

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291863 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.02.17

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.12.24

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ HVEM ЧЕЛОВЕКА (TNFRSF14) И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 19219684.8

(32) 2019.12.24

(33) EP

(86) PCT/NL2020/050817

(87) WO 2021/133170 2021.07.01

(71) Заявитель:
ДЖЕЙДЖЕЙПИ БИОЛОДЖИКС СП.
З О.О. (PL)

(72) Изобретатель:

Бун Луи, Симонс Петрус Йоханнес,
Ден Хартог Марсель Теодорус (NL)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) В настоящем изобретении предложено антитело, которое связывает внеклеточную часть HVEM человека на клетках, экспрессирующих HVEM человека, которое предотвращает связывание BTLA с HVEM, когда антитело связано с указанной внеклеточной частью HVEM, при этом указанное антитело замещает BTLA, связанный с указанной внеклеточной частью HVEM. В настоящем изобретении также предложено применение такого антитела для борьбы с определенными заболеваниями.

A1

202291863

202291863

A1

АНТИТЕЛА ПРОТИВ HVEM ЧЕЛОВЕКА (TNFRSF14) И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

5

10

Настоящее изобретение относится к области антител и применению таких антител. Настоящее изобретение, в частности, относится к антителам, которые связывают HVEM. В настоящем изобретении также предложены наборы и композиции, содержащие антитело против HVEM, и способы лечения с применением антитела, как описано в настоящем документе.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

15

20

25

Активация Т-клеток требует одновременной активации по меньшей мере двух сигналов: вовлечения рецептора Т-клеток и дополнительного сигнала, доставляемого костимулирующими молекулами. Некоторые костимулирующие молекулы принадлежат к семействам B7/CD28 и TNF/TNFR и играют решающую роль в модуляции иммунных ответов и улучшении противоопухолевого иммунитета. Опухоли могут ускользать от иммунного надзора, создавая иммуносупрессивную среду, в которой противоопухолевый Т-клеточный ответ ослабляется отсутствием костимулирующих молекул и/или сверхэкспрессией коингибирующих молекул, таких как PD-L1/L2, на поверхности раковых клеток. Нацеливание на костимулирующие и коингибирующие пути представляет собой привлекательную терапевтическую стратегию для усиления противоопухолевого иммунитета при некоторых видах рака человека. Клинические испытания, направленные на коингибирующие молекулы Ig CTLA-4 и PD-1, уже проявили многообещающие результаты у пациентов с меланомой, почечно-клеточным раком и раком предстательной железы, а также неходжкинской лимфомой, и привели к одобрению таких препаратов, как Yervoy® и Opdivo®.

30

35

40

Существует интерес к оценке потенциальной роли других костимулирующих и коингибирующих взаимодействий рецептор/лиганд. Одной из таких молекул является медиатор проникновения вируса герпеса (HVEM/CD270/TNFRSF14) и его лиганды. Взаимодействия между HVEM и его лигандами более сложны, чем, например, PD-1/PD-L1, поскольку имеются свидетельства двунаправленной передачи сигналов. HVEM представляет собой молекулярное переключение между передачей стимулирующих и ингибирующих сигналов при взаимодействии с его лигандами, которые включают BTLA (аттенуатор В- и Т-лимфоцитов), CD160, LIGHT (лимфотоксिनоподобный, проявляет индуцибельную экспрессию и конкурирует с гликопротеином D вируса простого герпеса за HVEM, рецептор, экспрессируемый Т-лимфоцитами) и TNF β /LT α (фактор некроза опухоли β /лимфотоксин α). HVEM и его лиганды играют роль в физиопатологии иммунной регуляции. В настоящем изобретении было показано, что нарушение регуляции этой сети способствует возникновению различных заболеваний.

45

Первоначально HVEM был обнаружен как корепептор гликопротеина D вируса простого герпеса 1, обеспечивающий проникновение вируса в клетку. Обнаружено, что HVEM

широко экспрессируется в тканях с самыми высокими уровнями экспрессии в легких, почках и печени. Также обнаружено, что HVEM экспрессируется на Т-клетках, В-клетках, НК-клетках и миелоидных клетках. Примечательно, что экспрессия HVEM повышается при некоторых видах рака. Известно, что HVEM взаимодействует с BTLA, CD160, LIGHT и TNF β . Большинство лигандов, а также сам HVEM могут экспрессироваться по обе стороны иммунного синапса: обнаружено, что CD160 экспрессируется в НК-клетках, НКТ-клетках и Т-клетках, BTLA на высоком уровне экспрессируется в активированных Т-клетках и покоящихся В-клетках, и меньше в наивных Т-клетках, НК-клетках, дендритных клетках (DC) и макрофагах. Обнаружено, что LIGHT экспрессируется незрелыми DC, гранулоцитами, моноцитами и активированными Т-клетками, а TNF β экспрессируется в В-клетках, Т-клетках и НК-клетках.

Не ограничиваясь какой-либо теорией, считается, что взаимодействие BTLA и CD160 на Т-лимфоцитах с помощью HVEM обеспечивает коингибирующие сигналы Т-лимфоцитам через BTLA и CD160, лигирование HVEM на Т-лимфоцитах с помощью LIGHT и TNF β доставляет костимулирующие сигналы через HVEM. Эти взаимодействия являются двунаправленными: HVEM индуцирует ингибирующие сигналы в Т-клетках после взаимодействия с BTLA и CD160 на Т-клетках, в то время как BTLA и CD160 действуют как активирующие лиганды для HVEM, что приводит к активации NF κ B. Кроме того, LIGHT доставляет костимулирующие сигналы Т-клетке при взаимодействии с HVEM, экспрессируемым на Т-клетке, и HVEM также участвует в передаче костимулирующих сигналов Т-клетке при взаимодействии с LIGHT, экспрессируемым Т-клеткой. Однако LIGHT не содержит очевидного сигнального мотива, и его механизм передачи сигналов не полностью определен.

Когда LIGHT и/или TNF β , BTLA и/или CD160 одновременно взаимодействуют с HVEM, суммарный эффект представляет собой ингибирующий сигнал для активации Т-клеток. Многие опухоли (например, меланома, плоскоклеточная карцинома пищевода, гепатоцеллюлярная карцинома и колоректальный рак) сверхэкспрессируют HVEM. Следовательно, терапевтическое блокирование ингибирующего взаимодействия между HVEM на раковых клетках с BTLA/CD160 на Т-клетках, при сохранении LIGHT-опосредованной передачи сигналов в Т-клетках, экспрессирующих HVEM, может усилить противоопухолевый Т-клеточный ответ. Описаны антитела, которые могут препятствовать связыванию BTLA с HVEM (WO2014184360A1). В одном варианте реализации настоящее изобретение относится к антителу, которое может блокировать связывание BTLA с HVEM и замещать BTLA, связанное с HVEM. Эти и другие антитела являются предметом раскрытия настоящего изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте настоящего изобретения предложено антителу, которое связывает внеклеточную часть медиатора проникновения вируса герпеса (HVEM) на клетках, экспрессирующих HVEM, и предотвращает связывание аттенюатора В- и Т-лимфоцитов (BTLA) с HVEM, когда указанное антитело связывается с указанной внеклеточной

частью HVEM. В одном аспекте антитело может замещать BTLA, связанный с указанной внеклеточной частью HVEM.

5 В одном аспекте настоящего изобретения предложено антитело, которое связывает внеклеточную часть HVEM на экспрессирующих HVEM клетках, содержащему
вариабельную область тяжелой цепи с последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3,
представленными в SEQ ID NO: 26-28, с 0, 1 или 2 аминокислотными вставками,
делециями, заменами или добавлениями, и вариабельную область легкой цепи с
10 последовательностями CDR1, CDR2, CDR3, представленными в SEQ ID NO: 29-31, с 0, 1
или 2 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, которое связывает
внеклеточную часть HVEM на экспрессирующей HVEM клетке, содержащему область
тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:
15 24, с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотными вставками, делециями, заменами
или добавлениями, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной
последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 25, с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10
аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями.

В одном аспекте настоящего изобретения предложено антитело, которое связывает
20 внеклеточную часть HVEM на экспрессирующих HVEM клетках, содержащему
вариабельную область тяжелой цепи с последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3,
представленными в SEQ ID NO: 42-44, с 0, 1 или 2 аминокислотными вставками,
делециями, заменами или добавлениями, и вариабельную область легкой цепи с
последовательностями CDR1, CDR2, CDR3, представленными в SEQ ID NO: 45-47, с 0, 1
25 или 2 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, которое связывает
внеклеточную часть HVEM на экспрессирующей HVEM клетке, содержащему область
тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:
30 40, с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотными вставками, делециями, заменами
или добавлениями, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной
последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 41, с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10
аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями.

35 В одном аспекте настоящего изобретения предложено антитело, которое связывает
внеклеточную часть HVEM на экспрессирующих HVEM клетках, содержащему
вариабельную область тяжелой цепи с последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3,
представленными в SEQ ID NO: 18-20, с 0, 1 или 2 аминокислотными вставками,
делециями, заменами или добавлениями, и вариабельную область легкой цепи с
40 последовательностями CDR1, CDR2, CDR3, представленными в SEQ ID NO: 21-23, с 0, 1
или 2 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, которое связывает
внеклеточную часть HVEM на экспрессирующей HVEM клетке, содержащему область

тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 16, с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 17, с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями.

В одном аспекте настоящего изобретения предложено антителу, которое связывает внеклеточную часть HVEM на экспрессирующих HVEM клетках, содержащему вариабельную область тяжелой цепи с последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3, представленными в SEQ ID NO: 34-36, с 0, 1 или 2 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями, и вариабельную область легкой цепи с последовательностями CDR1, CDR2, CDR3, представленными в SEQ ID NO: 37-39, с 0, 1 или 2 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, которое связывает внеклеточную часть HVEM на экспрессирующей HVEM клетке, содержащему область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 32, с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 33, с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями.

В одном аспекте настоящего изобретения предложено антителу, которое связывает внеклеточную часть HVEM на экспрессирующих HVEM клетках, содержащему вариабельную область тяжелой цепи с последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3, представленными в SEQ ID NO: 50-52, с 0, 1 или 2 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями, и вариабельную область легкой цепи с последовательностями CDR1, CDR2, CDR3, представленными в SEQ ID NO: 53-55, с 0, 1 или 2 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, которое связывает внеклеточную часть HVEM на экспрессирующей HVEM клетке, содержащему область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 48, с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 49, с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями.

В одном аспекте в настоящем изобретении предложена молекула нуклеиновой кислоты или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антителу, как раскрыто в настоящем документе, или его антигенсвязывающий фрагмент, как раскрыто в настоящем документе.

Кроме того, предложена нуклеиновая кислота, кодирующая вариабельную область, описанную в настоящем документе.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем документе. В одном аспекте в настоящем изобретении предложена клетка, содержащая антитело, молекулу или молекулы нуклеиновой кислоты и/или вектор, как описано в настоящем документе. Предпочтительно клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, насекомого, растения, бактерии или дрожжевую клетку. Более предпочтительно клетка представляет собой клетку человека. Предпочтительно клетка-хозяин представляет собой клетку гибридомы, клетку яичника китайского хомячка (CHO), клетку NSO или клетку PER-C6™.

В одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ получения антитела, как описано в настоящем документе.

Способ включает сбор антител. Предпочтительно антитела продуцируют с использованием клетки и собирают из указанной клетки. Предпочтительно указанная клетка представляет собой клетку гибридомы, клетку яичника китайского хомячка (CHO), клетку NSO или клетку PER-C6™. Предпочтительно антитела получают синтетическим путем.

В одном аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, нуклеиновую кислоту и/или клетку, как описано. Предпочтительно композиция или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, предназначены для применения для получения лекарственного средства. Предпочтительно лекарственное средство предназначено для лечения и/или профилактики рака и связанных с иммунитетом нарушений.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения рака и связанных с иммунитетом нарушений у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, молекулы нуклеиновой кислоты или вектора, как описано в настоящем документе.

В одном аспекте настоящего изобретения предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения для лечения рака и связанных с иммунитетом нарушений.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ модулирования сигнальной активности HVEM, включающий приведение клеток, экспрессирующих HVEM, в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, молекулой нуклеиновой кислоты или вектором, как описано в настоящем документе.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ усиления иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества композиции, содержащей антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент, молекулу нуклеиновой кислоты или вектор, как описано в настоящем документе.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ уменьшения роста опухоли у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, молекулу нуклеиновой кислоты или вектор, как описано в настоящем документе.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ РАСКРЫТЫХ ВАРИАНТОВ РЕАЛИЗАЦИИ

В настоящем изобретении описаны антитела, которые связывают внеклеточную часть HVEM человека на экспрессирующих HVEM клетках и растворимый HVEM. Антитело, как описано в настоящем документе, подходит для предотвращения связывания BTLA и CD160 с HVEM, когда антитело связывается с указанной внеклеточной частью HVEM человека. Было создано несколько антител, которые связывают HVEM. Антитела, которые специфически связывают HVEM, известны в данной области техники. Например, антитело eBio HVEM-122 (eBiosciences) имеется в продаже и упоминается в примере 2. Описаны антитела, которые могут препятствовать связыванию BTLA с HVEM (WO2014184360A1). Настоящее изобретение относится к антителам, которые блокируют связывание BTLA с HVEM и замещают BTLA после связывания с HVEM.

В одном аспекте в настоящем изобретении предложено антитело, которое связывает внеклеточную часть HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM; предотвращает связывание BTLA с HVEM, когда указанное антитело связано с указанной внеклеточной частью HVEM; и замещает BTLA, когда-то связанный с указанной внеклеточной частью HVEM.

Термин «антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, которая обычно состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая пара имеет одну «тяжелую» (H) цепь и одну «легкую» (L) цепь. Легкие цепи человека классифицируются как каппа (κ) и лямбда (λ). Тяжелые цепи классифицируются как мю, дельта, гамма, альфа или эпсилон и определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно. Каждая тяжелая цепь состоит из варибельной области тяжелой цепи (сокращенно обозначаемой в настоящем документе как HCVR или VH) и константной области тяжелой цепи. Константные области тяжелой цепи IgD, IgG и IgA состоят из трех доменов, CH1, CH2 и CH3, а константные области тяжелой цепи IgM и IgE состоят из четырех доменов, CH1, CH2, CH3 и CH4. Каждая легкая цепь состоит из варибельной области легкой цепи (сокращенно обозначаемой в настоящем документе как LCVR или VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, CL. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки). Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гиперварибельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), перемежающиеся с более консервативными

областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Варибельные области легкой и тяжелой цепи вместе образуют сайт связывания антитела и определяют специфичность эпитопа. В данной области техники известны различные способы назначения аминокислот области или домену в антителе. Хорошо известные способы включают метод Кэбота и метод Чотиа (Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991); Chothia et al. Conformations of immunoglobulin hypervariable regions in Nature 1989; 342(6252):877-83). Назначение аминокислот каждому участку или домену в настоящем изобретении соответствует определениям Кэбота.

Термин «антитело» включает мышинные, гуманизированные, деиммунизированные человеческие и химерные антитела, а также антитела, которые представляют собой мультимерные формы антител, такие как димеры, тримеры или мультимеры мономерных антител более высокого порядка. Антитело также включает моноспецифические, биспецифические или мультиспецифические антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит сайт распознавания антигена требуемой специфичности. Он также включает антитело, которое связано или присоединено к фрагменту, не являющемуся антителом. Кроме того, термин «антитело» не ограничивается каким-либо конкретным способом получения антитела. Например, он включает моноклональные антитела, рекомбинантные антитела и поликлональные антитела. В настоящем изобретении предложено антитело, как описано в настоящем документе. Кроме того, настоящем изобретении предложены часть, производное и/или аналог антитела, описанного в настоящем документе. Часть, производное и/или аналог сохраняют антигенсвязывающую способность антитела по существу, не обязательно по количеству. Неограничивающие примеры части и/или производного включают часть антитела, являющуюся антигенсвязывающей частью и обычно содержащую один или более варибельных доменов антитела. Неограничивающими примерами являются различные Fab-фрагменты. Часть также может представлять собой фрагмент так называемого однодоменного антитела. Фрагмент однодоменного антитела (sdAb, названный разработчиком Ablynx Nanobody) представляет собой фрагмент антитела с одним мономерным варибельным доменом антитела. Подобно целому антителу, оно способно избирательно связываться со специфическим антигеном. Имея молекулярную массу всего 12–15 кДа, фрагменты однодоменных антител намного меньше, чем обычные антитела (150–160 кДа), состоящие из двух тяжелых белковых цепей и двух легких цепей, и даже меньше, чем Fab-фрагменты (~50 кДа, одна легкая цепь и половина тяжелой цепи) и одноцепочечные варибельные фрагменты (~25 кДа, две варибельные области, одна из легкой и одна из тяжелой цепи). Однодоменные антитела сами по себе ненамного меньше нормальных антител (обычно 90-100 кДа). Фрагменты однодоменных антител в основном конструируют из антител с тяжелой цепью, обнаруженных у верблюдовых; они называются фрагментами VHH (Нанотела®). У некоторых рыб также присутствуют антитела только с тяжелой цепью (IgNAR, «новый

антигенный рецептор иммуноглобулина)), из которых можно получить однодоменные фрагменты антител, называемые фрагментами VNAR. Альтернативный подход заключается в разделении димерных переменных доменов общего иммуноглобулина G (IgG) человека или мыши на мономеры. Хотя большинство исследований

5 однодоменных антител в настоящее время основано на переменных доменах тяжелой цепи, также было показано, что нанотела, полученные из легких цепей, специфически связываются с эпитопами-мишенями. Неограничивающий пример части антитела содержит переменный домен тяжелой цепи и/или легкой цепи антитела или его эквивалент. Неограничивающими примерами таких частей являются VHH, антитела к

10 человеческому домену (dAbs) и Unibodies. Предпочтительные части или производные антитела имеют по меньшей мере переменный домен тяжелой цепи и легкой цепи антитела, как описано в настоящем документе. Неограничивающими примерами производного или его части являются F(ab)-фрагмент и одноцепочечный Fv-фрагмент. Функциональная часть биспецифического антитела включает антигенсвязывающие

15 части биспецифического антитела или производное и/или аналог связывающих частей. «Одноцепочечное антитело» (scFv) имеет единственную полипептидную цепь, содержащую VL-домен, связанный с VH-доменом, где VL-домен и VH-домен объединены в пару для образования моновалентной молекулы. Одноцепочечное антитело можно получить в соответствии со способом, известным в данной области техники (см.,

20 например, Bird et al., (1988) Science 242:423-426 and Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). «Диатело» имеет две цепи, каждая цепь содержит переменную область тяжелой цепи, соединенную с переменной областью легкой цепи той же полипептидной цепи, соединенную коротким пептидным линкером, при этом две области одной цепи спариваются не друг с другом, а с комплементарными доменами на

25 другой цепи с образованием биспецифической молекулы. Способы получения диател известны в данной области техники (см., например, Holliger P. et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, and Poljak R. J. et al., (1994) Structure 2:1121-1123). Доменные антитела (dAbs) представляют собой небольшие функциональные единицы связывания антител, соответствующие переменным областям тяжелой или легкой

30 цепи антител. Доменные антитела хорошо экспрессируются в бактериальных, дрожжевых и клеточных системах млекопитающих. Дополнительные сведения о доменных антителах и способах их получения известны в данной области техники (см., например, патенты США №№ 6291158; 6582915; 6593081; WO04/003019 и WO03/002609). Нанотела получают из тяжелых цепей антител. Нанотело обычно содержит один

35 переменный домен и два константных домена (CH2 и CH3) и сохраняет антигенсвязывающую способность исходного антитела. Нанотела могут быть получены способами, известными в данной области техники (см., например, патент США № 6765087, патент США № 6838254, WO 06/079372). Unibody имеют одну легкую цепь и одну тяжелую цепь антитела IgG4. Unibody можно получить путем удаления шарнирной

40 области антител IgG4. Дополнительные подробности о Unibody и способах их получения можно найти в WO 2007/059782. Список аналогов антител с каждым годом увеличивается. Имея последовательность переменных доменов и имеющиеся в настоящее время обширные знания о трехмерной структуре многих различных антител,

специалист в данной области техники может преобразовать антитело согласно настоящему изобретению в тот или иной аналог, часть или производное антитела.

В дополнение к связывающей молекуле молекулы согласно настоящему изобретению могут дополнительно содержать фрагмент для увеличения периода полужизни молекулы *in vivo*, такой как, но не ограничиваясь этим, полиэтиленгликоль (ПЭГ), человеческий сывороточный альбумин, группы гликозилирования, жирные кислоты и декстран. Такие дополнительные фрагменты могут быть конъюгированы или иным образом объединены со связывающим фрагментом с применением способов, хорошо известных в данной области техники. Также предусмотрены химерные антигенные рецепторы (CAR), содержащие вариабельный домен антитела, как описано в настоящем документе. CAR представляют собой сконструированные рецепторы, которые объединяют новую специфичность (как правило, антигенсвязывающую часть антитела или его производное) с иммунной клеткой по отношению к клеткам-мишеням. Рецепторы называются химерными, так как они слиты из частей из разных источников (Т-лимфоциты, генетически модифицированные для экспрессии одного или более химерных антигенных рецепторов (CAR); см., например, Eshhar, патент США № 7741465; Eshhar, публикация заявки на патент США № 2012/0093842). В некоторых вариантах реализации антитела, как описано в настоящем документе, могут быть связаны с активным соединением, например, токсином. Кроме того, описанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут быть связаны с меткой, например, флуоресцентным белком, химической меткой, органическим красителем, окрашенной частицей или ферментом. Антитела, описанные в настоящем документе, могут быть связаны с лекарственным средством с образованием конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC). В настоящем изобретении предложены аналоги антител, части антител и производные антител, также когда эти молекулы связаны с другими молекулами или включены в них.

