagcacagccctgggctgctgctcaaggactactccccg  
 aaccggtgacggtgctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacctccccgctgctctacagctcctcaggactactccctcag  
 cagcgtggtgaccgtgccccagcagctgggacgaagacctacactgcaacgtagatcacaagcccagcaacccaagggtggacaag  
 agagttgagtcacaatggtccccatgcccaccctgccagcactgaggccgcccggggaccatcagcttctctgtcccccaaaacc  
 aaggacactctcatgatctcccggaccctgaggtcagctgctggtggagcgtgagccaggaagaccccaggtccaagtcaactgtagc  
 gtgagtggtggaggtgcataatgccaaagcaaaagccgggagagcagttcaacagcagctaccgtggtgctcagctcaccgtct  
 gcaccagactggctgaacggcaagagtagcaagtcaaggtctccaacaagcctcccctcctcctcagagaaaacctcctcaaaagcca  
 aaggcagccccagagccacaggtgtacaccctgccccatcccagagagatgaccaagaaccaggtcagcctgacgtgctgctgta  
 aggttctacccagcagatcgcctggagtggaagcaatgggagcgggagaacaactacaagaccacgctcccgtgctgactcc  
 gacggctccttctctctacagcaggtaacctggacaagagcaggtggcagggggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtc  
 tgcacaaccactacacagaagagcctctcctgtctctgggt

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

Gacatcgtgatgaccagctccagactccctgctgtctctgggcgagagggccaccatcaactgccaggccagtagaataattacaact  
 tttggcctggtaccagacagaaccaggacagcctcctaaagctgctcattactctgcatccactctggcatctgggtccctgaccgattcagtg  
 gcagcgggtctggacagatttactctcaccatcagcagcctgagcgtgaagatgtggcagtttattactgtaacagggttctagtaatagta  
 atattgataatcctttcggcggaggaccaggtggagatcaaacggaccgtgctgaccatctgtctctctcccctcctgatgagcagt  
 tgaactctggaactgctctgtgtgctgctgtaataacttctatcccagagagccaaagtacagtggaaggtgataacgccctccaatcg  
 gtaactcccaggagaggtgtcacagagcaggacagcaaggacagcactacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaagcagactac  
 gagaacaacaagaagctacgctgcaagtcaccatcagggcctgagctgccccgtcacaagaagcttcaacaggggagagtgct

**HVEM человека (SEQ ID NO: 41)**

MEPPGDWGWPPPWRSTPKTDVLRLLVLYLFLGAPCYAPALPSCKEDEYYPVGSECCPKCSPGY  
 RVKEACGELTGTVCEPCPPGTIAHLNGLSKCLQCQMCDPAMGLRASRNCSTENAVCGC  
 SPGHFCIVQGDGHDCAACRAYATSSPGQRVQKGGTESQD TLCQNCPPGTFSPNGTLEECQH  
 TKCSWLVTKAGAGTSSSHVWWFSLGSLVIVIVCSTVGLIICVRRKPRGDVVKVIVSVQR  
 KRQEAEGEATVIEALQAPPDVTTVAVEETIPSFTGRSPNH

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Антитело, которое связывает BTLA, содержащее HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, HCDR2, имеющий 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.

2. Антитело по п.1, содержащее переменный участок тяжелой цепи (HCVR), имеющий аминокис-

лотную последовательность SEQ ID NO: 3, и переменный участок легкой цепи (LCVR), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

3. Антитело по п.1 или 2, содержащее тяжелую цепь (HC), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и легкую цепь (LC), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

4. 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.

5. Антитело по п.4, содержащее переменный участок тяжелой цепи (HCVR), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменный участок легкой цепи (LCVR), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

6. Антитело по п.4 или 5, содержащее тяжелую цепь (HC), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и легкую цепь (LC), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

7. 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.

8. Антитело по п.7, 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.

9. Антитело по п.7 или 8, содержащее тяжелую цепь (HC), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и легкую цепь (LC), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп.1-9 и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или наполнителей.

11. Применение антитела по любому из пп.1-9 или фармацевтической композиции по п.10 для лечения ревматического заболевания.

12. Применение по п.11, отличающееся тем, что ревматическим заболеванием является волчаночный нефрит, системная красная волчанка или ревматоидный артрит.

13. Применение антитела по любому из пп.1-9 или фармацевтической композиции по п.10 для лечения дерматологического заболевания.

14. Применение по п.13, отличающееся тем, что дерматологическим заболеванием является атопический дерматит или псориаз.

15. Применение антитела по любому из пп.1-9 или фармацевтической композиции по п.10 для лечения рассеянного склероза.

16. 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.

17. Клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК по п.16, причем 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.

18. Способ получения антитела, причем 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

причем указанный способ включает

а) культивирование клетки млекопитающего по п.17 в условиях, при которых антитело экспрессируется; и

б) восстановление экспрессированного антитела.

19. Антитело, которое связывает BTLA, полученное способом по п.18.

20. 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.

21. Клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК по п.20, причем 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.

22. Способ получения антитела,

причем 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

причем указанный способ включает

а) культивирование клетки млекопитающего по п.21 в условиях, при которых антитело экспрессируется; и

б) восстановление экспрессированного антитела.

23. Антитело, которое связывает BTLA, полученное способом по п.22.

24. Молекула ДНК, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь антитела, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и полинуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь антитела, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

25. Клетка млекопитающего, содержащая (ii) молекулу ДНК по п.24, причем 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.

26. Способ получения антитела,

причем 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

причем указанный способ включает

а) культивирование клетки млекопитающего по п.25 в условиях, при которых антитело экспрессируется; и

б) восстановление экспрессированного антитела.

27. Антитело, которое связывает BTLA, полученное способом по п.26.