В некоторых вариантах реализации антитело, как описано в настоящем документе, представляет собой химерное антитело. Термин «химерное антитело» относится к антителу, которое содержит аминокислотные последовательности, полученные от двух разных видов, таких как человек и мышь, обычно комбинацию вариабельных областей мыши (из тяжелых и легких цепей) и константных областей человека (тяжелых и легких цепей). Неограничивающий пример создания такого химерного антитела описан в рабочих примерах (например, пример 5). В данном химерном антителе константная область IgG1/каппа мыши заменена константным доменом IgG/каппа человека. В некоторых вариантах реализации антитело, как описано в настоящем документе, представляет собой гуманизированное антитело. Термин «гуманизированное антитело» относится к антителу, которое содержит некоторые или все CDR антитела животного, отличного от человека, в то время как каркасная и константная области антитела содержат аминокислотные остатки, полученные из последовательностей человеческого антитела. Гуманизированные антитела обычно получают путем прививки CDR антитела мыши в каркасную последовательность человека с последующей обратной заменой определенных остатков каркасной области человека на соответствующие

остатки мыши из исходного антитела. Термин «деиммунизированное антитело» также относится к антителу нечеловеческого происхождения, в котором, как правило, в одной или более переменных областях, удалены один или более эпитопов, которые имеют высокую склонность образовывать эпитоп Т-клеток и/или В-клеток человека, для

5 снижения иммуногенности. Аминокислотная последовательность эпитопа может быть удалена полностью или частично. Однако обычно аминокислотную последовательность изменяют путем замены одной или более аминокислот, составляющих эпитоп, одной или более другими аминокислотами, тем самым заменяя аминокислотную последовательность на последовательность, которая не представляет собой эпитоп Т-

10 клеток и/или В-клеток человека. Указанные аминокислоты заменены аминокислотами, которые присутствуют в соответствующем положении(положениях) в соответствующей переменной области тяжелой или легкой цепи человека, в зависимости от случая. В некоторых вариантах реализации антитела, как описано в настоящем документе, представляет собой человеческое антитело. Термин «человеческое антитело» относится к

15 антителу, состоящему только из аминокислотных последовательностей человеческого иммуноглобулина. Человеческое антитело может содержать мышиные углеводные цепи, если оно получено у мыши, в мышинной клетке или в гибридоме, полученной из мышинной клетки. Человеческие антитела могут быть получены различными способами, известными в данной области техники. Химерные, гуманизированные,

20 деиммунизированные и человеческие антитела входят в объем настоящего изобретения.

Антитело, которое связывает HVEM человека, связывается с HVEM в условиях, которые обычно используются для связывания антител. Когда антитело и HVEM человека контактируют друг с другом в условиях, подходящих для связывания антитела, антитело

25 будет связываться с HVEM человека. Антитело связывается с HVEM человека, связанным с мембраной, экспрессированным на клетках HEK293F, в то время как антитело не связывается в значительной степени с клетками HEK293F, которые не экспрессируют HVEM человека на своей клеточной мембране. Связывание антитела с клеткой, экспрессирующей HVEM человека, можно обнаружить способами, известными

30 специалисту в данной области техники. Например, с помощью вторичного антитела, несущего флуоресцентную метку, и измерения меченых клеток с помощью проточной цитометрии (FACS).

HVEM, также известный как представитель 14 надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF14) и CD270, представляет собой рецептор клеточной

35 поверхности человека из надсемейства TNF-рецепторов (фактор некроза опухоли). У человека белок кодируется геном *TNFRSF14*. HVEM может задействовать по меньшей мере четыре различных лиганда, членов TNFSF LIGHT (TNFSF14) и TNF β /LT α (фактор некроза опухоли β /лимфотоксин α), а также членов суперсемейства иммуноглобулинов

40 В- и Т-лимфоцитарных аттенуаторов (BTLA) и CD160. Для эталонной последовательности HVEM человека авторы настоящего изобретения ссылаются на SEQ ID NO.: 1 (Swiss-Prot no. Q92956.3; aa1-283). Ссылка приведена исключительно для идентификации гена/белка HVEM. Он не предназначен для ограничения HVEM, как описано в настоящем документе, конкретной последовательностью записи в базе

данных. Природные варианты HVEM, которые могут связывать BTLA, CD160, LIGHT и TNF β и могут связывать антитело, как описано в настоящем документе, входят в объем изобретения. Рекомбинантный HVEM человека также входит в объем изобретения, если он может связывать BTLA, CD160, LIGHT и TNF β и может связывать антитело, как описано в настоящем документе.

HVEM широко экспрессируется в тканях, с самыми высокими уровнями экспрессии в легких, почках и печени, и обнаружено, что он экспрессируется на Т-клетках, В-клетках, NK-клетках и миелоидных клетках. Обнаружено, что экспрессия HVEM повышается при некоторых видах рака. Термин «клетки, экспрессирующие HVEM» относится к клетке, которая экспрессирует HVEM. Примерами клеток являются Т-клетки, В-клетки, NK-клетки и миелоидные клетки. Связывание BTLA и/или CD160 с HVEM может оказывать ингибирующее действие, связывание LIGHT и/или TNF β с HVEM может оказывать стимулирующее действие.

Термин «внеклеточный» буквально означает вне клеток. Термин «внеклеточная часть» относится к части молекулы, которая находится снаружи клеточной мембраны. Эта часть молекулы может быть доступна для взаимодействия с другими молекулами вне клетки. HVEM имеет внеклеточную часть, определяемую богатой цистеином сигнатурой. Внеклеточный домен HVEM содержит четыре домена, богатых цистеином, а именно CRD1-CRD4, и линкер. Не ограничиваясь теорией, считается, что взаимодействие между BTLA и CD160 с HVEM происходит через CRD1 HVEM, тогда как взаимодействие между LIGHT и TNF β с HVEM происходит через CRD2 и CRD3 HVEM.

В одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению связывается с CRD1 HVEM.

HVEM присутствует на клеточной поверхности большинства линий гемопоэтических клеток, среди которых Т-клетки, В-клетки, NK-клетки и миелоидные клетки. Обнаружено, что экспрессия HVEM снижается в Т-клетках и В-клетках при активации и повышается при некоторых видах рака. Неограничивающими примерами являются: меланома, плоскоклеточная карцинома пищевода, гепатоцеллюлярная карцинома и колоректальный рак. Термин «клетка, экспрессирующая HVEM человека» относится к клетке, которая экспрессирует HVEM человека. Примерами клеток являются Т-клетки, В-клетки, NK-клетки и миелоидные клетки.

Термин «предотвращать связывание» относится к способности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента предотвращать связывание лиганда с белком, когда указанный белок связывается указанным антителом. Когда обозначено «предотвращение связывание», это также может быть истолковано как «блокировка». Если связывание лиганда предотвращается на более чем (>) на 70% по сравнению со связыванием лиганда в отсутствие антитела, считается, что связывание указанного лиганда предотвращено. Если связывание лиганда предотвращается на величину, более или равную ($\geq$) 30%, но менее или равную ($\leq$) 70% по сравнению со связыванием лиганда в отсутствие антитела, считается, что связывание указанного лиганда частично предотвращено. Отсутствие влияния на связывание лиганда считается, если связывание

лиганда предотвращается менее чем (<) на 30% по сравнению со связыванием лиганда в отсутствие антитела. Если связывание лиганда увеличивается более чем (>) на 30% по сравнению со связыванием лиганда в отсутствие антитела, считается, что связывание указанного лиганда усилено.

5

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, предотвращают связывание BTLA с внеклеточной частью HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM, когда указанное антитело связано с указанной внеклеточной частью HVEM. Примерами антител являются: 45H6, 11H7, 36H12, 48H6 и 49G4.

10

В другом варианте реализации антитело против HVEM или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в настоящем документе, предотвращает связывание BTLA с внеклеточной частью HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM, и не предотвращает или частично предотвращает связывание LIGHT с внеклеточной частью HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM, когда указанное антитело связано с указанной внеклеточной частью HVEM. Примерами антител являются: 45H6, 11H7, 36H12, 48H6 и 49G4.

15

20

В другом варианте реализации антитело против HVEM или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в настоящем документе, предотвращает связывание BTLA с внеклеточной частью HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM, и частично предотвращает связывание LIGHT с внеклеточной частью HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM, когда указанное антитело связано с указанной внеклеточной частью HVEM. Примерами антител являются: 45H6, 36H12, 48H6 и 49G4.

25

В другом варианте реализации антитело против HVEM или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в настоящем документе, предотвращает связывание BTLA с внеклеточной частью HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM, и не предотвращает связывание LIGHT с внеклеточной частью HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM, когда указанное антитело связано с указанной внеклеточной частью HVEM. Примером антитела является: 11H7.

30

35

В другом варианте реализации антитело против HVEM, как описано в настоящем документе, предотвращает связывание BTLA с внеклеточной частью HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM, и частично предотвращает связывание CD160 с внеклеточной частью HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM, когда указанное антитело связано с указанной внеклеточной частью HVEM. Примерами антител являются: 45H6, 11H7, 36H12, 48H6 и 49G4.

40

В другом варианте реализации антитело против HVEM или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в настоящем документе, предотвращает связывание BTLA с внеклеточной частью HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM, частично предотвращает связывание CD160 и LIGHT с внеклеточной частью HVEM на клетках,

экспрессирующих HVEM, когда указанное антитело связано с указанной внеклеточной частью HVEM. Примерами антител являются: 45H6, 36H12, 48H6 и 49G4.

5 В другом варианте реализации антитело против HVEM или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в настоящем документе, предотвращает связывание BTLA с
внеклеточной частью HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM, частично
предотвращает связывание CD160 с внеклеточной частью HVEM на клетках,
экспрессирующих HVEM, и не предотвращает связывание LIGHT с внеклеточной частью
10 HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM, когда указанное антитело связано с
указанной внеклеточной частью HVEM. Примером антитела является: 11H7.

Как правило, антитело против HVEM или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано выше, связывается с доменом CRD1 белка HVEM.

15 Связывание BTLA, CD160 и LIGHT с HVEM предпочтительно измеряют способом, описанным в примерах. Примерный способ описан, например, в примере 6b, результаты которого представлены на фигуре 6A-D. Предпочтительно используют клетки HEK293F, трансфицированные полноразмерным HVEM. Предпочтительно указанные клетки стабильно экспрессируют HVEM полной длины на плазматической мембране.
20 Тестируемое антитело исследуют с применением HVEM-экспрессирующих клеток HEK293F. Клетки инкубируют с представляющим интерес антителом против HVEM. После промывки клетки инкубируют с мечеными биотином или мечеными гистидином человеческими BTLA, CD160 или LIGHT. После промывки метку или таг обнаруживают с помощью флуоресцентно меченного стрептавидина или антитела против his.
25 Связывание BTLA, CD160 или LIGHT с HVEM, экспрессированными на клетках, можно измерить путем обнаружения флуоресценции с использованием проточного цитометра (FACS). Затем определяют способность предотвращать связывание путем сравнения процента BTLA, CD160 или LIGHT, связанных с HVEM в присутствии антитела против HVEM, с процентом связывания в присутствии контрольного антитела, которое не связывает HVEM. Менее связывание BTLA, CD160 или LIGHT с HVEM указывает на
30 более сильную блокирующую способность антитела.

Термин «замещать» относится к способности первого объекта смещать второй объект с его положения, посредством чего второй объект заменяется первым объектом. Если более (>)
35 70% лиганда, связанного с внеклеточной частью HVEM, замещено по сравнению с присутствием лиганда в отсутствие антитела, говорят, что указанный лиганд замещен. Если больше или равно ($\geq$) 30%, но меньше или равно ($\leq$) 70% лиганда, связанного с внеклеточной частью HVEM, замещено по сравнению с присутствием лиганда в отсутствие антитела, говорят, что указанный лиганд частично замещен. Говорят, что
40 лиганд не замещен, если менее (<) 30% лиганда, связанного с внеклеточной частью HVEM, замещено по сравнению с присутствием лиганда в отсутствие антитела. Если связывание лиганда увеличивается более чем на (>) 30% по сравнению с присутствием лиганда в отсутствие антитела, связывание указанного лиганда усилено.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, предотвращают связывание BTLA с внеклеточной частью HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM. Указанное антитело предпочтительно замещает BTLA, связанный с внеклеточной частью HVEM, на клетках, экспрессирующих HVEM.

5 Примерами антител являются: 45H6, 11H7, 36H12, 48H6 и 49G4.

В другом варианте реализации антитело против HVEM или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в настоящем документе, предотвращает связывание BTLA с внеклеточной частью HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM, и не предотвращает
10 или частично предотвращает связывание LIGHT с внеклеточной частью HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM, когда указанное антитело связано с указанной внеклеточной частью HVEM. Предпочтительно указанное антитело замещает BTLA, связанный с внеклеточной частью HVEM, на клетках, экспрессирующих HVEM, и не замещает LIGHT, связанный с внеклеточной частью HVEM, на клетках,
15 экспрессирующих HVEM. Примерами антител являются: 45H6, 11H7, 36H12, 48H6 и 49G4.

В другом варианте реализации антитело против HVEM или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в настоящем документе, предотвращает связывание BTLA с
20 внеклеточной частью HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM, и частично предотвращает связывание LIGHT с внеклеточной частью HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM, когда указанное антитело связано с указанной внеклеточной частью HVEM. Предпочтительно указанное антитело замещает BTLA, связанный с внеклеточной частью HVEM, на клетках, экспрессирующих HVEM, и не замещает
25 LIGHT, связанный с внеклеточной частью HVEM, на клетках, экспрессирующих HVEM. Примерами антител являются: 45H6, 36H12, 48H6 и 49G4.

В другом варианте реализации антитело против HVEM или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в настоящем документе, предотвращает связывание BTLA с
30 внеклеточной частью HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM, и не предотвращает связывание LIGHT с внеклеточной частью HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM, когда указанное антитело связано с указанной внеклеточной частью HVEM. Предпочтительно указанное антитело замещает BTLA, связанный с внеклеточной частью HVEM, на клетках, экспрессирующих HVEM, и не замещает LIGHT, связанный
35 с внеклеточной частью HVEM, на клетках, экспрессирующих HVEM. Примером антитела является: 11H7.

В другом варианте реализации антитело против HVEM, как описано в настоящем документе, предотвращает связывание BTLA с внеклеточной частью HVEM на клетках,
40 экспрессирующих HVEM, и частично предотвращает связывание CD160 с внеклеточной частью HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM, когда указанное антитело связано с указанной внеклеточной частью HVEM. Предпочтительно указанное антитело замещает BTLA, связанный с внеклеточной частью HVEM, на клетках, экспрессирующих HVEM, и частично замещает CD160, связанный с внеклеточной

частью HVEM, на клетках, экспрессирующих HVEM. Примерами антител являются: 45H6, 11H7, 36H12, 48H6 и 49G4.

- 5 В другом варианте реализации антитело против HVEM или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в настоящем документе, предотвращает связывание BTLA с
внеклеточной частью HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM, и частично
предотвращает связывание CD160 и LIGHT с внеклеточной частью HVEM на клетках,
экспрессирующих HVEM, когда указанное антитело связано с указанной внеклеточной
частью HVEM. Предпочтительно указанное антитело замещает BTLA, связанный с
10 внеклеточной частью HVEM, на клетках, экспрессирующих HVEM, частично замещает
CD160, связанный с внеклеточной частью HVEM, на клетках, экспрессирующих HVEM,
и не замещает LIGHT, связанный с внеклеточной частью HVEM, на клетках,
экспрессирующих HVEM. Примерами антител являются: 45H6, 36H12, 48H6 и 49G4.
- 15 В другом варианте реализации антитело против HVEM или его антигенсвязывающий
фрагмент, как описано в настоящем документе, предотвращает связывание BTLA с
внеклеточной частью HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM, частично
предотвращает связывание CD160 с внеклеточной частью HVEM на клетках,
экспрессирующих HVEM, когда указанное антитело связано с указанной внеклеточной
20 частью HVEM, и не предотвращает связывание LIGHT с внеклеточной частью HVEM на
клетках, экспрессирующих HVEM. Предпочтительно указанное антитело замещает
BTLA, связанный с внеклеточной частью HVEM, на клетках, экспрессирующих HVEM,
частично замещает CD160, связанный с внеклеточной частью HVEM, на клетках,
экспрессирующих HVEM, и не замещает LIGHT, связанный с внеклеточной частью
25 HVEM, на клетках, экспрессирующих HVEM. Примером антитела является: 11H7.

Как правило, антитело против HVEM или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано выше, связывается с доменом CRD1 белка HVEM.

- 30 Чтобы проанализировать, обладают ли описанные в настоящем документе антитела
против HVEM способностью замещать лиганды, связанные с внеклеточной частью
HVEM, специалист в данной области техники может использовать ряд известных
подходящих анализов. Один из подходящих способов раскрыт в разделе примеров.
Анализ подробно описан, например, в примере 6в. Предпочтительно применяют клетки
35 HEK293F, трансфицированные полноразмерным HVEM. Предпочтительно указанные
клетки стабильно экспрессируют HVEM полной длины на плазматической мембране.
Клетки инкубируют с растворимым лигандом (например, меченным биотином или
меченым гистидином BTLA, CD160 или LIGHT). Затем клетки инкубируют с антителом
согласно настоящему изобретению, связывающим внеклеточную часть HVEM. После
40 промывки лиганд, связанный с клетками, обнаруживают с помощью флуоресцентно
меченного стрептавидина или антитела против his. После промывки флуоресцентный
сигнал антитела, связанного с лигандом, можно обнаруживать с помощью проточного
цитометра (FACS). Количество лиганда, связанного с внеклеточной частью HVEM,
указывает на способность антитела против HVEM замещать лиганд, связанный с

внеклеточной частью HVEM антитела. Более низкий флуоресцентный сигнал лиганда указывает на более сильную способность замещать антитело против HVEM. Предпочтительный способ описан в примерах, результаты которых, например, изображены на фигурах 7A-D. Проценты замещения обычно указаны в процентах по сравнению со связыванием лиганда с HVEM в присутствии неспецифического антитела при идентичных во всем остальном условиях. Замещение можно измерить, используя метаболически активные клетки (например, инкубированные в течение ночи при 37°C) или используя метаболически неактивные клетки (например, инкубируя при 4°C в присутствии азида натрия).

Не ограничиваясь какой-либо теорией, считается, что активация Т-клеток ингибируется при взаимодействии BTLA и/или CD160 с HVEM даже в присутствии LIGHT и/или TNF β . Антитело, описанное в настоящем документе, применимо для клеток-мишеней, экспрессирующих HVEM. Связывание антитела, как описано в настоящем документе, замещает BTLA и предпочтительно, по меньшей мере, частично замещает CD160, связанный с внеклеточной частью HVEM, но не замещает LIGHT, связанный с внеклеточной частью HVEM. В результате благодаря способности предотвращать связывание BTLA и CD160 и способности замещать BTLA и предпочтительно частично замещать CD160, подавляется ингибирующее действие BTLA и CD160 на активацию Т-клеток. Клетка, которая связала антитело, как описано в настоящем документе, способна реагировать на другие стимулы, такие как связывание LIGHT или TNF β с HVEM.

Полноразмерный белок HVEM яванского макака (*Macaca fascicularis*) (Met1-Ser280; эталонная последовательность NCBI: XP_005545061.1, см. SEQ ID NO. 5) имеет аминокислотную последовательность, схожую с HVEM человека, и проявляет 82% гомологии с HVEM человека (Met1-His283; Swiss-Prot no. Q92956.3, см. SEQ ID NO. 1). Предсказанная аминокислотная последовательность внеклеточного домена HVEM яванского макака (т. е. Leu39-Val203; эталонная последовательность NCBI: XP_005545061.1) демонстрирует 87% гомологии с аминокислотной последовательностью внеклеточного домена белка HVEM человека (т. е. Leu 39-Val202; Swiss-Prot no. Q92956.3). Замены аминокислот HVEM человека соответствующими аминокислотами HVEM яванского макака можно использовать для тестирования специфичности и перекрестной специфичности антител. В одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению связывает HVEM человека и является перекрестно-специфичным в отношении HVEM яванского макака (*Macaca fascicularis*). Примерами антител являются: 45H6, 11H7, 48H6 и 49G4. Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что такие антитела особенно подходят для связывания с HVEM человека, несущим мутации. Кроме того, такие антитела подходят для тестирования на токсичность.

В одном аспекте настоящего изобретения предложено антитело, которое связывает внеклеточную часть HVEM на экспрессирующих HVEM клетках, содержащему переменную область тяжелой цепи с последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3, представленными в SEQ ID NO: 26-28, с 0, 1 или 2 аминокислотными вставками,

делециями, заменами или добавлениями, и вариабельную область легкой цепи с последовательностями CDR1, CDR2, CDR3, представленными в SEQ ID NO: 29-31, с 0, 1 или 2 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями. Предпочтительно антитело, которое связывает внеклеточную часть HVEM на экспрессирующих HVEM клетках, содержит вариабельную область тяжелой цепи с последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3, представленными в SEQ ID NO: 26-28, и вариабельную область легкой цепи с последовательностями CDR1, CDR2, CDR3, представленными в SEQ ID NO: 29-31.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложено антитело, которое связывает внеклеточную часть HVEM на экспрессирующей HVEM клетке, содержащее вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 24, с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 25, с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями. В предпочтительном варианте реализации 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных вставок, делеций, замен или добавлений расположены в каркасных областях вариабельной области легкой и/или тяжелой цепей. Предпочтительно антитело, которое связывает внеклеточную часть HVEM на экспрессирующей HVEM клетке, содержит вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 24, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 25. Примером антитела с такими характеристиками является 45Н6.

В одном аспекте настоящего изобретения предложено антитело, которое связывает внеклеточную часть HVEM на экспрессирующих HVEM клетках, содержащему вариабельную область тяжелой цепи с последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3, представленными в SEQ ID NO: 42-44, с 0, 1 или 2 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями, и вариабельную область легкой цепи с последовательностями CDR1, CDR2, CDR3, представленными в SEQ ID NO: 45-47, с 0, 1 или 2 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями. Предпочтительно антитело, которое связывает внеклеточную часть HVEM на экспрессирующих HVEM клетках, содержит вариабельную область тяжелой цепи с последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3, представленными в SEQ ID NO: 42-44, и вариабельную область легкой цепи с последовательностями CDR1, CDR2, CDR3, представленными в SEQ ID NO: 45-47.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложено антитело, которое связывает внеклеточную часть HVEM на экспрессирующей HVEM клетке, содержащее вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 40, с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 41, с 0, 1, 2,

- 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями. В предпочтительном варианте реализации 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных вставок, делеций, замен или добавлений расположены в каркасных областях переменной области легкой и/или тяжелой цепей. Предпочтительно
- 5 антитело, которое связывает внеклеточную часть HVEM на экспрессирующей HVEM клетке, содержит переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 40, и переменную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 41. Примером антитела с такими характеристиками является 11H7.
- 10 В одном аспекте настоящего изобретения предложено антитело, которое связывает внеклеточную часть HVEM на экспрессирующих HVEM клетках, содержащему переменную область тяжелой цепи с последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3, представленными в SEQ ID NO: 18-20, с 0, 1 или 2 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями, и переменную область легкой цепи с
- 15 последовательностями CDR1, CDR2, CDR3, представленными в SEQ ID NO: 21-23, с 0, 1 или 2 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями. Предпочтительно антитело, которое связывает внеклеточную часть HVEM на экспрессирующих HVEM клетках, содержит переменную область тяжелой цепи с последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3, представленными в SEQ ID NO: 18-20, и
- 20 переменную область легкой цепи с последовательностями CDR1, CDR2, CDR3, представленными в SEQ ID NO: 21-23.
- В другом аспекте в настоящем изобретении предложено антитело, которое связывает внеклеточную часть HVEM на экспрессирующей HVEM клетке, содержащее
- 25 переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 16, с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями, и переменную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 17, с 0, 1, 2,
- 30 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями. В предпочтительном варианте реализации 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных вставок, делеций, замен или добавлений расположены в каркасных областях переменной области легкой и/или тяжелой цепей. Предпочтительно антитело, которое связывает внеклеточную часть HVEM на экспрессирующей HVEM клетке, содержит переменную область тяжелой цепи с аминокислотной
- 35 последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 16, и переменную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 17. Примером антитела с такими характеристиками является 36H12.
- В одном аспекте настоящего изобретения предложено антитело, которое связывает
- 40 внеклеточную часть HVEM на экспрессирующих HVEM клетках, содержащему переменную область тяжелой цепи с последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3, представленными в SEQ ID NO: 34-36 с 0, 1 или 2 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями, и переменную область легкой цепи с последовательностями CDR1, CDR2, CDR3, представленными в SEQ ID NO: 37-39 с 0, 1

или 2 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями. Предпочтительно антитело, которое связывает внеклеточную часть HVEM на экспрессирующих HVEM клетках, содержит переменную область тяжелой цепи с последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3, представленными в SEQ ID NO: 34-36 и

5 переменную область легкой цепи с последовательностями CDR1, CDR2, CDR3, представленными в SEQ ID NO: 37-39.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложено антитело, которое связывает внеклеточную часть HVEM на экспрессирующей HVEM клетке, содержащее

10 переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 32, с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями, и переменную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 33, с 0, 1, 2,

15 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями. В предпочтительном варианте реализации 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных вставок, делеций, замен или добавлений расположены в каркасных областях переменной области легкой и/или тяжелой цепей. Предпочтительно антитело, которое связывает внеклеточную часть HVEM на экспрессирующей HVEM

клетке, содержит переменную область тяжелой цепи с аминокислотной

20 последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 32, и переменную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 33. Примером антитела с такими характеристиками является 48H6.

В одном аспекте настоящего изобретения предложено антитело, которое связывает внеклеточную часть HVEM на экспрессирующих HVEM клетках, содержащему

25 переменную область тяжелой цепи с последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3, представленными в SEQ ID NO: 50-52, с 0, 1 или 2 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями, и переменную область легкой цепи с последовательностями CDR1, CDR2, CDR3, представленными в SEQ ID NO: 53-55, с 0, 1

30 или 2 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями. Предпочтительно антитело, которое связывает внеклеточную часть HVEM на экспрессирующих HVEM клетках, содержит переменную область тяжелой цепи с последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3, представленными в SEQ ID NO: 50-52, и

переменную область легкой цепи с последовательностями CDR1, CDR2, CDR3,

35 представленными в SEQ ID NO: 53-55.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложено антитело, которое связывает внеклеточную часть HVEM на экспрессирующей HVEM клетке, содержащее

40 переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 48, с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями, и переменную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 49, с 0, 1, 2,

3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями. В предпочтительном варианте реализации 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10

аминокислотных вставок, делеций, замен или добавлений расположены в каркасных областях вариабельной области легкой и/или тяжелой цепей. Предпочтительно антитело, которое связывает внеклеточную часть HVEM на экспрессирующей HVEM клетке, содержит вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 48, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 49. Примером антитела с такими характеристиками является 49G4.

В одном аспекте антитело против HVEM или антигенсвязывающий фрагмент, указанные в настоящем документе последовательностью, предотвращают связывание BTLA с внеклеточной частью HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM, когда указанное антитело связано с указанной внеклеточной частью HVEM. Указанное антитело предпочтительно замещает BTLA, связанный с внеклеточной частью HVEM, на клетках, экспрессирующих HVEM. Примерами антител являются: 45H6, 11H7, 36H12, 48H6 и 49G4

В другом аспекте антитело против HVEM или его антигенсвязывающий фрагмент, указанные в настоящем документе последовательностью, предотвращает связывание BTLA с внеклеточной частью HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM, и частично предотвращает связывание LIGHT с внеклеточной частью HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM, когда указанное антитело связано с указанной внеклеточной частью HVEM. Предпочтительно указанное антитело замещает BTLA, связанный с внеклеточной частью HVEM, на клетках, экспрессирующих HVEM, и не замещает LIGHT, связанный с внеклеточной частью HVEM, на клетках, экспрессирующих HVEM. Примерами антител являются: 45H6, 36H12, 48H6 и 49G4.

В другом аспекте антитело против HVEM или его антигенсвязывающий фрагмент, указанные в настоящем документе последовательностью, предотвращает связывание BTLA с внеклеточной частью HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM, и не предотвращает связывание LIGHT с внеклеточной частью HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM, когда указанное антитело связано с указанной внеклеточной частью HVEM. Предпочтительно указанное антитело замещает BTLA, связанный с внеклеточной частью HVEM, на клетках, экспрессирующих HVEM, и не замещает LIGHT, связанный с внеклеточной частью HVEM, на клетках, экспрессирующих HVEM. Примером антитела является: 11H7.

В другом аспекте антитело против HVEM или его антигенсвязывающий фрагмент, указанные в настоящем документе последовательностью, предотвращает связывание BTLA с внеклеточной частью HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM, и частично предотвращает связывание CD160 с внеклеточной частью HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM, когда указанное антитело связано с указанной внеклеточной частью HVEM. Предпочтительно указанное антитело замещает BTLA, связанный с внеклеточной частью HVEM, на клетках, экспрессирующих HVEM, и частично замещает CD160, связанный с внеклеточной частью HVEM, на клетках, экспрессирующих HVEM. Примерами антител являются: 45H6, 11H7, 36H12, 48H6 и 49G4.

В другом аспекте антитело против HVEM или его антигенсвязывающий фрагмент, указанные в настоящем документе последовательно, предотвращает связывание BTLA с внеклеточной частью HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM, и частично предотвращает связывание CD160 и LIGHT с внеклеточной частью HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM, когда указанное антитело связано с указанной внеклеточной частью HVEM. Предпочтительно указанное антитело замещает BTLA, связанный с внеклеточной частью HVEM, на клетках, экспрессирующих HVEM, частично замещает CD160, связанный с внеклеточной частью HVEM, на клетках, экспрессирующих HVEM, и не замещает LIGHT, связанный с внеклеточной частью HVEM, на клетках, экспрессирующих HVEM. Примерами антител являются: 45H6, 36H12, 48H6 и 49G4.

В другом аспекте антитело против HVEM или его антигенсвязывающий фрагмент, указанные в настоящем документе последовательно, предотвращает связывание BTLA с внеклеточной частью HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM, частично предотвращает связывание CD160 с внеклеточной частью HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM, и не предотвращает связывание LIGHT с внеклеточной частью HVEM на клетках, экспрессирующих HVEM, когда указанное антитело связано с указанной внеклеточной частью HVE, причем указанное антитело замещает BTLA, связанный с внеклеточной частью HVEM, на клетках, экспрессирующих HVEM, частично замещает CD160, связанный с внеклеточной частью HVEM, на клетках, экспрессирующих HVEM, и не замещает LIGHT, связанный с внеклеточной частью HVEM, на клетках, экспрессирующих HVEM. Примером антитела является: 11H7.

Как правило, антитело против HVEM или его антигенсвязывающий фрагмент, указанные в настоящем документе последовательно, связывается с доменом CRD1 белка HVEM.

Антитело против HVEM или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, как описано в настоящем документе. Такое антитело имеет хорошие характеристики. Конечно, можно создать варианты такого исходного антитела путем модификации в нем одной или более аминокислот. Многие из таких вариантов будут вести себя более или менее аналогично по сравнению с указанным оригиналом. Такие варианты также входят в объем настоящего изобретения.

Варианты могут иметь аминокислотные замены, вставки, делеции или добавления по отношению к последовательности исходного антитела. Аминокислотная замена представляет собой замену одной аминокислоты другой аминокислотой. Предпочтительно, чтобы аминокислота была заменена аминокислотой, имеющей сходные химические свойства, что часто называют консервативной заменой. Делеции аминокислот приводят к удалению одной или более аминокислот из последовательности. Вставки аминокислот приводят к появлению в последовательности одной или более дополнительных аминокислот. Добавление аминокислот приводит к тому, что одна или более аминокислот находятся в начале или в конце аминокислотной последовательности.

Неограничивающим примером такой модификации является антитело, содержащее пироглутамат вместо глутамата. Другими неограничивающими примерами таких модификаций являются вставка, делеция, инверсия и/или замена одной или более аминокислот по сравнению с указанным исходным антителом. Предпочтительно аминокислотные замены, вставки, делеции или добавления находятся за пределами CDR варибельного домена. Предпочтительно аминокислотные замены, вставки, делеции или добавления находятся в каркасных областях варибельной области и/или в константной области антитела. Связывание вариантов HVEM можно тестировать, как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации константная область антитела согласно настоящему изобретению представляет собой константную область антитела IgG, IgA, IgD, IgE или IgM, такого как антитело IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Константные области могут включать модификации, такие как замены аминокислот, для придания специфических свойств константным областям. Например, мутация шарнирной области IgG4 для придания антителу большей стабильности по отношению к обмену полумолекулами. Другие модификации влияют на время полужизни антитела, добавляют или удаляют сайт гликозилирования, улучшают продукцию, улучшают однородность продукта антитела, получаемого в ферментерах большого масштаба, и т. д.

Антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой мышинный IgG1, человеческий IgG1, мутированный в константной области для снижения или предотвращения активации комплемента или взаимодействий с рецептором Fc, или человеческий IgG4, или человеческий IgG4, мутированный для предотвращения обмена полумолекулами с другими молекулами IgG4.

Допускаются некоторые вариации в CDR (CDR1-CDR2-CDR3) антитела, как описано в настоящем документе. Как правило, в одном CDR допускается примерно 0-2 аминокислотных замен, вставок, делеций или добавлений. Часто допускается более 2 аминокислотных замен.

Антитело согласно настоящему изобретению может иметь CDR1, CDR2 или CDR3 тяжелой цепи с 0-5, предпочтительно 0-2, более предпочтительно 2, 1 или 0 аминокислотными заменами, вставками, делециями или добавлениями относительно встречающихся в природе CDR1, CDR2 или CDR3 тяжелых цепей.

Такое антитело может иметь CDR1, CDR2 или CDR3 легкой цепи с 0-5, предпочтительно 0-2, более предпочтительно 0-1, более предпочтительно 0 аминокислотными заменами, вставками, делециями или добавлениями относительно встречающихся в природе CDR1, CDR2 или CDR3 легких цепей.

Допускаются некоторые вариации варибельных областей антитела, как описано в настоящем документе. Обычно в варибельной цепи допускается примерно 0-10 аминокислотных замен. Часто допускается более 10 аминокислотных замен.

Антитело согласно настоящему изобретению может иметь варибельную область тяжелой цепи с 0-15, предпочтительно 0-10, более предпочтительно 0-5, более предпочтительно 5, 4, 3, 2, 1 или 0 аминокислотными заменами, вставками, делециями,

или добавлениями в отношении встречающейся в природе вариабельной области тяжелой цепи.

5 Такое антитело может иметь вариабельную область легкой цепи с 0-15, предпочтительно 0-10, более предпочтительно 0-5, более предпочтительно 5, 4, 3, 2, 1 или 0 аминокислотными заменами, вставками, делециями или добавлениями по отношению к встречающейся в природе вариабельной области легкой цепи.

10 Допускаются некоторые вариации константной области антитела, раскрытые в настоящем документе. Обычно в константной области допускается примерно 0-10 аминокислотных замен. Часто допускается более 10 аминокислотных замен. Антитело согласно настоящему изобретению может иметь константную область тяжелой цепи (CH1-CH2-CH3) с 0-15, предпочтительно 0-10, более предпочтительно 0-5, более предпочтительно 5, 4, 3, 2, 1 или 0 аминокислотными заменами по отношению к встречающейся в природе константной области тяжелой цепи (CH1-CH2-CH3). Такое антитело может иметь константную область легкой цепи с 0-5, предпочтительно 5, 4, 3, 2, 1 или 0 аминокислотными заменами по отношению к встречающейся в природе константной области легкой цепи.

15 Некоторые вариации IgG4 встречаются в природе и/или допускаются без изменения иммунологических свойств полученного антитела. Антитело с константной областью IgG4 или мутированной константной областью IgG1 обладает по меньшей мере 20 большинством фармакологических свойств антитела, но не связывает комплемент и, таким образом, не вызывает истощения клеток, с которыми оно связывается *in vivo*. Предпочтительно указанная константная область представляет собой константную область человеческого антитела (химерную).

25 Предпочтительно указанная константная область представляет собой область, в которой отсутствует активация комплемента, предпочтительно константная область человеческого IgG4 или мутированная константная область человеческого IgG1.

30 Связывание HVEM антителом и его антигенсвязывающими фрагментами, описанными в настоящем документе, можно подтвердить с помощью ряда подходящих анализов, известных специалисту в данной области техники. Такие анализы включают, например, анализы аффинности, например вестерн-блоты, радиоиммуноанализ, FACS и ELISA (иммуноферментный анализ). Примеры (например, пример 2с и 6а) подробно описывают некоторые из множества анализов, которые можно применять для измерения связывания HVEM, а также способ определения относительной аффинности связывания антитела против HVEM человека.

40 В другом аспекте в настоящем изобретении предложена молекула нуклеиновой кислоты или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитело, как раскрыто в настоящем документе, или его антигенсвязывающий фрагмент, как раскрыто в настоящем документе. Кроме того, предложена молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая вариабельную область, описанную в настоящем документе. Нуклеиновая кислота, используемая в настоящем изобретении, обычно, но не исключительно, представляет собой рибонуклеиновую кислоту (РНК) или дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК). На основании генетического кода специалист в данной области техники

может определить последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует вариант антитела, описанный в настоящем документе. На основании вырожденности генетического кода шестьдесят четыре кодона можно использовать для кодирования двадцати аминокислот и терминального сигнала трансляции. Как известно

5 специалистам в данной области техники, систематическая ошибка использования кодонов в разных организмах может влиять на уровень экспрессии генов. Специалисту доступны различные вычислительные инструменты для оптимизации использования кодонов в зависимости от того, в каких организмах будет экспрессироваться желаемая нуклеиновая кислота.

10 В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен вектор, содержащий молекулу последовательности нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем документе. Используемый в настоящем документе термин «вектор» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, такой как плаزمид, бактериофаг или вирус животных, способной вводить гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина.

15 Вектор согласно настоящему изобретению обеспечивает экспрессию или продукцию антитела согласно изобретению, кодируемого гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, в клетке-хозяине. Вектор, используемый в соответствии с изобретением, например, получен из вируса животного происхождения, примеры которого включают, помимо прочего, вирус коровьей оспы (включая аттенуированные производные, такие как модифицированный вирус осповакцины Анкара, MVA), вирус

20 болезни Ньюкасла (NDV), аденовирус или ретровирус. Вектор согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит экспрессионную кассету, содержащую промотор, подходящий для инициации транскрипции антитела согласно настоящему изобретению в выбранных клетках-хозяевах. Примеры подходящих промоторов для

25 экспрессии полипептидов согласно настоящему изобретению в эукариотических клетках-хозяевах включают, но не ограничиваются ими, промотор бета-актина, промотор иммуноглобулина, промотор 5S РНК или промоторы вирусного происхождения, такие как промоторы цитомегаловируса (CMV), вируса саркомы Рауса (RSV) и промоторы обезьяньего вируса 40 (SV40) для хозяев-млекопитающих.

30 Когда молекула нуклеиновой кислоты или молекулы нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем документе, экспрессируется/экспрессируются в клетке, клетка может продуцировать антитело в соответствии с изобретением. Таким образом, в одном варианте реализации предложена клетка, содержащая антитело, молекулу или

35 молекулы нуклеиновой кислоты и/или вектор согласно настоящему изобретению. Клетки-хозяева могут представлять собой клетки млекопитающих, насекомых, растений, бактерий или дрожжей. Указанная клетка предпочтительно представляет собой клетку животного, предпочтительно клетку млекопитающего, наиболее предпочтительно клетку человека. Примеры клеточных линий млекопитающих,

40 подходящих в качестве клеток-хозяев, включают клетки гибридомы, клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки NSO или клетки PER-C6™. Для целей настоящего изобретения подходящей клеткой является любая клетка, способная содержать и предпочтительно продуцировать указанные антитела и/или указанные нуклеиновые

кислоты. В настоящее изобретение дополнительно включены клеточные культуры, которые содержат указанные клетки.

Термин «клетка-хозяин» относится к клетке, в которую был введен вектор экспрессии. Термин охватывает не только конкретную рассматриваемую клетку, но также и потомство такой клетки. Поскольку определенные модификации могут возникать в последующих поколениях либо вследствие влияния окружающей среды, либо вследствие мутации, такое потомство может не быть идентичным родительской клетке, но все же входит в объем термина «клетка-хозяин».

Антитело, как описано в настоящем документе, может быть получено любым способом, известным специалисту в данной области техники. В предпочтительном варианте реализации антитела продуцируют с использованием клетки, причем предпочтительно клетка представляет собой клетку гибридомы, клетку СНО, клетку NS0 или клетку PER-C6™. В конкретном предпочтительном варианте реализации указанная клетка представляет собой клетку СНО, предпочтительно указанную клетку культивируют в бессывороточной среде. Это включает сбор указанного антитела из указанной культуры. Антитело предпочтительно очищено из среды, предпочтительно указанное антитело очищено аффинным путем. В качестве альтернативы указанные антитела могут быть получены синтетическим путем.

Различные учреждения и компании разработали клеточные линии для крупномасштабного производства антител, например, для клинического применения. Эти клетки также используются для других целей, таких как производство белков. Линии клеток, разработанные для производства белков и антител в промышленных масштабах, далее называются в настоящем описании промышленными линиями клеток. Таким образом, предпочтительный вариант реализации настоящего изобретения предусматривает использование клеточной линии, разработанной для крупномасштабного производства указанных антител.

Антитело согласно настоящему изобретению проявляет ряд активностей, которые можно успешно применять в терапевтических и нетерапевтических целях. В частности, антитела согласно настоящему изобретению применимы для лечения индивидуума. Предпочтительно антитела согласно настоящему изобретению применимы для лечения заболеваний, связанных с иммунитетом, или для предотвращения заболеваний, связанных с иммунитетом. В предпочтительном варианте реализации антитела согласно настоящему изобретению применимы для лечения рака. В некоторых вариантах реализации антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно применяют в терапии, предпочтительно в терапии человека. В некоторых вариантах реализации описанное в настоящем документе антитело можно применять в исследовательских целях. Например, в экспериментах *in vitro*, культуре клеток, органотипической культуре и моделях *in vivo*.

Также описаны способы лечения рака. Примеры рака представляют собой, например, меланому, плоскоклеточную карциному пищевода, гепатоцеллюлярную карциному и колоректальный рак.

Настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта, страдающего раком, включающему введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антитела, как описано в настоящем документе. Кроме того, предложен способ получения лекарственного средства для лечения субъекта, страдающего раком. В настоящем изобретении описаны способы предотвращения ингибирования активации Т-клеток путем предотвращения связывания BTLA и HVEM, а также CD160 и HVEM.

Настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта, страдающего воспалительными заболеваниями, включающему введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антитела, как описано в настоящем документе. Кроме того, предложен способ получения лекарственного средства для лечения субъекта, страдающего воспалительными заболеваниями. В настоящем изобретении описаны способы предотвращения ингибирования активации Т-клеток путем предотвращения связывания BTLA и HVEM, а также CD160 и HVEM.

Настоящее изобретение дополнительно включает фармацевтическую композицию, содержащую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в настоящем документе, или нуклеиновую кислоту, кодирующую его, или клетку, содержащую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в настоящем документе, или нуклеиновую кислоту, кодирующую его. Предложены фармацевтические композиции, содержащие полипептид согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель и/или вспомогательное вещество. Такие композиции особенно подходят для применения в качестве лекарственного средства. Композиции могут быть в любых подходящих формах, таких как жидкие, полутвердые и твердые лекарственные формы. Дозировка и схема приема состава, которые выбирают, могут быть определены стандартными процедурами, хорошо известными специалисту в данной области техники. Такие процедуры включают экстраполяцию и оценку схемы дозирования на животных моделях, а затем определение оптимальной дозировки в клиническом исследовании диапазона доз на людях. Дозировка в фармацевтических композициях будет варьироваться в зависимости от ряда факторов, таких как желаемое высвобождение и фармакодинамические характеристики.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, описанная в настоящем документе, для применения в качестве профилактического средства или для лечения рака и/или нарушений, связанных с иммунитетом.

Кроме того, предложены способы модулирования сигнальной активности HVEM. Термин «модулировать» относится к активности по регулированию выходного сигнала системы. Выходной сигнал или выход можно регулировать таким образом, чтобы ингибирующий выходной сигнал становился стимулирующим и наоборот. Настоящее изобретение относится к способу модуляции передачи сигналов HVEM, включающему введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антитела, как описано в настоящем документе. Не ограничиваясь какой-либо теорией, считается, что

HVEM доставляет коингибирующие сигналы Т-клеткам, экспрессирующим BTLA или CD160. С другой стороны, LIGHT и TNF β передают костимулирующие сигналы Т-клетке при взаимодействии с HVEM, экспрессируемым на Т-клетке. Когда LIGHT и/или TNF β , BTLA и/или CD160 одновременно взаимодействуют с HVEM, суммарный результат представляет собой ингибирующий сигнал для активации Т-клеток. Это взаимодействие является двунаправленным: HVEM индуцирует ингибирующие сигналы в Т-клетках после взаимодействия с BTLA и CD160 на Т-клетках, в то время как BTLA и CD160 действуют как активирующие лиганды для HVEM, что приводит к активации NF κ B. Кроме того, LIGHT доставляет костимулирующие сигналы Т-клетке при взаимодействии с HVEM, экспрессируемым на Т-клетке, и HVEM также участвует в передаче костимулирующих сигналов Т-клетке при взаимодействии со LIGHT, экспрессируемым Т-клеткой. Однако LIGHT не содержит очевидного сигнального мотива, и его механизм передачи сигналов не полностью определен.

Передача костимулирующих и коингибирующих сигналов, передаваемых HVEM и BTLA в Т-клетке, может быть измерена по уровням NF κ B или NFAT, а также по высвобождению IL-2, TNF α и IFN γ . Способы измерения уровней NFAT известны в данной области техники. Примерный способ описан, например, в примере 3с, результаты которого представлены на фигуре 4А-В. Способы измерения уровней NF κ B известны в данной области техники. Примерный способ описан, например, в примере 6f, результаты которого представлены на фигуре 8А-С. Способы измерения уровней IL-2, TNF α и IFN γ известны в данной области техники. Примерный способ описан, например, в примере 6k, результаты которого представлены на фигуре 11А-С.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ модулирования сигнальной активности HVEM, включающий приведение клеток, экспрессирующих HVEM, в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, молекулой нуклеиновой кислоты или вектором, как описано в настоящем документе.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ усиления иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, молекулу нуклеиновой кислоты или вектор, как описано в настоящем документе.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ уменьшения роста опухоли у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, молекулу нуклеиновой кислоты или вектор, как описано в настоящем документе.

Используемый в настоящем документе термин «субъект» представляет собой человека или животное. Субъекты включают, но не ограничиваются ими, млекопитающих, таких как люди, свиньи, хорьки, тюлени, кролики, кошки, собаки, коровы и лошади, и птиц, таких как куры, утки, гуси и индейки. В предпочтительном

варианте реализации настоящего изобретения субъектом является млекопитающее. В особенно предпочтительном варианте реализации субъектом является человек.

Термин «антигенсвязывающий фрагмент» антитела относится к одной или более частям полноразмерного антитела, которые сохраняют способность связываться с тем же антигеном (т.е. человеческим HVEM), с которым связывается антитело. Термин «антигенсвязывающий фрагмент» также включает часть антитела, которая является частью более крупной молекулы, образованной нековалентной или ковалентной связью, или части антитела с одним или более дополнительными молекулярными объектами. Примеры дополнительных молекулярных единиц включают аминокислоты, пептиды или белки, такие как центральная часть стрептавидина, которые можно использовать для получения тетрамерной молекулы scFv (Kipriyanov et al. Hum Antibodies Hybridomas 1995; 6(3): 93-101). Примером антигенсвязывающего фрагмента является VH и/или VL антитела. Антигенсвязывающие фрагменты включают Fab, F(ab'), F(ab')₂, фрагменты определяющей комплементарности области (CDR), одноцепочечные антитела (scFv), двухвалентные одноцепочечные антитела и другие антиген-распознающие фрагменты иммуноглобулина. В некоторых случаях термин «антитело», используемый в настоящем документе, может пониматься как включающий его антигенсвязывающий фрагмент.

Термин «человеческое антитело» относится к антителу, состоящему только из аминокислотных последовательностей человеческого иммуноглобулина. Человеческое антитело может содержать мышиные углеводные цепи, если оно получено у мыши, в мышинной клетке или в гибридоме, полученной из мышинной клетки. Человеческие антитела могут быть получены различными способами, известными в данной области техники.

Термин «эпитоп» относится к части антигена, которая способна специфически связываться с антителом или Т-клеточным рецептором или иным образом взаимодействовать с молекулой. «Эпитоп» также упоминается в данной области техники как «антигенная детерминанта». Эпитоп обычно состоит из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи углеводов или сахаров. Эпитоп может быть «линейным» или «нелинейным/конформационным». После определения желаемого эпитопа (например, путем картирования эпитопа) можно получить антитела к этому эпитопу. Генерация и характеристика антител также может предоставить информацию о желаемых эпитопах. На основе этой информации затем можно провести скрининг антител для получения тех, которые связываются с одним и тем же эпитопом, например, путем проведения исследований перекрестной конкуренции, чтобы найти антитела, которые конкурентно связываются друг с другом, т. е. антитела конкурируют за связывание с антигеном.

Используемый в настоящем документе термин «включать» и его спряжения используется в его неограничивающем смысле для обозначения того, что элементы, следующие за указанным словом, включены, но элементы, не упомянутые конкретно, не

исключены. Кроме того, глагол «состоять» может быть заменен на «состоять по существу из», что означает, что соединение или вспомогательное соединение, как определено в настоящем документе, может содержать дополнительный компонент (компоненты), помимо тех, которые указаны конкретно, причем указанный дополнительный компонент (компоненты) не изменяет уникальную характеристику настоящего изобретения.

Единственное число используется в настоящем документе для обозначения одного или более чем одного (т. е. по меньшей мере одного) грамматического объекта. Например, «элемент» означает один элемент или более одного элемента.

Слово «приблизительно» или «примерно» при использовании в связи с числовым значением (приблизительно 10, примерно 10) предпочтительно означает, что значение может представлять собой заданное значение 10, которое на 1% больше или меньше от указанного значения.

В настоящей заявке термины «лечение», «лечить» и «лечат» относятся к реверсии, облегчению, отсрочке начала или ингибированию развития заболевания или расстройства или одного или более их симптомов, как описано в настоящей заявке. В некоторых вариантах реализации лечение можно проводить после развития одного или более симптомов. В других вариантах реализации лечение можно проводить при отсутствии симптомов. Например, лечение может быть назначено восприимчивому индивиду до появления симптомов (например, исходя из симптомов в анамнезе и/или исходя из генетических или других факторов восприимчивости). Лечение также может быть продолжено после исчезновения симптомов, например, для предотвращения или отсрочки их повторения.

В целях ясности и краткости описания признаки описываются в настоящем документе как часть одного и того же или отдельных вариантов реализации. Однако следует понимать, что объем настоящего изобретения может включать варианты реализации, имеющие комбинации всех или некоторых из описанных признаков.

Все ссылки на патенты и литературу, цитируемые в настоящем описании, включены в настоящий документ в качестве ссылки во всей своей полноте.

Настоящее изобретение далее поясняется следующими примерами. Эти примеры не ограничивают объем изобретения, а служат только для пояснения изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1. Проточно-цитометрические характеристики связывания мышинных антител против HVEM человека с мембраносвязанным полноразмерным HVEM человека, с мембраносвязанным HVEM человека с делецией по CRD1, или с мембраносвязанным полноразмерным HVEM яванского макака на клетках HEK293F. Пунктирная линия

представляет собой фоновый уровень (т. е. отсутствие связывания мышиных антител против HVEM человека).

Фигура 2. Влияние мышиных антител против HVEM человека на связывание (А) растворимого BTLA человека и (В) растворимого LIGHT человека с мембраносвязанным полноразмерным HVEM человека на клетках HEK293F. Пунктирная линия представляет отрицательный контроль (т. е. связывание лиганда/рецептора без добавления мышиного антитела против человека или с добавлением мышиного отрицательного изотипического контроля IgG1 = 100% связывание лигандов с рецептором HVEM).

Фигура 3. (А) Влияние мышиных антител против HVEM человека на передачу сигналов NFκB в клетках, экспрессирующих мембраносвязанный HVEM человека. Растворимый человеческий лиганд LIGHT был включен в качестве эталона. (В) Влияние мышиных антител против HVEM человека на индуцированную растворимым человеческим LIGHT (≈EC80) передачу сигналов NFκB в клетках, экспрессирующих мембраносвязанный HVEM человека. Показано среднее значение ± стандартное отклонение (n = 2).

Фигура 4. (А) Аналитический принцип биоанализа блокирования NFAT-элемента ответа-люциферазы (RE-luc) BTLA/HVEM человека: комбинацию (1) активаторных клеток CHO-K1, экспрессирующих мембранный HVEM человека и запатентованный активатор мембранного Т-клеточного рецептора человека (TCR), (т.е. искусственных антиген-презентирующих клеток (aAPC)) и (2) NFAT-RE-luc эффекторных Т-клеток Jurkat, экспрессирующих комплекс мембранного BTLA человека и мембранного TCR человека, использовали для изучения способности мышиных антител против HVEM человека блокировать BTLA/HVEM-опосредованное ингибирование TCR-индуцированной передачи сигналов NFAT. (В) Влияние мышиных антител против HVEM человека на ингибирование TCR-индуцированной передачи сигналов NFAT, опосредованное мембраносвязанными BTLA человека/HVEM человека, в экспрессирующих мембраносвязанные BTLA человека/TCR человека эффекторных Т-клетках Jurkat. Показано среднее значение ± стандартное отклонение (n = 2).

Фигура 5. Характеристики проточной цитометрии связывания очищенных мышиных блокирующих BTLA/HVEM по сравнению с химерными мышиными/человеческими антителами против HVEM человека с мембраносвязанными (полноразмерными) HVEM человека на клетках HEK293F. Показано среднее значение ± стандартное отклонение (n = 2).

Фигура 6. Влияние очищенных блокирующих мышиных BTLA/HVEM по сравнению с химерными мышиными/человеческими антителами против HVEM человека на связывание (А) растворимого BTLA человека, (В) растворимого CD160 человека, (С) растворимого LIGHT человека и (D) растворимого TNFβ человека на мембраносвязанный полноразмерный HVEM человека на клетках HEK293F. Пунктирная линия представляет отрицательный контроль (т. е. связывание лиганда/рецептора с добавлением мышиного отрицательного изотипического контроля IgG1 или человеческого IgG4 = 100% связывание лигандов с рецептором HVEM). Среднее значение ± стандартное отклонение (n = 2–3) показано для одного (D), двух (А и В) или трех (С) независимых проведенных экспериментов.

Фигура 7. Влияние очищенных BTLA/HVEM химерных мышиных/человеческих антител против HVEM человека на замещение предварительно связанного (А) растворимого BTLA человека, (В) растворимого CD160 человека, (С) растворимого LIGHT человека и (D) растворимого TNF человека из мембраносвязанного полноразмерного HVEM человека на клетках HEK293F. Пунктирная линия представляет отрицательный контроль (т. е. связывание лиганда/рецептора с добавлением отрицательного изотипического контроля человеческого IgG4 = 100% связывание лигандов с рецептором HVEM). Показано среднее значение $\pm$ стандартное отклонение ($n = 2$).

Фигура 8. (А) Влияние очищенных BTLA/HVEM блокирующих химерных мышиных/человеческих антител против HVEM человека на передачу сигналов NF κ B в клетках, экспрессирующих мембраносвязанный HVEM человека. Растворимый лиганд LIGHT человека был включен в качестве эталона. (В) Влияние неспитых относительно спитых очищенных BTLA/HVEM-блокирующих химерных мышиных/человеческих антител против HVEM человека на передачу сигналов NF κ B в клетках, экспрессирующих мембраносвязанный HVEM человека. Растворимый лиганд LIGHT человека был включен в качестве эталона. (С) Влияние очищенных BTLA/HVEM-блокирующих химерных мышиных/человеческих антител против HVEM человека на индуцированную растворимым LIGHT человека ($\approx$ EC80) передачу сигналов NF κ B в клетках, экспрессирующих мембраносвязанный HVEM человека. Среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n = 2$) показано из одного (В) или двух (А и С) независимых проведенных экспериментов.

Фигура 9. (А) Влияние растворимого лиганда TNF β человека на передачу сигналов NF κ B в клетках, экспрессирующих мембраносвязанный HVEM человека. (В) Влияние очищенных BTLA/HVEM-блокирующих химерных мышиных/человеческих антител против HVEM человека на индуцированную растворимым TNF β человека ($\approx$ EC80) передачу сигналов NF κ B в клетках, экспрессирующих мембраносвязанный HVEM человека. Показано среднее значение $\pm$ стандартное отклонение ($n = 3$).

Фигура 10. Влияние очищенных BTLA/HVEM-блокирующих химерных мышиных/человеческих антител против HVEM человека на ингибирование TCR-индуцированной передачи сигналов NFAT, опосредованное мембраносвязанными BTLA человека/HVEM человека, в экспрессирующих мембраносвязанные BTLA человека/TCR человека эффекторных Т-клетках Jurkat. Среднее значение $\pm$ стандартное отклонение ($n = 2$) показано из двух независимых проведенных экспериментов.

Фигура 11. Влияние очищенных BTLA/HVEM-блокирующих химерных мышиных/человеческих антител против HVEM человека на опосредованное мембраносвязанными BTLA человека/HVEM человека ингибирование TCR-индуцированного (верхний ряд фигур) и TCR/CD28-индуцированного (нижний ряд фигур) высвобождения IL-2 (А), TNF α (В) или IFN γ (С) из мембраносвязанных экспрессирующих BTLA человека/TCR человека первичных наивных Т-клеток человека, полученных от 6 здоровых доноров (донор А, С, D, G, H и K). Пунктирная линия представляет базовое высвобождение цитокинов (т. е. воздействие отрицательного изотипического контроля IgG4/человека). Показано среднее значение $\pm$ стандартное отклонение ($n = 5$).

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение мышинных моноклональных антител против HVEM человека

(а). Получение клеток насекомых Sf9 и клеток HEK293F, экспрессирующих поверхностный HVEM человека

кДНК, кодирующая белок HVEM человека (Swiss-Prot № Q92956.3; см. SEQ ID № 1), была оптимизирована для экспрессии у млекопитающих и синтезирована GENEART, Регенсбург, Германия (см. SEQ ID № 2). Эту кДНК субклонировали в бакуловирусной плазмиде pVL1393 для переноса (набор для трансфекции BD, кат. № 560129; BD Biosciences). Затем клетки насекомых Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) трансфицировали плазмидой pVL1393 для переноса, содержащей кДНК, кодирующую HVEM человека, с использованием набора baculoCOMPLETE all-in-one (Oxford Expression Technologies), а затем инкубировали при 27°C в течение 4-5 дней. После этой стадии трансфекции супернатант собирали и хранили при 4°C, а затем использовали для заражения большего количества клеток насекомых Sf9 для амплификации вируса. Для этого клетки насекомых Sf9 трансфицировали амплифицированным рекомбинантным бакуловирусом, а затем инкубировали при 27°C в течение 3-5 дней. Эти клетки насекомых Sf9 собирали, промывали стерильным PBS и разделяли на аликвоты по $20,0 \times 10^6$ клеток/мл в PBS и хранили при -80°C для получения клеточных лизатов. Перед хранением поверхностную экспрессию HVEM человека на трансфицированных клетках насекомых Sf9 подтверждали с использованием разбавленного 1:20 конъюгированного с фикоэритрином (PE) мышинового антитела против HVEM человека (клон eBioHVEM-122; eBioscience) и проточной цитометрии.

кДНК, кодирующая белок HVEM человека (Swiss-Prot № Q92956.3; см. SEQ ID № 1), была оптимизирована для экспрессии у млекопитающих и синтезирована GENEART, Регенсбург, Германия (см. SEQ ID № 2). Эту кДНК субклонировали в экспрессионной плазмиде, полученной из pcDNA3.1. Эту полноразмерную HVEM-плазмиду человека трансфицировали в клетки FreeStyle™ 293F (Life Technologies) с применением системы экспрессии FreeStyle™ 293 (Life Technologies). Стабильные трансфицированные полноразмерным HVEM человека клетки HEK293F (клон № 128) отбирали с применением 125 мкг/мл G418 (Gibco). Эти клетки HEK293F собирали, промывали стерильным PBS и разделяли на аликвоты по $19,0 \times 10^6$ клеток/мл в PBS и хранили при -80°C для получения клеточных лизатов. Перед хранением поверхностную экспрессию HVEM человека на трансфицированных клетках HEK293F подтверждали с использованием разбавленного 1:20 конъюгированного с фикоэритрином (PE) мышинового антитела против HVEM человека (клон eBioHVEM-122; eBioscience) и проточной цитометрии.

(b). Иммунизация и получение мышинных моноклональных антител против HVEM человека

Применяли два протокола иммунизации:

5 Во время первого протокола иммунизации мышам BALB/c (самки в возрасте 6-8 недель; Charles River Laboratories) подкожно вводили приблизительно 500 мкл растворимого рекомбинантного С-концевого меченого полигистидином внеклеточного домена HVEM человека (NCBI Ref SEQ NP_003811.2; Sino Biological Inc) в эмульгированном виде по типу вода-в-масле в полном адъюванте Фрейнда (CFA; Sigma) или в эмульгированном виде по типу масло-в-воде в адъюванте Sigma Adjuvant System® (SAS; Sigma) в День 0; каждой мышке вводили 25 мкг рекомбинантного HVEM человека в 250 мкл PBS, смешанного с 250 мкл CFA или SAS. На 21-й день образование антител усиливали подкожными инъекциями рекомбинантного HVEM человека в неполном адъюванте Фрейнда (IFA; Sigma) или SAS; каждой мышке вводили 25 мкг рекомбинантного HVEM человека в 250 мкл PBS, смешанного с 250 мкл IFA или SAS. На 42-й и 87-й день мышам снова вводили подкожные инъекции рекомбинантного HVEM человека и лизата клеток насекомых Sf9, трансфицированных HVEM человека, в IFA или SAS; каждой мышке вводили 25 мкг рекомбинантного HVEM человека и лизата клеток Sf9, трансфицированных HVEM человека (полученного из $1,8 \times 10^6$ жизнеспособных и мембраносвязанных клеток, экспрессирующих HVEM) в 250 мкл PBS, смешанного с 250 мкл IFA или SAS. Наконец, путем внутрибрюшинной инъекции мышам вводили рекомбинантный HVEM человека и лизат клеток насекомых Sf9, трансфицированных HVEM человека, без адъюванта на 98-й и 99-й день; каждой мышке вводили 25 мкг рекомбинантного HVEM человека и лизата клеток насекомых Sf9, трансфицированных HVEM человека (полученного из $1,8 \times 10^6$ жизнеспособных и мембраносвязанных клеток, экспрессирующих HVEM) в 250 мкл PBS. На 102-й день спленоциты от иммунизированных мышей сливали с клетками миеломы SP2/0-Ag14 (DSMZ) с использованием стандартной гибридомной технологии, первоначально описанной Köhler и Milstein (Nature 1975, 256: 495), как описано ниже.

30 Во время второго протокола иммунизации мышам BALB/c (самки в возрасте 6-8 недель; Charles River Laboratories) подкожно вводили приблизительно 500 мкл растворимого рекомбинантного С-концевого меченого полигистидином внеклеточного домена HVEM человека (NCBI Ref SEQ NP_003811.2; Sino Biological Inc) и лизат клеток насекомых Sf9, трансфицированных HVEM человека, или лизат клеток HEK293F, трансфицированных HVEM человека, в CFA или SAS или без адъюванта в День 0; каждой мышке вводили 10-20 мкг рекомбинантного HVEM человека и клеток насекомых Sf9, трансфицированных HVEM человека, или лизата клеток HEK293F (оба приготовлены из $5,0 \times 10^6$ жизнеспособных и мембраносвязанных клеток, экспрессирующих HVEM) в 250 мкл PBS, смешанного с 250 мкл CFA или SAS или без него. На 21-й и 42-й день образование антител усиливали путем подкожных инъекций рекомбинантного HVEM человека и лизата клеток насекомых Sf9, трансфицированных HVEM человека, или лизата клеток HEK293F, трансфицированных HVEM человека, в IFA или SAS или без адъюванта; каждой мышке вводили 10-20 мкг рекомбинантного

HVEM человека и клеток насекомых Sf9, трансфицированных HVEM человека, или лизата клеток HEK293F (оба приготовлены из $5,0 \times 10^6$ жизнеспособных и мембраносвязанных клеток, экспрессирующих HVEM) в 250 мкл PBS, смешанного с 250 мкл IFA или SAS или без него. Наконец, мышам путем внутривентральной инъекции вводили рекомбинантный HVEM человека и лизат клеток насекомых Sf9, трансфицированных HVEM человека, или лизат клеток HEK293F, трансфицированных HVEM человека, без адъюванта на 59-й и 64-й день; каждой мыши вводили 10-20 мкг рекомбинантного HVEM человека и клеток Sf9, трансфицированных HVEM человека, или лизата клеток HEK293F (оба получены из $5,0 \times 10^6$ жизнеспособных и мембраносвязанных клеток, экспрессирующих HVEM) в 250 мкл PBS. На 67-й день спленоциты от иммунизированных мышей сливали с клетками миеломы SP2/0-Ag14 (DSMZ) с использованием стандартной гибридомной технологии, первоначально описанной Köhler и Milstein (Nature 1975, 256: 495). Вкратце, иммунизированных мышей умерщвляли. Спленоциты выделяли из селезенки и промывали в бессывороточной среде opti-MEM® I со средой GlutaMax (среда SF; Invitrogen). Логарифмически растущие клетки миеломы SP2/0-Ag14 промывали в среде SF и добавляли к спленоцитам, получая соотношение спленоцитов к клеткам миеломы 5:1. Затем клетки осаждали, и удаляли супернатант. Затем добавляли по каплям один мл 37% (об./об.) раствора полиэтиленгликоля 4000 (Merck) в течение 60 с, после чего клетки инкубировали еще 60 с при 37°C. Затем при осторожном перемешивании медленно добавляли 8 мл среды SF, а затем 5 мл opti-MEM® I с GlutaMax/10% (об./об.) фетальной телячьей сыворотки (FCS; Bodinco). Через 30 минут при комнатной температуре (КТ) клетки осаждали, промывали в среде opti-MEM® I с GlutaMax/10% FCS для удаления остатков полиэтиленгликоля и, наконец, высевали при концентрации $0,1 \times 10^6$ клеток/200 мкл на лунку в среде для селекции с аминоптеринем, т.е. opti-MEM® I с GlutaMax/10% FCS, которая была дополнена 50x Hybri-Max™ аминоптеринем (ингибитором синтеза ДНК *de novo*; Sigma). Начиная с 7-го дня среду для селекции с аминоптеринем восполняли каждые 2-3 дня, а на 13-14 день среду для селекции с аминоптеринем заменяли на opti-MEM I с GlutaMax/10% FCS.

(с). Скрининг на наличие мышинных моноклональных антител против HVEM человека

Начиная с 13-го дня после слияния, супернатанты от растущих гибридом подвергали скринингу на наличие мышинных антител против HVEM человека (т. е. «высокоаффинных» IgG в отличие от «низкоаффинных» IgM) с использованием ELISA с растворимым рекомбинантным меченым полигистидином по С-концу HVEM человека (rhuHVEM; Sino Biological) в качестве целевого белка. С этой целью rhuHVEM покрывали 1 мкг/мл в PBS (50 нг/50 мкл/лунку) с использованием 96-луночных планшетов для ИФА с плоским дном половинной площади (Corning) в течение 16–24 часов при 4–8°C. После интенсивного промывания PBS/0,05%, масс./об., Tween 20, планшеты блокировали с помощью PBS/0,05%, Tween 20/1%, масс./об., бычьего сывороточного альбумина (BSA; Roche) в течение 1 часа при комнатной температуре. Кроме того, планшеты инкубировали с 50 мкл неразбавленного супернатанта гибридомы на лунку в течение 1 часа при комнатной температуре. После обширной

промывки в PBS/0,05% Tween 20 определяли связывание антител с разведенными 1:5000 конъюгированными с пероксидазой хрена Fcγ-специфичными козьими антителами против IgG мыши (Jackson ImmunoResearch) в течение 1 часа при комнатной температуре, после чего использовали раствор субстрата TMB (Invitrogen) для колориметрического обнаружения. После добавления 1 М H₂SO₄ связывание антител измеряли при длине волны 450 нм (референсная длина волны 655 нм) с использованием устройства для считывания микропланшетов (модель iMark; BioRad).

Начиная с 13-го дня после слияния супернатанты от растущих гибридом также подвергали скринингу и подтверждали продукцию мышиных антител против HVEM человека (т. е. «высокоаффинных» IgG в отличие от «низкоаффинных» IgM) с использованием ELISA на основе клеток с мембраносвязанным HVEM человека в качестве целевого белка. С этой целью стабильные трансфицированные полноразмерным HVEM человека клетки HEK293F (клон № 128; см. выше пример 1a) покрывали 2×10⁶ жизнеспособных клеток/мл в PBS (0,1×10⁶ жизнеспособных клеток/50 мкл/лунку) с использованием 96-луночных планшетов для ИФА с плоским дном половинной площади (Corning) в течение 16-24 часов при 4-8°C. Нетрансфицированные (т.е. отрицательные в отношении экспрессии мембраносвязанного HVEM человека) покрытые клетки HEK293F дикого типа (WT) анализировали параллельно в качестве отрицательного контроля. После интенсивного промывания PBS/0,05%, масс./об., Tween 20, планшеты блокировали с помощью PBS/0,05%, Tween 20/1%, масс./об., BSA (Roche) в течение 1 часа при комнатной температуре. Кроме того, планшеты инкубировали с 50 мкл неразбавленного супернатанта гибридомы на лунку в течение 1 часа при комнатной температуре. После обширной промывки в PBS/0,05% Tween 20 определяли связывание антител с разведенными 1:5000 конъюгированными с пероксидазой хрена Fcγ-специфичными козьими антителами против IgG мыши (Jackson ImmunoResearch) в течение 1 часа при комнатной температуре, после чего использовали раствор субстрата TMB (Invitrogen) для колориметрического обнаружения. После добавления 1 М H₂SO₄ связывание антител измеряли при длине волны 450 нм (референсная длина волны 655 нм) с использованием устройства для считывания микропланшетов (модель iMark; BioRad).

Начиная с 13-го дня после слияния супернатанты от растущих гибридом также подвергали скринингу и подтверждали продукцию мышиных антител против HVEM человека (т. е. «высокоаффинных» IgG в отличие от «низкоаффинных» IgM) с использованием FACS с мембраносвязанным HVEM человека в качестве целевого белка. С этой целью стабильные трансфицированные полноразмерным HVEM человека клетки HEK293F (клон № 128; см. выше пример 1a) помещали в концентрации 10×10⁶ клеток/мл в охлажденный льдом фосфатно-солевой буфер, содержащий 0,1% BSA (Sigma)/ 0,05% NaN₃ (PBS/BSA/NaN₃) с добавлением 50 мкг/мл IgG человека (блокирует возможные рецепторы Fcγ; Sigma) в течение 10 минут при 4°C. Затем 10 мкл/пробирку (т.е. 0,1×10⁶ клеток) этих клеток инкубировали со 100 мкл неразбавленного супернатанта гибридомы/пробирку в течение 30 минут при 4°C. Нетрансфицированные (т.е. отрицательные в отношении экспрессии мембраносвязанного HVEM человека) клетки

HEK293F WT анализировали параллельно в качестве отрицательного контроля для определения специфичности антитела. После обширной промывки в PBS/BSA/NaN₃ клетки затем инкубировали с разбавленными 1:200 PE-конъюгированными Fcγ-специфичными козьими антителами против IgG мыши (Jackson ImmunoResearch) в течение 30 минут при 4°C. После обширной промывки в PBS/BSA/NaN₃ клетки фиксировали в 2% формальдегиде в PBS/BSA/NaN₃ в течение 30 минут при 4°C. Связывание антител измеряли с использованием проточного цитометра (модель FACSCalibur; BD Biosciences).

Тройные HVEM-положительные гибридомы (т.е. rhuHVEM+ в ELISA, мембранный HVEM+ клетки HEK293F в ELISA и мембранный HVEM+ клетки HEK293F в FACS) размножали и криоконсервировали. Супернатанты от этих тройных HVEM-положительных гибридом не проявляли реактивности в отношении нетрансфицированных (т.е. отрицательных в отношении экспрессии мембраносвязанного HVEM человека) клетками дикого типа HEK293F. С использованием этого подхода было получено 18 гибридом, продуцирующих специфические антитела против HVEM человека. Мышинные антитела очищали из этих супернатантов гибридом, продуцирующих антитела, специфичные к HVEM человека, с использованием колонок с белком G (GE Healthcare). Тяжелые и легкие цепи типировали по классу изотипа с использованием набора IsoStrip™ Mouse Monoclonal Antibody Isotyping kit (Roche). Кроме того, супернатанты и/или очищенные антитела из этих гибридом, продуцирующих специфические антитела против HVEM человека, тестировали на их влияние на связывание лиганда HVEM человека (т.е. BTLA и LIGHT человека) с мембраносвязанным HVEM человека, на их связывание с мембраносвязанным HVEM человека с делецией богатого цистеином домена 1 (CRD1) и их перекрестную реактивность с мембраносвязанным HVEM яванского макака, как описано в примере 2. Кроме того, отбор этих очищенных антител из гибридом, продуцирующих специфические антитела против HVEM человека, тестировали на их влияние на передачу сигналов NFκB в клетках, экспрессирующих мембранный HVEM человека, на индуцированную растворимым LIGHT передачу сигналов NFκB человека в клетках, экспрессирующих мембранный HVEM человека, и на опосредованное мембранным BTLA человека/HVEM человека ингибирование TCR-индуцированной передачи сигналов NFAT в клетках, экспрессирующих мембранный BTLA человека/TCR человека, как описано в примере 3.

Пример 2. Характеризация с помощью проточной цитометрии мышиных моноклональных антител против HVEM человека

(а). Связывание мышиных антител против HVEM человека с мембраносвязанным полноразмерным HVEM человека и с мембраносвязанным HVEM человека с делецией по CRD1

Чтобы проанализировать тонкую специфичность мышиных антител против HVEM человека, местоположение эпитопа(ов), распознаваемого сконструированными

мышинными антителами против HVEM человека, определяли путем картирования доменов. Способность мышинных антител против HVEM человека связываться с HVEM человека с усеченной CRD1, экспрессированным на поверхности (полученным из HEK) клеток 293F, определяли с помощью FACS-анализа.

5 На основании литературы (Swiss-Prot no. Q92956.3; Montgomery et al. Cell 1996; 87:427-436; Hsu et al. J Biochem Chem 1997; 272: 13471-13474; Naismith et al. Trends Biochem Sci 1998; 23: 74-79; Carfi et al. Molecul Cell 2001; 8: 169-179; Bodmer et al. Trends Biochem Sci 2002; 27: 19-26; Compaan et al. J Biochem Chem 2005; 280: 39553-39561) были идентифицированы богатые цистеином домены (CRD) во внеклеточной области HVEM
10 человека, которые кодируются CRD1, CRD2, CRD3 и (усеченной) CRD4. CRD содержат топологически разные типы модулей, называемые А-модулем и В-модулем. А-модули представляют собой С-образные структуры, а В-модули — S-образные структуры. Типичный CRD обычно состоит из модулей А1-В2 или модулей А2-В1 (или, реже, другой пары модулей, таких как А1-В1) с 6 консервативными цистеиновыми остатками, где
15 цифра обозначает количество дисульфидных мостиков внутри каждого модуля. HVEM-CRD1 человека содержит модули А1-В2 (42-75, см. SEQ ID NO. 1), HVEM-CRD2 человека содержит модули А1-В2 (78-119, см. SEQ ID NO. 1), HVEM-CRD3 человека содержит модуль А2 и неканонический (напоминающий модуль В1) модуль В0 (121-162, см. SEQ ID NO. 1), а усеченный HVEM-CRD4 человека содержит только модуль А1 (165-179, см.
20 SEQ ID No. 1). Были созданы и экспрессированы две разные конструкции HVEM человека: (1) полноразмерная конструкция HVEM человека, которая начинается с N-концевого CRD1 (т.е. модули А1-В2 CRD1 охватывают аминокислоты 42-75, см. SEQ ID NO. 1), и поэтому обозначена как «полноразмерная», и включает аминокислоты 1-283 (см. SEQ ID NO. 1) и (2) «усеченная» конструкция CRD1, которая начинается с N-концевого CRD2 (т.е. модули А1-В2 CRD2 охватывают аминокислоты 22-63, см. SEQ ID
25 NO. 3), и включает аминокислоты 20-227, связанные с аминокислотами 1-19 сигнального пептида Ig мыши (см. SEQ ID NO. 3). кДНК, кодирующая усеченный по CRD1 белок HVEM человека (Swiss-Prot № Q92956.3), была оптимизирована для экспрессии у млекопитающих и синтезирована GENEART, Регенсбург, Германия (см. SEQ ID № 4).
30 Эту кДНК субклонировали в экспрессионной плазмиде, полученной из pcDNA3.1.

Получение трансфицированных полноразмерным HVEM человека клеток HEK293F (клон № 128) описано в примере 1а. Используя экспрессионную систему FreeStyle™ 293 (Invitrogen), клетки FreeStyle™ 293F (Invitrogen) временно трансфицировали вариантами HVEM человека, усеченными по CRD1. Через 72 часа
35 поверхностную экспрессию HVEM человека на трансфицированных клетках анализировали с помощью FACS-анализа. С этой целью стабильные трансфицированные полноразмерным HVEM человека клетки HEK293F и временные трансфицированные HVEM человека, усеченным по CRD1, клетки HEK293F помещали в концентрации 10×10^6 клеток/мл в охлажденный льдом фосфатно-солевой буфер,
40 содержащий 0,1% BSA (Sigma)/0,05% NaN_3 (PBS/BSA/ NaN_3) с добавлением 50 мкг/мл IgG человека (блокирует возможные рецепторы Fcγ; Sigma) в течение 10 минут при 4°C. Затем 10 мкл/пробирку (т.е. $0,1 \times 10^6$ клеток) этих клеток инкубировали со 100 мкл неразбавленного супернатанта гибридомы/пробирку в течение 30 минут при 4°C. Конъюгированное с фикоэритрином (PE) мышинное антитело против HVEM человека

(клон eBioHVEM-122; eBioscience) в соотношении 1:20 использовали в качестве положительного контрольного антитела. После обширной промывки в PBS/BSA/NaN₃ клетки затем инкубировали с разбавленными 1:200 PE-конъюгированными Fcγ-специфичными козьими антителами против IgG мыши (Jackson ImmunoResearch) в течение 30 минут при 4°C. После обширной промывки в PBS/BSA/NaN₃ клетки фиксировали в 2% формальдегиде в PBS/BSA/NaN₃ в течение 30 минут при 4°C. Связывание антител измеряли с использованием проточного цитометра (модель FACSCalibur; BD Biosciences).

Как показано на фигуре 1, все 18 исследованных мышинных антител против HVEM человека распознавали полноразмерный HVEM человека на трансфицированных клетках HEK293F, тогда как большинство (15/18) этих мышинных антител против HVEM человека не демонстрировали связывания с HVEM человека, усеченным по CRD1, на трансфицированных клетках HEK293F. Напротив, мышинные антитела против HVEM человека № 38G10, 39B9 и 47E10 распознавали HVEM человека, усеченный по CRD1, на трансфицированных клетках HEK293F.

Эти результаты показали, что мышинные антитела против HVEM человека № 38G10, 39B9 и 47E10, по-видимому, распознают линейные и/или нелинейные/конформационные эпитопы в CRD2, CRD3, CRD4 и/или «линкерный» фрагмент (последовательность а.к. 124- 146, см. SEQ ID No. 3) внеклеточного домена HVEM человека, тогда как все другие сконструированные мышинные антитела против HVEM человека (15/18), по-видимому, распознавали линейные и/или нелинейные/конформационные эпитопы в CRD1 внеклеточного домена HVEM человека.

(b). Связывание мышинных антител против HVEM человека с мембраносвязанным HVEM яванского макака

Чтобы проанализировать многовидовую перекрестную реактивность мышинных антител против HVEM человека, способность мышинных антител против HVEM человека связываться с HVEM яванского макака, экспрессируемого на поверхности (полученных из HEK) клеток 293F, определяли с помощью FACS-анализа.

кДНК, кодирующая белок HVEM яванского макака (см. SEQ ID NO. 5; эталонная последовательность NCBI XP_005545061.1), была оптимизирована для экспрессии у млекопитающих и синтезирована компанией GENEART, Регенсбург, Германия (см. SEQ ID NO. 6). Эту кДНК субклонировали в экспрессионной плазмиде, полученной из pcDNA3.1.

Получение трансфицированных полноразмерным HVEM человека клеток HEK293F (клон № 128) описано в примере 1a. Используя экспрессионную систему FreeStyle™ 293 (Invitrogen), клетки FreeStyle™ 293F (Invitrogen) временно трансфицировали (полноразмерным) HVEM яванского макака. Через 72 часа поверхностную экспрессию HVEM яванского макака на трансфицированных клетках анализировали с помощью FACS-анализа. С этой целью стабильные

трансфицированные полноразмерным HVEM человека клетки HEK293F и временные трансфицированные полноразмерным HVEM яванского макака клетки HEK293F помещали в концентрации 10×10^6 клеток/мл в охлажденный льдом фосфатно-солевой буфер, содержащий 0,1% BSA (Sigma)/0,05% NaN₃ (PBS/BSA/NaN₃) с добавлением 50 мкг/мл IgG человека (блокирует возможные рецепторы Fcγ; Sigma) в течение 10 минут при 4°C. Затем 10 мкл/пробирку (т.е. $0,1 \times 10^6$ клеток) этих клеток инкубировали с 100 мкл неразбавленного супернатанта гибридомы/пробирку в течение 30 минут при 4°C. Конъюгированное с фикоэритрином (PE) мышинное антитело против HVEM человека (клон eBioHVEM-122; eBioscience) в соотношении 1:20 использовали в качестве положительного контрольного антитела. После обширной промывки в PBS/BSA/NaN₃ клетки затем инкубировали с разбавленными 1:200 PE-конъюгированными Fcγ-специфичными козыми антителами против IgG мыши (Jackson ImmunoResearch) в течение 30 минут при 4°C. После обширной промывки в PBS/BSA/NaN₃ клетки фиксировали в 2% формальдегиде в PBS/BSA/NaN₃ в течение 30 минут при 4°C. Связывание антител измеряли с использованием проточного цитометра (модель FACSCalibur; BD Biosciences).

Как показано на фигуре 1, все 18 исследованных мышинных антител против HVEM человека распознавали полноразмерный HVEM человека на трансфицированных клетках HEK293F, и большинство (14/18) этих мышинных антител против HVEM человека проявляли перекрестную реактивность, в различной степени, против полноразмерного HVEM яванского макака на трансфицированных клетках HEK293F. Напротив, мышинные антитела против HVEM человека № 36H12, 37D11, 41F11 и 49A11 не распознавали полноразмерный HVEM яванского макака на трансфицированных клетках HEK293F.

Эти результаты продемонстрировали, что большинство (14/18) сконструированных мышинных антител против HVEM человека, по-видимому, распознавали линейные и/или нелинейные/конформационные эпитопы в CRD1, CRD2, CRD3, CRD4 и/или «линкерный» фрагмент (последовательность а.к. 180-203, см. SEQ ID No. 5) внеклеточного домена полноразмерного HVEM яванского макака.

Прогнозируемая аминокислотная последовательность полноразмерного белка HVEM яванского макака (Met1 — Ser280; эталонная последовательность NCBI: XP_005545061.1) демонстрирует 82% гомологию с аминокислотной последовательностью белка HVEM человека (Met1 — His283; Swiss-Prot № Q92956.3), а прогнозируемая аминокислотная последовательность внеклеточной области HVEM яванского макака (т. е. Leu39 – Val203; эталонная последовательность NCBI: XP_005545061.1) демонстрирует 87% гомологию с аминокислотной последовательностью внеклеточной области белка HVEM человека (т. е. Leu39 – Val202; Swiss-Prot № Q92956.3). Эти результаты показали, что большинство (14/18) сконструированных мышинных моноклональных антител против HVEM человека перекрестно реагировало с гомологичным HVEM яванского макака на трансфицированных клетках HEK293F.

(с). Влияние мышиных антител против HVEM человека на связывание BTLA человека и LIGHT человека с мембраносвязанным HVEM человека

Внеклеточный HVEM имеет две пространственно связывающие лиганд области (Cai et al. Immunol Rev 2009; 229: 244-258; Steinberg et al. Immunol Rev 2011; 244: 169-187; Pasero et al. Curr Opin Pharmacol 2012; 12: 478-485), одна область для канонических лигандов, которые принадлежат к суперсемейству TNF (т. е. LIGHT и TNF β), и другая область для неканонических лигандов, которые принадлежат к суперсемейству Ig (т. е. BTLA и CD160). Мутационный анализ и молекулярное моделирование показали, что BTLA и CD160 взаимодействуют с CRD1, тогда как связывание LIGHT и TNF β находится в CRD2 и CRD3 на противоположной стороне HVEM.

Чтобы проанализировать влияние мышиных антител против HVEM человека на связывание человеческого BTLA и человеческого LIGHT с мембраносвязанным HVEM человека, способность мышиных антител против HVEM человека стерически предотвращать взаимодействие человеческого BTLA и человеческого LIGHT с полноразмерным HVEM человека, экспрессированным на поверхности (полученных из HEK) клеток 293F, определяли с помощью анализа FACS.

Получение трансфицированных полноразмерным HVEM человека клеток HEK293F (клон № 128) описано в примере 1а. Связывание растворимого человеческого BTLA, растворимого человеческого CD160 и растворимого человеческого LIGHT на поверхности клеток, трансфицированных HVEM человека, анализировали с помощью FACS-анализа. С этой целью стабильные трансфицированные полноразмерным HVEM человека клетки HEK293F помещали в концентрации 10×10^6 клеток/мл в охлажденный льдом фосфатно-солевой буфер, содержащий 0,1% BSA (Sigma)/0,05% NaN₃ (PBS/BSA/NaN₃) с добавлением 50 мкг/мл IgG человека (блокирует возможные рецепторы Fc γ ; Sigma) в течение 10 минут при 4°C. Затем 10 мкл/пробирку (т. е. $0,1 \times 10^6$ клеток) этих клеток инкубировали с 100 мкл очищенного мышиного антитела против HVEM, очищенного от белка G, или без него в концентрации 10 мкг/мл/пробирку, или с отрицательным контролем мышиного IgG1 (BD Biosciences) при 10 мкг/мл/пробирку в течение 30 минут при 4°C. После этого (т. е. без промывки) клетки затем инкубировали с 1 мкг/мл растворимого слитого белка BTLA человека и Fc γ человека (Sino Biological Inc) или с 0,1 мкг/мл растворимого человеческого LIGHT с гистиридиновой меткой (R&D Systems) в PBS/BSA/NaN₃ в течение 30 минут при 4°C. После обширной промывки в PBS/BSA/NaN₃ клетки инкубировали с биотинилированными мышиными Fc γ -специфичными антителами против IgG человека (обнаружение BTLA; Southern Biotech) в концентрации 10 мкг/мл или с биотинилированными мышиными антителами против his (обнаружение LIGHT; R&D Systems) в концентрации 5 мкг/мл в течение 30 минут при 4°C. После обширной промывки в PBS/BSA/NaN₃ клетки инкубировали с разбавленным 1:200 PE-конъюгированным стрептавидином (Jackson ImmunoResearch) в течение 30 минут при 4°C. После обширной промывки в PBS/BSA/NaN₃ клетки фиксировали в 2% формальдегиде в PBS/BSA/NaN₃ в течение 30 минут при 4°C.

Связывание лигандов BTLA и LIGHT на мембранном HVEM человека измеряли с помощью проточного цитометра (модель FACSCalibur; BD Biosciences).

5 Как показано на фигуре 2 и в таблице 1, были обнаружены четыре типа
 мышиных антител против HVEM человека: (антитела типа 1; 6/18) неблокирующие
 взаимодействия BTLA/HVEM и LIGHT/HVEM, (антитела типа 2; 3/18) блокирующие
 взаимодействия BTLA/HVEM и неблокирующие взаимодействия LIGHT/HVEM,
 (антитела типа 3; 4/18) неблокирующие взаимодействия BTLA/HVEM и блокирующие
 взаимодействия LIGHT/HVEM и (антитело 4 типа; 5/18) блокирующее взаимодействие
 10 BTLA/HVEM и LIGHT/HVEM.

Таблица 1. Сводные данные блокирующих эффектов мышиных антител против HVEM
 человека в отношении растворимого лиганда BTLA человека (sBTLA), растворимого
 CD160 человека (sCD160) и растворимого лиганда LIGHT человека (sLIGHT),
 15 связывающихся с мембранным рецептором HVEM человека (mHVEM).

	Блокирование взаимодействия лиганд-mHVEM			
Антитело против HVEM	sBTLA	sCD160	sLIGHT	связывание с HVEM с усечением по CRD1
8H5	+++	++	+	-
29C2	-	_*	++	-
36H12	+++	+++	+++	-
37D11	-	-	-	-
38B12	-	-	+	-
38G10	-	-	-	-/+
39B9	-	-	-	+
41D7	-	-	-	-
43E10	-	-	-	-
45C6	_*	-	+	-
45H6	+++	+++	+++	-
47E10	-	-	-	-/+
48H6	+++	+++	++	-

11H7	+++	+++	-	-
41F11	++	++	-/+	-
49A11	++	++	-	-
49G4	+++	+++	+++	-
52D3	_*	_*	++	-

- = отсутствие блокирования (-* = усиленное связывание лиганда с HVEM человека) взаимодействия лиганд-рецептор, + = слабое блокирование взаимодействия лиганд-рецептор, ++ = промежуточное блокирование взаимодействия лиганд-рецептор, +++ = сильное блокирование взаимодействия лиганд-рецептор; последний столбец - связывание с HVEM человека с усечением по CRD1. Все антитела связываются с полноразмерным HVEM человека.

Эти результаты продемонстрировали, что была создана панель мышиных антител против HVEM человека, блокирующих и не блокирующих лиганд человека, с множественными характеристиками (т. е. мышиных антител 1-4 типа против HVEM человека (см. выше)). Следует отметить, что антитела, которые связывают CRD1, подобные (36H12, 45H6), могут или не могут (52D3) блокировать связывание sBTLA или sCD160. CRD1-антитело 52D3, по-видимому, действительно усиливает связывание лиганда(ов). Кроме того, оно ясно показывает различную функциональную активность антител, нацеленных на CRD1.

Пример 3. Биологическая характеристика мышиных моноклональных антител против HVEM человека

(а). Влияние мышиных антител против HVEM человека на передачу сигналов NFκB в клетках, экспрессирующих мембранный HVEM человека.

Передача сигналов HVEM может индуцировать активацию NFκB во множестве экспрессирующих HVEM клеток иммунной системы, таких как Т- и В-лимфоциты и дендритные клетки, что включает несколько генов, важных для их клеточной функции. Лигирование HVEM на Т-лимфоцитах с помощью LIGHT обеспечивает положительные костимулирующие сигналы, которые приводят к выживанию, пролиферации и дифференцировке и секреции IFNγ из Т-лимфоцитов (Del Rio et al. Journal Leukocyte Biology 2010; 87: 223-235). Лигирование HVEM на В-лимфоцитах с помощью LIGHT костимулирует CD40L-опосредованную пролиферацию и секрецию антител, тем самым усиливая гуморальные реакции (Del Rio et al. Journal Leukocyte Biology 2010; 87: 223-235). Лигирование HVEM на незрелых дендритных клетках с помощью LIGHT костимулирует CD40L-опосредованное созревание, секрецию цитокинов (IL-12, IL-6 и TNF-α) и праймирование специфических противоопухолевых CTL и их продукцию IFN-γ (Del Rio et al. Journal Leukocyte Biology 2010; 87: 223-235).

Чтобы проанализировать влияние мышиных антител против HVEM человека на передачу сигналов NFκB, опосредованную мембраносвязанным HVEM человека, использовали репортерные клетки с NFκB-элементом ответа-люциферазы (RE-luc) (HEK293; Promega) для биологического анализа HVEM человека, для изучения способности мышиных антител против HVEM человека активировать опосредованную HVEM передачу сигналов NFκB.

Вкратце, клетки NFκB-RE-luc, экспрессирующие HVEM человека, высевали в количестве 35 000 клеток/лунку в 96-луночные планшеты с плоским дном, обработанные ТС, с белым твердым покрытием (Corning), и инкубировали в течение ночи при 37°C/5% CO₂. На следующий день эти клетки промывали и затем инкубировали с 0,0015-10 мкг/мл (стадии 3-кратного разведения) мышиных антител против HVEM человека или без них. Титрованный (т.е. 0,0015-10 мкг/мл (стадии 3-кратного разведения)) растворимый человеческий LIGHT с гистидиновой меткой (R&D Systems) анализировали параллельно для использования в качестве эталона. После 6 часов инкубации при 37°C/5% CO₂ продукцию люциферазы в клетках HVEM человека, экспрессирующих NFκB-NFκB-RE-luc, измеряли с использованием системы анализа люциферазы Bio-Glo™ (Promega) в люминометре.

Как показано на фигуре 3А и в таблице 2, несколько исследованных (7/12) мышиных антител против HVEM человека индуцировали дозозависимую активацию NFκB в клетках NFκB-RE-luc, экспрессирующих HVEM человека (т.е. по сравнению с индукцией NFκB, опосредованной растворимым LIGHT) в различной степени (порядок ранжирования; № 48H6 > 36H12 > 29C2 > 8H5 = 45H6 = 49G4 > 52D3), которые демонстрировали свою агонистическую активность. Контрольный растворимый человеческий LIGHT также показал дозозависимую активацию NFκB в этих клетках NFκB-RE-luc, экспрессирующих HVEM человека. Напротив, мышиные антитела против HVEM человека № 11H7, 41F11, 43E10, 47E10 и 49A11 не проявляли агонистической активности в клетках NFκB-RE-luc, экспрессирующих HVEM человека (т.е. по сравнению с индукцией NFκB, опосредованной растворимым LIGHT). Интересно, что, по-видимому, существует взаимосвязь (см. Таблицу 2) между способностью этих исследованных мышиных антител против HVEM человека стерически блокировать взаимодействие растворимого LIGHT человека/HVEM человека (см. пример 2с) и их агонистической активностью (т.е., индукция NFκB) на мембране клеток, экспрессирующих HVEM человека.

Таблица 2. Взаимосвязь действия блокирования мышиных антител против HVEM человека на связывание лиганда растворимого LIGHT (sLIGHT) человека с мембранным рецептором HVEM человека (mHVEM; см. пример 2с) и их агонистической активности (т.е. по сравнению с индукцией NFκB, опосредованной sLIGHT) на мембране клеток, экспрессирующих HVEM человека.

	Антитело против HVEM	Индукция NFκB	Блокирование взаимодействия sLIGHT/mHVEM
5	8H5	+	+
	29C2	+/++	++
	36H12	++/+++	+++
	43E10	-	-
10	45H6	+	+++
	47E10	-	-
	48H6	+++	++
	11H7	-	-
	41F11	-	-/+
15	49A11	-	-
	49G4	+	+++
	52D3	-/+	++

- = отсутствие блокирования взаимодействия LIGHT/HVEM или агонистической активности, + = слабое блокирование взаимодействия LIGHT/HVEM или агонистической активности, ++ = промежуточное блокирование взаимодействия LIGHT/HVEM или агонистической активности, +++ = сильное блокирование LIGHT/HVEM взаимодействия или агонистической активности.

Эти результаты продемонстрировали, что мышинные антитела против HVEM человека, которые блокировали взаимодействие LIGHT человека/HVEM человека (см. пример 2с), были способны имитировать передачу сигналов NFκB, опосредованную растворимым LIGHT человека/HVEM человека. Примечательно, что растворимый LIGHT человека, как было показано, гораздо менее эффективен, чем клетки, экспрессирующие мембраносвязанный LIGHT, в отношении активации HVEM человека, экспрессируемого на клетках (Cheung et al. PNAS 2009; 106: 6244-6249).

(b). Влияние мышинных антител против HVEM человека на передачу сигналов NFκB в клетках, экспрессирующих мембранный HVEM человека, индуцированную растворимым LIGHT человека

Для того чтобы проанализировать влияние мышинных антител против HVEM человека на передачу сигналов NFκB, индуцированную растворимым LIGHT человека, в клетках, экспрессирующих мембранный HVEM человека, использовали NFκB-RE-luc репортерные клетки для биоанализа HVEM человека (HEK293; Promega) для изучения способности мышинных антител против HVEM человека препятствовать (например, путем блокирования, аддитивно или синергетически) передаче сигналов NFκB, опосредованной растворимым LIGHT/мембранным HVEM.

Вкратце, клетки NFκB-RE-luc, экспрессирующие HVEM человека, высевали в количестве 35 000 клеток/лунку в 96-луночные планшеты с плоским дном, обработанные ТС, с белым твердым покрытием (Corning), и инкубировали в течение ночи при 37°C/5% CO₂. На следующий день эти клетки промывали и затем инкубировали с 0,0015-10 мкг/мл (стадии 3-кратного разведения) мышинных антител против HVEM человека или без них в комбинации с растворимым человеческим LIGHT с гистиридиновой меткой (R&D Systems) в концентрации 0,3 мкг/мл (≈ EC80; см. пример 2а и фигуру 3А). После 6 часов инкубации при 37°C/5% CO₂ продукцию люциферазы в клетках HVEM человека, экспрессирующих NFκB-NFκB-RE-luc, измеряли с использованием системы анализа люциферазы Bio-Glo™ (Promega) в люминометре.

Как показано на фигуре 3В и в таблице 3, очень слабый агонист, но блокатор промежуточного взаимодействия LIGHT/HVEM (см. таблицу 2) - мышинное антитело против HVEM человека № 52D3 - было способно слабо, но дозозависимо ингибировать активацию NFκB, опосредованную растворимым LIGHT человека, в клетках NFκB-RE-luc, экспрессирующих HVEM человека. Неожиданно оказалось, что не являющееся агонистом и не блокирующее взаимодействие LIGHT/HVEM (см. Таблицу 2) мышинное антитело против HVEM человека № 49A11 также было способно слабо, но дозозависимо ингибировать активацию NFκB, опосредованную растворимым LIGHT человека, в клетках NFκB-RE-luc, экспрессирующих HVEM человека. Кроме того, не являющиеся агонистами и не блокирующие взаимодействие LIGHT/HVEM (см. Таблицу 2) мышинные антитела против HVEM человека № 1H7, 41F11, 43E10 и 47E10 не продемонстрировали никакого влияния на активацию NFκB, опосредованную растворимым LIGHT человека, в клетках NFκB-RE-luc, экспрессирующих HVEM человека, тогда как слабые/промежуточные/сильные агонисты и слабые/промежуточные/сильные блокаторы взаимодействия LIGHT/HVEM (см. Таблицу 2) мышинные антитела против HVEM человека № 8H5, 29C2, 36H12, 45H6, 48H6 и 49G4 продемонстрировали возможное аддитивное, но не синергетическое действие на активацию NFκB, опосредованную растворимым LIGHT человека, в клетках NFκB-RE-luc, экспрессирующих HVEM человека.

Таблица 3. Сводные данные влияния мышинного антитела против HVEM человека на связывание растворимого лиганда LIGHT человека (sLIGHT) с мембранным рецептором HVEM человека (mHVEM; см. пример 2с) и их влияние на индуцированную растворимым LIGHT человека агонистическую активность (т. е. NFκB индукция) на мембране клеток, экспрессирующих HVEM человека.

5	Антитело против HVEM	Блокирование sLIGHT Индукция NFκB	Блокирование взаимодействия sLIGHT/mHVEM
	8H5	.*	+
	29C2	.*	++
	36H12	.*	+++
10	43E10	-	-
	45H6	.*	+++
	47E10	-	-
	48H6	.*	++
15	11H7	-	-
	41F11	-	-/+
	49A11	+	-
	49G4	.*	+++
	52D3	+	++

20 - = отсутствие блокирования взаимодействия LIGHT/HVEM или LIGHT-индуцированной агонистической активности, + = слабое блокирование взаимодействия LIGHT/HVEM или LIGHT-индуцированной агонистической активности, ++ = промежуточное блокирование взаимодействия LIGHT/HVEM или LIGHT-индуцированной агонистической активности, +++ = сильное блокирование взаимодействия LIGHT/HVEM или LIGHT-индуцированной агонистической активности. * = Агонистический эффект или LIGHT, и/или мышиного антитела против HVEM человека.

30 Эти результаты продемонстрировали, что мышиные антитела против HVEM человека, которые блокируют взаимодействие LIGHT/HVEM человека (за исключением не блокирующего взаимодействие LIGHT/HVEM мышиного антитела против HVEM человека № 49A11; см. также пример 2с), были способны или блокировать или имитировать передачу сигналов NFκB, опосредованную растворимым LIGHT человека/HVEM человека.

35 (с). Влияние мышиных антител против HVEM человека на ингибирование TCR-индуцированной передачи сигналов NFAT, опосредованное мембранным BTLA человека/мембранным HVEM человека в Т-клетках, экспрессирующих мембранный BTLA человека/мембранный TCR человека.

40 Как описано выше, лигирование HVEM на Т-лимфоцитах с помощью LIGHT обеспечивает положительные костимулирующие сигналы через HVEM, тогда как взаимодействие BTLA с Т-лимфоцитами с помощью HVEM обеспечивает отрицательные коингибирующие сигналы для Т-лимфоцитов через BTLA (Del Rio et al. Journal Leukocyte Biology 2010; 87: 223-235). Этот путь BTLA/HVEM подавляет TCR-

опосредованную передачу сигналов как в CD4, так и в CD8 Т-лимфоцитах и приводит к снижению пролиферации Т-лимфоцитов и продукции цитокинов. Взаимодействие BTLA с В-лимфоцитами с помощью HVEM снижает активацию сигнальных молекул ниже BCR и ослабляет пролиферацию В-клеток (Vendel et al. *Journal Immunology* 2009; 182:1509-1517). В отличие от PD-1 и CTLA4, BTLA не экспрессируется на регуляторных Т (Treg) лимфоцитах (Del Rio et al. *Journal Leukocyte Biology* 2010; 87: 223-235).

Чтобы проанализировать влияние мышиных антител против HVEM человека на ингибирование индуцированной мембранным TCR человека передачи сигналов NFAT, опосредованное мембранным BTLA человека/мембранным HVEM человека, биоанализ блокирования NFAT-элемента ответа-люциферазы (RE-luc) человека BTLA/HVEM (содержащий комбинацию (1) активаторных клеток CHO-K1, экспрессирующих мембранный HVEM человека и запатентованный активатор мембранного TCR человека, (искусственных антиген-презентирующих клеток), и (2) NFAT-RE-luc эффекторных Т-клеток Jurkat, экспрессирующих мембранный BTLA человека и мембранный TCR человека; Promega), использовали для изучения способности мышиных антител против HVEM человека блокировать BTLA/HVEM-опосредованное ингибирование TCR-индуцированной передачи сигналов NFAT.

В этом биологическом анализе блокирования BTLA/HVEM в качестве эффекторных клеток использовали NFAT-RE-luc эффекторные Т-клетки Jurkat, экспрессирующие мембранный BTLA человека и мембранный TCR человека, а также CHO-K1 активаторные клетки, экспрессирующие мембранный HVEM человека и запатентованный активатор мембранного TCR человека, в качестве искусственных антиген-презентирующих клеток. При совместном культивировании этих двух клеток комплексы TCR на эффекторных клетках активируются искусственными антиген-презентирующими клетками, экспрессирующими активатор TCR, что приводит к экспрессии репортера люциферазы NFAT. Однако лигирование BTLA и HVEM предотвращает активацию TCR и подавляет активность люциферазы, чувствительной к NFAT. Это ингибирование может быть специфически обращено вспять воздействием блокирующих антител против HVEM. Нейтрализующие антитела против HVEM блокируют взаимодействие BTLA/HVEM и способствуют активации Т-клеток (т. е. «отпусканью тормоза»), что приводит к реактивации репортера люциферазы, чувствительной к NFAT (см. фигуру 4А).

Вкратце, CHO-K1 активаторные клетки, экспрессирующие HVEM человека и запатентованный активатор TCR человека, высевали в количестве 40 000 клеток/лунку в 96-луночные планшеты с плоским дном, обработанные ТС, с белым твердым покрытием (Corning), и инкубировали в течение ночи при 37°C/5% CO₂. На следующий день эти клетки промывали и затем инкубировали с 0,0015-10 мкг/мл (стадии 3-кратного разведения) мышиных антител против HVEM человека или без них. Затем добавляли NFAT-RE-luc эффекторные Т-клетки Jurkat, экспрессирующие BTLA человека и TCR человека, в количестве 50000 клеток/лунку. После 6 часов инкубации при 37°C/5% CO₂ продукцию люциферазы в NFAT-RE-luc эффекторные Т-клетки Jurkat,

экспрессирующих BTLA человека и TCR человека, измеряли с использованием системы анализа люциферазы Bio-Glo™ (Promega) в люминометре.

Как показано на фигуре 4В и в таблице 4, несколько исследованных (8/12) мышиных антител против HVEM человека дозозависимо блокировали BTLA/HVEM-опосредованное ингибирование TCR-индуцированной передачи сигналов NFAT в NFAT-RE-luc эффекторных Т-клетках Jurkat, экспрессирующих BTLA человека и TCR человека, в различной степени (порядок ранжирования; № 45H6 > 49G4 > 36H12 > 11H7 > 8H5 = 41F11 = 48H6 = 49A11). В противоположность этому, мышиные антитела против HVEM человека № 29C2, 43E10, 47E10 и 52D3 не проявляли влияния на BTLA/HVEM-опосредованное ингибирование TCR-индуцированной передачи сигналов NFAT в NFAT-RE-luc эффекторных Т-клетках Jurkat, экспрессирующих BTLA человека и TCR человека. Интересно, что, по-видимому, существует взаимосвязь (см. Таблицу 4) между способностью этих исследованных мышиных антител против HVEM человека стерически блокировать взаимодействие растворимого BTLA человека/HVEM человека (см. пример 2с) и их блокирующей способностью (т.е. аннулирование BTLA/HVEM-опосредованного ингибирования TCR-индуцированной передачи сигналов NFAT) в биологическом анализе блокирования NFAT-RE-luc человека посредством BTLA/HVEM.

Таблица 4. Взаимосвязь действия блокирования мышиных антител против HVEM человека на связывание растворимого лиганда BTLA человека (sBTLA) с мембранным рецептором HVEM человека (mHVEM; см. пример 2с) и их блокирующего действия на ингибирование TCR-индуцированной передачи сигналов NFAT, индуцированное мембранным BTLA человека/мембранным HVEM человека (mBTLA/mHVEM), в эффекторных Т-клетках, экспрессирующих мембранный BTLA/TCR человека.

Антитело против HVEM	Блокирование mBTLA/mHVEM Ингибирование TCR- NFAT	Блокирование взаимодействия sBTLA/mHVEM
8H5	+	+++
29C2	-	-
36H12	++	+++
43E10	-	-
45H6	+++	+++
47E10	-	-
48H6	+	+++
11H7	+/++	+++
41F11	+	++
49A11	+	++
49G4	++/+++	+++
52D3	-	.*

- = отсутствие блокирования взаимодействия BTLA/HVEM или BTLA/HVEM-индуцированного ингибирования TCR-NFAT, + = слабое блокирование взаимодействия BTLA/HVEM или BTLA/HVEM-индуцированного ингибирования TCR-NFAT, ++ = промежуточное блокирование взаимодействия BTLA/HVEM или BTLA/HVEM-индуцированного ингибирования TCR-NFAT, +++ = сильное блокирование взаимодействия BTLA/HVEM или BTLA/HVEM-индуцированного ингибирования TCR-NFAT. * = Усиленное связывание BTLA с HVEM человека.

Эти результаты показали, что мышиные антитела против HVEM человека, которые блокировали взаимодействие BTLA человека/HVEM человека (см. пример 2с), были способны блокировать ингибирование TCR-индуцированной передачи сигналов NFAT, опосредованное BTLA человека/HVEM человека.

Пример 4. Молекулярно-генетическая характеристика BTLA/HVEM, блокирующего мышиные моноклональные антитела против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4

Клетки гибридомы, продуцирующие BTLA/HVEM, блокирующий мышиное антитело против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4, промывали PBS, делили на аликвоты в микропробирки, содержащие 5×10^6 клеток, и хранили в виде осадка при -80°C . Эти осадки клеток использовали для выделения РНК с помощью набора RNeasy Mini Isolation Kit (QIAGEN). Определяли концентрацию РНК (A260 нм), РНК хранили при -80°C . С помощью обратной транскриптазы кДНК синтезировали из 1 мкг РНК с использованием набора для синтеза кДНК RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) и хранили при -80°C . На основании изотипа мышиного IgG1/каппа были сконструированы праймеры, показанные в таблице 5, для амплификации переменных (V) участков BTLA/HVEM, блокирующего мышиное антитело против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4.

Таблица 5. Праймеры для ПЦР, используемые для амплификации кДНК BTLA/HVEM-блокирующего мышиного антитела против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4.

No.*	Последовательность	s/as	Ген
383	ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTG (SEQ ID NO. 7)	s	VL
387	ATGGATTTWCAGGTGCAGATTWTCAGCTTC (SEQ ID NO. 8)	s	VL
389	ATGGGCWTCAAAGATGGAGTCACA (SEQ ID NO. 9)	s	VL
394	ACTGGATGGTGGGAAGATGG (SEQ ID NO.10)	as	Ck
404	ATGAAATGCAGCTGGGGCATSTTCTTC (SEQ ID NO. 11)	s	VH
407	ATGRACCTTTGGGYTCAGCTTGRTTT	s	VH

	(SEQ ID NO. 12)		
408	ATGGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCCTT (SEQ ID NO. 13)	s	VH
409	ATGGCTTGTCYTTTRGSGCTRCTCTTCTGC (SEQ ID NO. 14)	s	VH
416	CAGTGGATAGACAGATGGGGG (SEQ ID NO. 15)	as	CH

s = смысловой; as = антисмысловой; VL = переменная область легкой цепи; VH = переменная область тяжелой цепи; Ck = константная область мышиной каппа (κ) легкой цепи; CH = константная область тяжелой цепи мышиного IgG1; * Нумерация согласно внутренней системе кодирования Bioceros BV; вырожденные праймеры: K = G или T, S = G или C, R = A или G, M = A или C, W = A или T, Y = C или T, N = A или C или T, и N = любое основание.

Праймеры 383, 387 и 389 представляют собой смысловые праймеры, сконструированные для отжига с сигнальным пептидом легкой цепи мышиного антитела; праймер 394 представляет собой антисмысловый праймер для отжига с константной областью мышиной κ легкой цепи. Праймеры 404, 407, 408 и 409 представляют собой смысловые праймеры для отжига с сигнальным пептидом тяжелой цепи мышиного антитела; праймер 416 представляет собой антисмысловый праймер, сконструированный для отжига с константной областью тяжелой цепи мышиного IgG1. Были проведены различные ПЦР с использованием комбинаций праймеров, показанных в таблице 5. Полученные продукты ПЦР субклонировали в векторе pCR™-Blunt II-TOPO®. Впоследствии клонированные вставки секвенировали.

В результате реакций последовательностей тяжелых и легких цепей было получено в общей сложности 8 и 4 информативных последовательностей, соответственно, аминокислотных последовательностей мышиного антитела 36H12 против HVEM человека. На основании этой информации были определены консенсусные аминокислотные последовательности областей VH и VL мышиного антитела 36H12 против HVEM человека, которые представлены в SEQ ID NO. 16 и 17 соответственно. Аминокислотные последовательности CDR областей VH и VL мышиного антитела 36H12 против HVEM человека представлены в SEQ ID NO. 18-20 и 21-23 соответственно.

В результате реакций секвенирования как тяжелой, так и легкой цепи было получено в общей сложности 4 информативных последовательности мышиного антитела 45H6 против HVEM человека. На основании этой информации были определены консенсусные аминокислотные последовательности областей VH и VL мышиного антитела 45H6 против HVEM человека, которые представлены в SEQ ID NO. 24 и 25 соответственно. Аминокислотные последовательности CDR областей VH и VL мышиного антитела 45H6 против HVEM человека представлены в SEQ ID NO. 26-28 и 29-31 соответственно.

В результате реакций последовательностей тяжелой и легкой цепей было получено в общей сложности 5 и 4 информативных последовательности мышиногo антитела 48H6 против HVEM человека, соответственно. На основании этой информации были определены консенсусные аминокислотные последовательности областей VH и VL мышиногo антитела 48H6 против HVEM человека, которые представлены в SEQ ID NO. 32 и 33 соответственно. Аминокислотные последовательности CDR областей VH и VL мышиногo антитела 48H6 против HVEM человека представлены в SEQ ID NO. 34-36 и 37-39 соответственно.

В результате реакций последовательностей тяжелой и легкой цепей было получено в общей сложности 9 и 3 информативных последовательности мышиногo антитела 11H7 против HVEM человека, соответственно. На основании этой информации были определены консенсусные аминокислотные последовательности областей VH и VL мышиногo антитела 11H7 против HVEM человека, которые представлены в SEQ ID NO. 40 и 41 соответственно. Аминокислотные последовательности CDR областей VH и VL мышиногo антитела 11H7 против HVEM человека представлены в SEQ ID NO. 42-44 и 45-47 соответственно.

В результате реакций последовательностей тяжелой и легкой цепей было получено в общей сложности 5 и 3 информативных последовательности мышиногo антитела 49G4 против HVEM человека, соответственно. На основании этой информации были определены консенсусные аминокислотные последовательности областей VH и VL мышиногo антитела 49G4 против HVEM человека, которые представлены в SEQ ID NO. 48 и 49 соответственно. Аминокислотные последовательности CDR областей VH и VL мышиногo антитела 49G4 против HVEM человека представлены в SEQ ID NO. 50-52 и 53-55 соответственно.

Пример 5. Создание блокирующих BTLA/HVEM химерных IgG4/каппа мышинных/человеческих (т.е. замена константных областей IgG1/каппа мыши на константные области IgG4/каппа человека) моноклональных антител против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4

На основе определенных мышинных V-областей (см. пример 4 выше) BTLA/HVEM-блокирующих мышинных антител против HVEM человека была разработана конструкция для конструирования версий химерных мышинных/человеческих антител против HVEM человека. С этой целью для последовательностей кДНК, оптимизированных для экспрессии у млекопитающих, SEQ ID NO. 56 (кодирует тяжелую цепь IgG4 химерного мышиногo/человеческого 36H12), NO. 57 (кодирует тяжелую цепь IgG4 химерного мышиногo/человеческого 45H6), NO. 58 (кодирует тяжелую цепь IgG4 химерного мышиногo/человеческого 48H6), NO. 59 (кодирует тяжелую цепь IgG4 химерного мышиногo/человеческого 11H7), и NO. 60 (кодирует тяжелую цепь IgG4 химерного мышиногo/человеческого 49G4), и SEQ ID NO. 61 (кодирует легкую цепь к химерного мышиногo/человеческого 36H12), NO. 62 (кодирует легкую цепь к химерного мышиногo/человеческого 45H6), NO. 63 (кодирует

легкую цепь к химерного мышиногo/человеческого 48H6), NO. 64 (кодирует легкую цепь к химерного мышиногo/человеческого 11H7), и NO. 65 (кодирует легкую цепь к химерного мышиногo/человеческого 49G4), были заказаны в GENEART (Регенсбург, Германия), которые кодировали сигнальный пептид человека, за которым либо следовала цепь VH мыши, связанная с константной областью стабилизированного IgG4 человека (т.е. S239P; согласно Angal et al in Mol. Immunol., Vol. 30, No. 1, pp. 105-108, 1993), либо следовала VL-цепь мыши, связанная с константной областью капша человека. Используя подходящие рестрикционные ферменты, полученные кДНК субклонировали в экспрессионных плазидах, полученных из pcDNA3.1. Затем химерные антитела временно экспрессировали в клетках 293-F (Invitrogen) с использованием системы экспрессии FreeStyle™ 293 (Invitrogen). Экспрессированные химерные антитела против HVEM человека очищали от супернатантов с использованием обычных колонок для аффинной хроматографии с белком А. После этого уровни LPS определяли с использованием LAL хромогенного анализа конечной точки (Nycult Biotech), и все данные очищенные химерные мышиныe/человеческие антитела против HVEM человека (т.е. 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4) содержали <0,0005 EU LPS/мкг химерного IgG.

Для химерных аминокислотных последовательностей, см. SEQ ID NO. 66 (тяжелая цепь IgG4 химерного мышиногo/человеческого 36H12), NO. 67 (тяжелая цепь IgG4 химерного мышиногo/человеческого 45H6), NO. 68 (тяжелая цепь IgG4 химерного мышиногo/человеческого 48H6), NO. 69 (тяжелая цепь IgG4 химерного мышиногo/человеческого 11H7), и NO. 70 (тяжелая цепь IgG4 химерного мышиногo/человеческого 49G4), и SEQ ID NO. 71 (легкая к цепь химерного мышиногo/человеческого 36H12), NO. 72 (легкая к цепь химерного мышиногo/человеческого 45H6), NO. 73 (легкая к цепь химерного мышиногo/человеческого 48H6), NO. 74 (легкая к цепь химерного мышиногo/человеческого 11H7), и NO. 75 (легкая к цепь химерного мышиногo/человеческого 49G4).

Пример 6. Связывание и биологическая характеристика BTLA/HVEM-блокирующих химерных мышинных/человеческих антител против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4

(а). Относительная аффинность связывания BTLA/HVEM-блокирующих химерных мышинных/человеческих антител против HVEM человека в отношении мембраносвязанного HVEM человека

Чтобы определить относительную аффинность связывания очищенных BTLA/HVEM-блокирующих химерных мышинных/человеческих антител против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 в отношении HVEM человека, использовали анализ FACS.

С этой целью стабильные трансфицированные полноразмерным HVEM человека клетки HEK293F (клон № 128; см. пример 1(а) выше) помещали в концентрации 10×10^6 клеток/мл в охлажденный льдом PBS, содержащий 0,1% BSA (Sigma)/0,05% NaN_3 (PBS/BSA/ NaN_3) с добавлением 50 мкг/мл IgG человека (блокирует возможные рецепторы Fc γ ; Sigma) в течение 10 минут при 4°C. Затем 10 мкл/пробирку (т.е. $0,1 \times 10^6$ клеток) этих клеток инкубировали с 100 мкл титрованного (в PBS/BSA/ NaN_3) очищенного BTLA/HVEM, блокирующего химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека/пробирку, или без них, в течение 30 минут при 4°C. После обширной промывки в PBS/BSA/ NaN_3 клетки затем инкубировали с разбавленными 1:200 PE-конъюгированными Fc γ -специфичными козьими антителами против IgG человека (Jackson ImmunoResearch) в течение 30 минут при 4°C. После обширной промывки в PBS/BSA/ NaN_3 клетки фиксировали в 4% формальдегиде в PBS/BSA/ NaN_3 в течение 30 минут при 4°C. Связывание (среднегеометрическая интенсивность флуоресценции) химерных мышиных/человеческих антител против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 с мембранным HVEM человека измеряли с использованием проточного цитометра (FACSCalibur; BD Biosciences). Для сравнения, аналоги очищенного BTLA/HVEM-блокирующего мышиного антитела против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 анализировали параллельно, и их связывание контролировали, как описано в Примере 2 (а).

Как показано на Фигуре 5, BTLA/HVEM-блокирующие химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 дозозависимо связываются с мембранным HVEM человека. На основании их профиля связывания было обнаружено следующее ранжирование относительной аффинности (от высокой аффинности к более низкой): 45H6 = 49G4 > 36H12 = 48H6 > 11H7. Для сравнения, их аналоги BTLA/HVEM-блокирующие мышиные антитела против HVEM человека, № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4, также продемонстрировали дозозависимое связывание с мембранным HVEM человека и продемонстрировали очень похожее ранжирование относительной аффинности, т. е. 45H6 = 49G4 > 36H12 = 48H6 > 11H7. Более конкретно, химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека № 45H6, 49G4, 36H12, 48H6 и 11H7 показали следующую относительную аффинность (т.е. полумаксимальную EC50 связывания) 306, 312, 433, 472 и 630 нг/мл, соответственно, в то время как соответствующие мышиные антитела против HVEM человека № 45H6, 49G4, 36H12, 48H6 и 11H7 показали относительную аффинность 260, 266, 430, 356 и 532 нг/мл соответственно, что показало, что аффинность связывания BTLA/HVEM-блокирующих химерных мышиных/человеческих антител против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 против мембраносвязанного HVEM, по-видимому, оставалась неизменной в процессе химеризации.

b). Влияние BTLA/HVEM-блокирующих химерных мышиных/человеческих антител против HVEM человека на связывание BTLA человека, CD160 человека, LIGHT человека и TNF β человека с мембраносвязанным HVEM человека

Внеклеточный HVEM имеет две пространственно связывающие лиганд области (Cai et al. Immunol Rev 2009; 229: 244-258; Steinberg et al. Immunol Rev 2011; 244: 169-187; Pasero et al. Curr Opin Pharmacol 2012; 12: 478-485), одна область для канонических лигандов, которые принадлежат к суперсемейству TNF (т. е. LIGHT и TNF β), и другая

5 область для неканонических лигандов, которые принадлежат к суперсемейству Ig (т. е. BTLA и CD160). Мутационный анализ и молекулярное моделирование показали, что BTLA и CD160 взаимодействуют с CRD1, тогда как связывание LIGHT и TNF β находится в CRD2 и CRD3 на противоположной стороне HVEM.

10 Для анализа действия очищенных BTLA/HVEM-блокирующих химерных мышиных/человеческих антител против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 на связывание BTLA человека, CD160 человека, LIGHT человека и TNF β человека с мембраносвязанным HVEM человека, способность химерных мышиных/человеческих антител против HVEM человека стерически препятствовать взаимодействию BTLA

15 человека, CD160 человека, LIGHT человека и TNF β человека (или также называемого LT α) с полноразмерным HVEM человека, экспрессированным на поверхности (полученных из HEK) клеток 293F, определяли с помощью FACS-анализа.

Получение трансфицированных полноразмерным HVEM человека клеток

20 HEK293F (клон № 128) описано в примере 1а. Связывание растворимого BTLA человека, растворимого CD160 человека, растворимого LIGHT человека и растворимого TNF β человека на поверхности клеток, трансфицированных HVEM человека, анализировали с помощью FACS-анализа. С этой целью стабильные трансфицированные полноразмерным HVEM человека клетки HEK293F помещали в концентрации 10×10^6

25 клеток/мл в охлажденный льдом фосфатно-солевой буфер, содержащий 0,1% BSA (Sigma)/0,05% NaN₃ (PBS/BSA/NaN₃) с добавлением 50 мкг/мл IgG человека (блокирует возможные рецепторы Fc γ ; Sigma) в течение 10 минут при 4°C. Затем 10 мкл/пробирку (т.е. $0,1 \times 10^6$ клеток) этих клеток инкубировали с 100 мкл очищенного химерного мышиного/человеческого антитела против HVEM в концентрации 10 мкг/мл/пробирку

30 или без него, или с отрицательным изотипическим контролем IgG4 человека/к человека (Sigma) в концентрации 10 мкг/мл/пробирку или без него в течение 30 минут при 4°C. После этого (т.е. без промывки) клетки последовательно инкубировали с 1 мкг/мл растворимого биотинилированного BTLA человека (Sino Biological Inc), с 10 мкг/мл растворимого меченного гистидином CD160 человека (Sino Biological Inc), с 1 мкг/мл

35 растворимого меченного гистидином LIGHT человека (Sino Biological Inc) или с 0,1 мкг/мл растворимого биотинилированного TNF β человека (Sino Biological Inc) в PBS/BSA/NaN₃ в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в PBS/BSA/NaN₃ клетки инкубировали с разбавленным 1:200 PE-конъюгированным стрептавидином (обнаружение BTLA и TNF β ; Jackson ImmunoResearch) или с биотинилированным мышиным анти-his антителом (обнаружение CD160 и LIGHT; R&D Systems) при 10 мкг/мл в течение 30 минут при 4°C. После обширной промывки в PBS/BSA/NaN₃ клетки инкубировали с разбавленным 1:200 PE-конъюгированным стрептавидином (обнаружение CD160 и LIGHT; Jackson ImmunoResearch) в течение 30 минут при 4°C. После обширной промывки в PBS/BSA/NaN₃ клетки фиксировали в 4%

40

формальдегиде в PBS/BSA/NaN₃ в течение 30 минут при 4°C. Связывание лигандов BTLA, CD160, LIGHT и TNF β на мембранном HVEM человека измеряли с помощью проточного цитометра (модель FACSCalibur; BD Biosciences). Для сравнения, аналоги очищенного BTLA/HVEM-блокирующего мышиного антитела против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 в концентрации 10 мкг/мл/пробирку и отрицательный изотипический контроль мышиного IgG1 (BD Biosciences) в концентрации 10 мкг/мл/пробирку анализировали параллельно.

Как показано на фигуре 6A, BTLA/HVEM-блокирующие химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 предотвращали (т. е. блокировали > 95%) связывание BTLA человека с мембранным HVEM человека, что было сравнимо с их аналогами BTLA/HVEM-блокирующих мышиных антител против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 (т.е. блокировали > 95%).

Как показано на фигуре 6B, BTLA/HVEM-блокирующие химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 частично предотвращали (т. е. блокировали $\approx$ 60-65%) связывание CD160 человека с мембранным HVEM человека, что было сравнимо с их аналогами BTLA/HVEM-блокирующих мышиных антител против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 (т.е. блокировали $\approx$ 45-55%).

Как показано на фигуре 6C, BTLA/HVEM-блокирующие химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6 и 49G4 частично предотвращали (т. е. блокировали $\approx$ 30-50%) связывание LIGHT человека с мембранным HVEM человека, что было сравнимо с их аналогами BTLA/HVEM-блокирующих мышиных антител против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6 и 49G4 (т.е. блокировали $\approx$ 40-50%). Напротив, BTLA/HVEM-блокирующее химерное мышиное/человеческое антитело против HVEM человека № 11H7 не предотвращало, но неожиданно усиливало или стабилизировало (т.е. усиление на $\approx$ 20%) связывание LIGHT человека с мембранным HVEM человека, что было сравнимо с их аналогами BTLA/HVEM- блокирующего мышиного антитела против HVEM человека № 11H7 (т.е. усиление на $\approx$ 10%).

Как показано на фигуре 6D, BTLA/HVEM-блокирующие химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 (частично) предотвращали связывание TNF β человека с мембранным HVEM человека в различной степени (порядок; № 36H12 = 45H6 = 48H6 (т.е., > 94% блокирования) > 49G4 (т.е., > 80% блокирования) > 11H7 (т.е., > 55% блокирования)), что было сравнимо с их BTLA/HVEM-блокирующими мышиными аналогами антител против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 (ранговый порядок; № 36H12 = 45H6 = 48H6 (т.е., > 95% блокирования) > 49G4 (т.е., > 85% блокирования) > 11H7 (т.е., > 60% блокирования)).

с). Влияние BTLA/HVEM-блокирующих химерных мышиных/человеческих антител против HVEM человека на замещение предварительно связанного BTLA человека, CD160 человека, LIGHT человека и TNF β человека от мембраносвязанного HVEM человека

5

Чтобы проанализировать, способны ли очищенные BTLA/HVEM-блокирующие химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 вытеснять предварительно связанный BTLA человека, CD160 человека, LIGHT человека и TNF β человека от мембраносвязанного HVEM человека, эффект химерных мышиных/человеческих антител против HVEM человека на BTLA человека, на CD160 человека, на LIGHT человека и на TNF β человека (или также называемом LT α) вытеснения от полноразмерного HVEM человека, экспрессируемого на поверхности (полученных из HEK) клеток 293F, определяли с помощью анализа FACS.

10

15

Получение трансфицированных полноразмерным HVEM человека клеток HEK293F (клон № 128) описано в примере 1а. Замещение предварительно связанного растворимого BTLA человека, растворимого CD160 человека, растворимого LIGHT человека и растворимого TNF β человека на поверхности клеток, трансфицированных HVEM человека, анализировали с помощью FACS-анализа. С этой целью стабильные трансфицированные полноразмерным HVEM человека клетки HEK293F помещали в концентрации 10×10^6 клеток/мл в охлажденный льдом фосфатно-солевой буфер, содержащий 0,1% BSA (Sigma)/0,05% NaN $_3$ (PBS/BSA/NaN $_3$) с добавлением 50 мкг/мл IgG человека (блокирует возможные рецепторы Fc γ ; Sigma) в течение 10 минут при 4°C. Затем 10 мкл/пробирку (т.е. $0,1 \times 10^6$ клеток) этих клеток инкубировали без или с 50 мкл растворимого биотинилированного слитого белка BTLA человека и Fc γ человека (Sino Biological Inc) в концентрации 2 мкг/мл/пробирку, с растворимым меченным гистицином CD160 человека (Sino Biological Inc) в концентрации 20 мкг/мл/пробирку, с растворимым меченным гистицином LIGHT человека (Sino Biological Inc) в концентрации 2 мкг/мл/пробирку, или с растворимым биотинилированным TNF β человека (Sino Biological Inc) в концентрации 0,2 мкг/мл/пробирку в PBS/BSA/NaN $_3$ в течение 30 минут при 4°C. После этого (т.е. без промывания) клетки затем инкубировали с 50 мкл очищенного химерного мышиного/человеческого антитела против HVEM в концентрации 20 мкг/мл/пробирку или с отрицательным изотипическим контролем IgG4/к (Sigma) человека в концентрации 20 мкг/мл/пробирку в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в PBS/BSA/NaN $_3$ клетки инкубировали с разбавленным 1:200 PE-конъюгированным стрептавидином (обнаружение BTLA и TNF β ; Jackson ImmunoResearch) или с биотинилированным мышиным анти-his антителом (обнаружение CD160 и LIGHT; R&D Systems) при 10 мкг/мл в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в PBS/BSA/NaN $_3$ клетки инкубировали с разбавленным 1:200 PE-конъюгированным стрептавидином (обнаружение BTLA и TNF β ; Jackson ImmunoResearch) или с биотинилированным мышиным анти-his антителом (обнаружение CD160 и LIGHT; R&D Systems) при 10 мкг/мл в течение 30 минут при 4°C. После обширной промывки в PBS/BSA/NaN $_3$ клетки инкубировали с разбавленным 1:200 PE-конъюгированным стрептавидином (обнаружение CD160 и LIGH; Jackson

20

25

30

35

40

ImmunoResearch) в течение 30 минут при 4°C. После обширной промывки в PBS/BSA/NaN₃ клетки фиксировали в 4% формальдегиде в PBS/BSA/NaN₃ в течение 30 минут при 4°C. Остаточное связывание лигандов BTLA, CD160, LIGHT и TNF β на мембранном HVEM человека измеряли с помощью проточного цитометра (модель FACSCalibur; BD Biosciences). Для сравнения, аналоги очищенного BTLA/HVEM-блокирующего мышиного антитела против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 в концентрации 10 мкг/мл/пробирку и отрицательный изотипический контроль мышиного IgG1 (BD Biosciences) в концентрации 10 мкг/мл/пробирку анализировали параллельно.

Как показано на фигуре 7A, BTLA/HVEM-блокирующие химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 вытеснили (т.е. вытеснение >95%) предварительно связанный BTLA человека от мембранного HVEM человека.

Как показано на фигуре 7B, BTLA/HVEM-блокирующие химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 частично вытеснили (т.е. вытеснение $\approx$ 50-60%) предварительно связанный CD160 человека от мембранного HVEM человека.

Как показано на фигуре 7C, BTLA/HVEM-блокирующие химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6 и 49G4 не вытеснили (т.е. вытеснение <20%) предварительно связанный LIGHT человека от мембранного HVEM человека. Напротив, BTLA/HVEM-блокирующее химерное мышиное/человеческое антитело против HVEM человека № 11H7 не вытеснило предварительно связанный LIGHT человека от мембранного HVEM человека, но неожиданно усиливало или стабилизировало предварительно связанный (т.е. усиление $\approx$ 30%) LIGHT человека с мембранным HVEM человека.

Как показано на фигуре 7D, BTLA/HVEM-блокирующие химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6 и 49G4 (частично) вытесняли предварительно связанный TNF β от мембранного HVEM человека в различной степени (ранговый порядок; № 36H12 = 45H6 = 48H6 (т.е., > 90% вытеснения) > 49G4 (т.е., > 55% вытеснения)). Напротив, BTLA/HVEM-блокирующее химерное мышиное/человеческое антитело против HVEM человека № 11H7, по-видимому, не вытесняло предварительно связанный TNF β человека от мембранного HVEM человека (т.е. <20% вытеснения).

(d). Влияние BTLA/HVEM-блокирующих химерных мышиных/человеческих антител против HVEM человека на передачу сигналов NF κ B в клетках, экспрессирующих мембранный HVEM человека

Чтобы проанализировать влияние химерных мышиных/человеческих антител против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 на передачу сигналов NF κ B,

опосредованную мембраносвязанным HVEM человека, использовали репортерные клетки для биологического анализа HVEM человека с NFκB-элементом ответа-люциферазы (RE-luc) (HEK293; Promega), для изучения способности мышиных антител против HVEM человека активировать опосредованную HVEM передачу сигналов NFκB.

5

Вкратце, клетки NFκB-RE-luc, экспрессирующие HVEM человека, высевали в количестве 35000 клеток/лунку в 96-луночные планшеты с плоским дном, обработанные ТС, с белым твердым покрытием (Corning), и инкубировали в течение ночи при 37°C/5% CO₂. На следующий день эти клетки промывали и затем инкубировали с 0,0015-10 мкг/мл (стадии 3-кратного разведения) химерных мышиных/человеческих антител против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 или без них. Титрованный (т.е. 0,0015-10 мкг/мл (стадии 3-кратного разведения)) растворимый человеческий LIGHT с гистидиновой меткой (R&D Systems) анализировали параллельно для использования в качестве эталона. После 6 часов инкубации при 37°C/5% CO₂ продукцию люциферазы в клетках HVEM человека, экспрессирующих NFκB-NFκB-RE-luc, измеряли с использованием системы анализа люциферазы Bio-Glo™ (Promega) в люминометре.

10

15

20

25

30

Как показано на фигуре 8А, только химерное мышиное/человеческое антитело против HVEM человека № 48H6 индуцировало слабую дозозависимую активацию NFκB в клетках NFκB-RE-luc, экспрессирующих HVEM человека (т.е. по сравнению с опосредованной растворимым LIGHT индукцией NFκB), тогда как химерные мышиные/человеческие антитела № 36H12, 45H6, 11H7 и 49G4 не проявляли или проявляли очень слабую агонистическую активность в клетках NFκB-RE-luc, экспрессирующих HVEM человека (т.е. по сравнению с опосредованной растворимым LIGHT индукцией NFκB). Контрольный растворимый человеческий LIGHT также показал дозозависимую активацию NFκB в этих клетках NFκB-RE-luc, экспрессирующих HVEM человека. Примечательно, что растворимый LIGHT человека, как было показано, гораздо менее эффективен, чем клетки, экспрессирующие мембраносвязанный LIGHT, в отношении активации HVEM человека, экспрессируемого на клетках (Cheung et al. PNAS 2009; 106: 6244-6249).

35

40

Хотя аффинность связывания BTLA/HVEM-блокирующего химерного мышиного/человеческого антитела против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 против мембраносвязанного HVEM, по-видимому, оставались неизменной в процессе химеризации (см. пример 6а), оказалось неожиданным, что BTLA/HVEM-блокирующие химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6 и 49G4 с их человеческим константным Fc-хвостом IgG4 не были или были лишь способны слабо имитировать опосредованную LIGHT человека/HVEM человека передачу сигналов NFκB в отличие от их аналогов мышиных IgG1 антител против HVEM человека, которые четко демонстрировали сигнальную активность NFκB (см. пример 3а).

(е). Влияние спитых BTLA/HVEM-блокирующих химерных мышиных/человеческих антител против HVEM человека на передачу сигналов NFκB в клетках, экспрессирующих мембранный HVEM человека

5 Хорошо известно, что сшивка антител против CD40 и OX40/CD134 человека (оба являются членами суперсемейства рецепторов TNF, как и HVEM/CD270 человека) может усиливать их агонистическую активность (т. е. имитировать опосредующие
10 эффекты CO40L и OX40L, соответственно) при связывании с мембраносвязанными клетками, экспрессирующими CD40 и OX40 (Xu et al. Cancer Cell 2018; 33: 664-675; Zhang et al. J Biol Chem 2016; 291: 27134-27146). Из-за описанных выше неожиданных результатов с BTLA/HVEM-блокирующими химерными мышиными/человеческими
15 антителами против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6 и 49G4 (т. е. не способными или способными слабо имитировать передачу сигналов NKκB, опосредованную растворимым LIGHT человека/HVEM человека, в отличие от их аналогов мышиных антител против HVEM человека, которые явно демонстрируют сигнальную активность NFκB (см. пример 6б и 3а соответственно)), степень агрегации антител (1) химерного мышиного/человеческого и (2) полностью мышиного вариантов антитела против HVEM
20 человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 определяли с помощью анализа эксклюзионной хроматографии и продемонстрировали следующее: (1) 2,3%, 0,7%, 1,2%, 1,6% и 9,4% агрегация для химерных мышиных/человеческих антител против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4, соответственно, и (2) 36,3%, 25,8%, 19,9%, 12,4% и 14,8% агрегация для полностью мышиных антител против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 соответственно. Эта относительно высокая степень агрегации антител в препаратах мышиных антител против HVEM человека № 36H12,
25 45H6, 48H6 и 49G4 убедительно свидетельствует о том, что агонистическая активность мышиных антител против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6 и 49G4 в репортерных клетках для биоанализа HVEM человека с NFκB-элементом ответа-люциферазы (RE-luc) представляла собой искусственный эффект, вызванный агрегацией антител (т. е. имитирующий эффект перекрестного связывания антител). Для подтверждения этой
30 гипотезы использовали несшитые и сшитые BTLA/HVEM- блокирующие химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 (с относительно низкой степенью агрегации антител) были исследованы с использованием репортерных клеток для биоанализа HVEM человека с NFκB-ответным элементом-люциферазой (RE-luc).

35 Вкратце, клетки NFκB-RE-luc, экспрессирующие HVEM человека, высевали в количестве 35000 клеток/лунку в 96-луночные планшеты с плоским дном, обработанные ТС, с белым твердым покрытием (Corning), и инкубировали в течение ночи при 37°C/5% CO₂. На следующий день эти клетки промывали и затем инкубировали с 0,016-10 мкг/мл
40 (стадии 5-кратного разведения) химерных мышиных/человеческих антител против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 или без них, которые были предварительно обработаны 10 мкг/мл сшивающими козьими Fcγ-специфичными антителами против IgG человека (Jackson ImmunoResearch) в течение 15–30 минут при комнатной температуре. Титрованный (т.е. 0, 0,016-10 мкг/мл (стадии 5-кратного

разбавления)) растворимый LIGHT человека с гистиридиновой меткой (Sino Biological Inc) использовали параллельно для целей контроля. После 6 часов инкубации при 37°C/5% CO₂ продукцию люциферазы в клетках HVEM человека, экспрессирующих NFκB-NFκB-RE-luc, измеряли с использованием системы анализа люциферазы Bio-Glo™ (Promega) в люминометре.

Как показано на фигуре 8B, только несшитое химерное мышиное/человеческое антитело против HVEM человека № 48H6 индуцировало слабую дозозависимую активацию NFκB в клетках NFκB-RE-luc, экспрессирующих HVEM человека (т.е. по сравнению с опосредованной растворимым LIGHT индукцией NFκB), тогда как несшитые химерные мышиные/человеческие антитела № 36H12, 45H6, 11H7 и 49G4 не проявляли или проявляли очень слабую агонистическую активность в клетках NFκB-RE-luc, экспрессирующих HVEM человека (т.е. по сравнению с опосредованной растворимым LIGHT индукцией NFκB). Напротив, все исследованные сшитые химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека индуцировали дозозависимую активацию NFκB в клетках NFκB-RE-luc, экспрессирующих HVEM человека (т.е. по сравнению с индукцией NFκB, опосредованной растворимым LIGHT). Контрольный растворимый LIGHT человека также показал дозозависимую активацию NFκB в этих клетках NFκB-RE-luc, экспрессирующих HVEM человека. Примечательно, что растворимый LIGHT человека, как было показано, гораздо менее эффективен, чем клетки, экспрессирующие мембраносвязанный LIGHT, в отношении активации HVEM человека, экспрессируемого на клетках (Cheung et al. PNAS 2009; 106: 6244-6249).

Эти результаты показали, что несшитые химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 (с относительно низкой степенью агрегации антител) не были способны или лишь слабо имитировали опосредованную растворимым LIGHT человека/HVEM человека передачу сигналов NFκB, тогда как после сшивки эти химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 были способны имитировать передачу сигналов NFκB, опосредованную растворимым LIGHT человека/HVEM человека. Примечательно, что растворимый LIGHT человека, как было показано, гораздо менее эффективен, чем клетки, экспрессирующие мембраносвязанный LIGHT, в отношении активации HVEM человека, экспрессируемого на клетках (Cheung et al. PNAS 2009; 106: 6244-6249).

(f). Влияние BTLA/HVEM-блокирующих химерных мышиных/человеческих антител против HVEM человека на передачу сигналов NFκB, индуцированную растворимым LIGHT человека, в клетках, экспрессирующих мембранный HVEM человека

Для того чтобы проанализировать влияние химерных мышиных/человеческих антител против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 на передачу сигналов NFκB, индуцированную растворимым LIGHT человека, в клетках, экспрессирующих мембранный HVEM человека, использовали NFκB-RE-luc репортерные клетки для биоанализа HVEM человека (HEK293; Promega) для изучения способности мышиных антител против HVEM человека препятствовать (например,

путем блокирования, аддитивно или синергетически) передаче сигналов NFκB, опосредованной растворимым LIGHT/мембранным HVEM.

Вкратце, клетки NFκB-RE-luc, экспрессирующие HVEM человека, высевали в количестве 35000 клеток/лунку в 96-луночные планшеты с плоским дном, обработанные ТС, с белым твердым покрытием (Corning), и инкубировали в течение ночи при 37°C/5% CO₂. На следующий день эти клетки промывали и затем инкубировали с 0,0015-10 мкг/мл (стадии 3-кратного разведения) химерных мышиных/человеческих антител против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 или без них, с растворимым LIGHT человека с гистидиновой меткой (Sino Biological Inc) в концентрации 0,3 мкг/мл (≈ EC80; см. пример 2а и фигуру 3А). После 6 часов инкубации при 37°C/5% CO₂ продукцию люциферазы в клетках HVEM человека, экспрессирующих NFκB-NFκB-RE-luc, измеряли с использованием системы анализа люциферазы Bio-Glo™ (Promega) в люминометре.

Как показано на фигуре 8С, химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 не демонстрировали влияния на активацию NFκB, опосредованную растворимым LIGHT человека в клетках NFκB-RE-luc, экспрессирующих HVEM человека.

Эти результаты показали, что химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 не были способны влиять на передачу сигналов NFκB, опосредованную растворимым LIGHT человека/HVEM человека.

(g). Влияние BTLA/HVEM-блокирующих химерных мышиных/человеческих антител против HVEM человека на передачу сигналов NFκB, индуцированную растворимым TNFβ человека, в клетках, экспрессирующих мембранный HVEM человека

Сообщалось, что TNFβ/LTα слабо связывается с HVEM, и его точная функциональная роль в пути HVEM до сих пор неясна (Cai et al. Immunol Rev 2009; 229: 244-258), хотя существует общий консенсус в отношении того, что путь TNFβ/HVEM (как и путь LIGHT/HVEM) обеспечивает костимулирующие сигналы, что приводит к усилению иммунных ответов (Cai et al. Immunol Rev 2009; 229: 244-258; Steinberg et al. Immunol Rev 2011; 244: 169-187; Pasero et al. Curr Opin Pharmacol 2012; 12: 478-485; Del Rio et al. Am J Transplant 2013; 13:541-551; Schaer et al. J Immunother Cancer 2014; 2: 7).

Для того чтобы проанализировать влияние химерных мышиных/человеческих антител против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 на передачу сигналов NFκB, индуцированную растворимым TNFβ человека, в клетках, экспрессирующих мембранный HVEM человека, использовали NFκB-RE-luc репортерные клетки для биоанализа HVEM человека (HEK293; Promega) для изучения способности мышиных антител против HVEM человека препятствовать (например,

путем блокирования, аддитивно или синергетически) передаче сигналов NFκB, опосредованной растворимым TNFβ/мембранным HVEM.

Вкратце, клетки NFκB-RE-luc, экспрессирующие HVEM человека, высевали в количестве 32000 клеток/лунку в 96-луночные планшеты с плоским дном, обработанные ТС, с белым твердым покрытием (Corning), и инкубировали в течение ночи при 37°C/5% CO₂. На следующий день эти клетки промывали и затем инкубировали с 0,0015-10 мкг/мл (стадии 3-кратного разведения) химерных мышиных/человеческих антител против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 или без них, с растворимым рекомбинантным TNFβ человека (Sino Biological) в концентрации 0,05 мкг/мл (≈ EC80; см. фигуру 9A). Титрованный (т.е. 0, 0,000026-2 мкг/мл (стадии 5-кратного разбавления)) растворимый рекомбинантный TNFβ человека использовали параллельно для целей контроля. После 6 часов инкубации при 37°C/5% CO₂ продукцию люциферазы в клетках HVEM человека, экспрессирующих NFκB-NFκB-RE-luc, измеряли с использованием системы анализа люциферазы Bio-Glo™ (Promega) в люцинометре.

Как показано на фигуре 9B, химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 не демонстрировали влияния на активацию NFκB, опосредованную растворимым TNFβ человека, в клетках NFκB-RE-luc, которые экспрессировали относительно низкие уровни мембраносвязанного HVEM человека (т.е. отношение сигнал/шум <5 при использовании PE-конъюгированного мышиного антитела против HVEM человека (клон eBioHVEM-122; eBioscience) при 1:20). Это наблюдение было неожиданным, поскольку химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека № 6H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 предотвращали связывание растворимого TNFβ человека и/или вытесняли предварительно связанный растворимый TNFβ человека (см. пример 5 (b) и пример 5 (c) соответственно) из клона клеток HEK293F № 128, которые экспрессировали относительно высокие уровни мембраносвязанного HVEM человека (т. е. сверхэкспрессия; отношение сигнал/шум ≈1000 при использовании PE-конъюгированного мышиного антитела против HVEM человека (клон eBioHVEM-122; eBioscience) при 1:20) ; см. фигуру 1). Однако сообщалось, что TNFβ человека обладает высокой аффинностью связывания с TNFR1/CD120a человека и TNFR2/CD120b человека (Medvedev et al. J Biol Chem 1996; 16: 9778-9784). Интересно, что клетки HEK293 эндогенно экспрессируют низкие уровни TNFR1/CD120a человека (Murphy et al. Cell Death Differ. 1998; 5 :497-505; McFarlane et al. FEBS Letters 2002; 515: 119-126; Razonable et al. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 1617-1621). Наиболее вероятно, что TNFβ человека предпочтительно связывается с этими «высокоаффинными» TNFR1 человека (в отличие от HVEM человека с «низкой/слабой аффинностью») на этих коэкспрессирующих клетках с низким HVEM+/TNFR1+, тем самым предпочтительно запуская активацию NFκB, опосредованную растворимым TNFβ человека/TNFR1 человека (в отличие от опосредованной растворимым TNFβ человека/HVEM человека). В таких условиях химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека будут неэффективны.

Эти результаты показали, что химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 не были способны влиять на опосредованную растворимым TNF β человека передачу сигналов NKкВ, когда мембраносвязанный HVEM человека и мембраносвязанный TNFR1 человека коэкспрессируются на относительно низких уровнях в клетках.

(h). Влияние BTLA/HVEM-блокирующих химерных мышиных/человеческих антител против HVEM человека на ингибирование TCR-индуцированной передачи сигналов NFAT, опосредованное мембранным BTLA человека/мембранным HVEM человека в Т-клетках, экспрессирующих мембранный BTLA человека/мембранный TCR человека.

Чтобы проанализировать влияние химерных мышиных/человеческих антител против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 на ингибирование индуцированной мембранным TCR человека передачи сигналов NFAT, опосредованное мембранным BTLA человека/мембранным HVEM человека, биоанализ блокирования NFAT-элемента ответа-люциферазы (RE-luc) человека BTLA/HVEM использовали для изучения способности мышиных антител против HVEM человека блокировать BTLA/HVEM-опосредованное ингибирование TCR-индуцированной передачи сигналов NFAT.

Вкратце, СНО-K1 активаторные клетки, экспрессирующие HVEM человека и запатентованный активатор TCR человека, высевали в количестве 40 000 клеток/лунку в 96-луночные планшеты с плоским дном, обработанные ТС, с белым твердым покрытием (Corning), и инкубировали в течение ночи при 37°C/5% CO₂. На следующий день эти клетки промывали и затем инкубировали с 0,0015-10 мкг/мл (стадии 3-кратного разведения) химерных мышиных/человеческих антител против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 или без них. Затем добавляли NFAT-RE-luc эффекторные Т-клетки Jurkat, экспрессирующие BTLA человека и TCR человека, в количестве 50000 клеток/лунку. После 6 часов инкубации при 37°C/5% CO₂ продукцию люциферазы в NFAT-RE-luc эффекторных Т-клетках Jurkat, экспрессирующих BTLA человека и TCR человека, измеряли с использованием системы анализа люциферазы Bio-Glo™ (Promega) в люминометре.

Как показано на фигуре 10, все исследованные химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека дозозависимо блокировали BTLA/HVEM-опосредованное ингибирование TCR-индуцированной передачи сигналов NFAT в NFAT-RE-luc эффекторных Т-клетках Jurkat, экспрессирующих BTLA человека и TCR человека, в различной степени (в указанном порядке; № 45H6 > 49G4 > 11H7 > 36H12 >> 48H6).

Эти результаты показали, что химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 были способны блокировать ингибирование TCR-индуцированной передачи сигналов NFAT, опосредованное BTLA человека/HVEM человека.

(k). Влияние BTLA/HVEM-блокирующих химерных мышиных/человеческих антител против HVEM человека на ингибирование TCR-индуцированного высвобождения цитокина, опосредованное мембранным BTLA человека/мембранным HVEM человека, из первичных наивных Т-клеток человека, экспрессирующих мембранный BTLA человека/мембранный TCR человека.

Как описано выше, лигирование HVEM на Т-лимфоцитах с помощью LIGHT обеспечивает положительные костимулирующие сигналы через HVEM, тогда как взаимодействие BTLA с Т-лимфоцитами с помощью HVEM обеспечивает отрицательные коингибирующие сигналы для Т-лимфоцитов через BTLA (Del Rio et al. *Journal Leukocyte Biology* 2010; 87: 223-235). Этот путь BTLA/HVEM подавляет TCR-опосредованную передачу сигналов как в CD4, так и в CD8 Т-лимфоцитах и приводит к снижению пролиферации Т-лимфоцитов и продукции цитокинов.

Для анализа действия химерных мышиных/человеческих антител против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 на ингибирование высвобождения цитокина, индуцированного мембранным TCR человека, опосредованное мембранным BTLA человека/мембранным HVEM человека, совместную культуру (1) стабильных клеток HEK293F, трансфицированных полноразмерным HVEM человека (клон № 128; см. выше пример 1a), которые были временно трансфицированы одноцепочечным варибельным фрагментом (scFv)-активатором TCR против мембраносвязанного CD3 (ОКТ3) человека, как описано ранее (Chen et al. *Front Immunol* 2017; 8: 793; искусственные антигенпрезентирующие клетки) с небольшими модификациями, и (2) первичных наивных Т-клеток человека (клетки-респондеры), экспрессирующих мембранный BTLA человека и мембранный TCR-комплекс человека, использовали для исследования способности мышиных антител против HVEM человека ослаблять/обращать вспять опосредованное BTLA/HVEM ингибирование TCR-индуцированного высвобождения цитокинов (принцип анализа см. также на фигуре 4A, за исключением того, что искусственные антигенпрезентирующие клетки CHO-K1, экспрессирующие HVEM человека, и эффекторные Т-клетки Jurkat, экспрессирующие BTLA человека, были заменены на искусственные антигенпрезентирующие клетки HEK293F, экспрессирующие HVEM человека, и первичные наивные Т-клетки человека, экспрессирующие BTLA человека, соответственно).

Вкратце, кДНК, кодирующая scFv белок-активатор TCR против мембраносвязанного CD3 (ОКТ3) человека (SEQ ID NO: 76), была оптимизирована для экспрессии у млекопитающих и синтезирована компанией GENEART, Регенсбург, Германия (см. SEQ ID NO: 77). Эту кДНК субклонировали в экспрессионной плазмиде, полученной из pcDNA3.1. Эту плазмиду, кодирующую scFv белок-активатор TCR против CD3 (ОКТ3) человека, трансфицировали в стабильные трансфицированные полноразмерным HVEM человека клетки HEK293F (клон № 128; см. выше пример 1a) с использованием экспрессионной системы FreeStyle™ 293 (Life Technologies). Через 2 дня эти клетки HEK293F собирали и ресуспендировали в концентрации $1,0 \times 10^6$ клеток/мл в культуральной среде RPMI-1640 (Gibco), содержащей 10% фетальной телячьей

сыворотки (Capricorn) и 50 мкг/мл гентамицина (Gibco). Перед совместным культивированием поверхностную экспрессию scFv белка-активатора TCR против CD3 (ОКТ3) человека на временно трансфицированных клетках HEK293F, экспрессирующих HVEM человека (т. е. используемые в качестве искусственных антиген-презентирующих

5 клеток) подтверждали с помощью разведенных 1:200 PE-конъюгированных козьих Fcγ-специфичных антител против IgG человека (Jackson ImmunoResearch) и проточной цитометрии.

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) от здоровых

10 доноров (информированное согласие) выделяли центрифугированием в плотности на Lymphoprep™ (1,077 г/мл; Nycomed). Затем Т-лимфоциты человека (т.е. CD4 и CD8) обогащали из этой фракции PBMC с использованием набора Dynabeads™ Untouched™ Human T Cells Kit (Invitrogen), и ресуспендировали в концентрации $1,0 \times 10^6$ клеток/мл в культуральной среде RPMI-1640 (Gibco), содержащей 10% фетальной телячьей

15 сыворотки (Capricorn) и 50 мкг/мл гентамицина (Gibco). Перед совместным культивированием поверхностную экспрессию BTLA человека на обогащенных человеческих наивных Т-лимфоцитах (т. е. используемых в качестве клеток-респондеров) подтверждали с использованием разбавленного 1:20 PE-конъюгированного специфичного мышиного антитела против BTLA человека (BD Biosciences) и проточной

20 цитометрии.

Искусственные антигенпрезентирующие клетки HEK293F, экспрессирующие HVEM человека, в концентрации $1,0 \times 10^6$ клеток/мл, предварительно обрабатывали 40

25 мкг/мл химерных мышиных/человеческих антител против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 в течение 15-30 минут при комнатной температуре. Параллельно использовали 40 мкг/мл человеческого IgG4/κ (Sigma) в качестве отрицательного изотипического контроля. После этого (т.е. без промывания) эти химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека, предварительно

30 обработанные искусственными антиген-презентирующими клетками HEK293F, и обогащенные наивными Т-лимфоцитами человека совместно культивировали в соотношении 1:1 (т.е. 50 000 Т-клеток /50 000 искусственных антиген-презентирующих клеток/200 мкл/лунка) в плоскодонных обработанных ТС прозрачных 96-луночных планшетах (Corning) с добавлением и без добавления 0,5 мкг/мл костимулирующего

35 мышиного антитела против CD28 человека (клон CD28.2; BD Biosciences) в присутствии 20 мкг/мл химерных мышиных/человеческих антител против HVEM человека № 36H12, 45H6, 48H6, 11H7 и 49G4 или 20 мкг/мл отрицательного изотипического контроля человеческого IgG4/κ (Sigma) при 37°C/5% CO₂ в течение 2 дней. После 2-дневного культивирования супернатанты собирали и замораживали при -80°C до использования.

40 Высвобождение IL-2 человека, TNFα человека и IFNγ человека из первичных наивных Т-лимфоцитов человека определяли в этих супернатантах с использованием традиционных методов сэндвич-ELISA собственной разработки, т. е. (I) для IL-2 ELISA использовали комбинацию крысиного моноклонального покрывающего антитела против IL-2 человека (клон MQ1-17H12; eBioscience), титрованных стандартов rhuIL-2

(PeproTech) и биотинилированных кроличьих поликлональных детектирующих антител против IL-2 человека (eBioscience), (II) для TNF α ELISA использовали комбинацию покрытия из мышиных моноклональных антител против TNF α человека (клон MAb11; Biolegend), титрованных стандартов rhuTNF α (PeproTech) и биотинилированных мышиных моноклональных детектирующих антител против TNF α человека (клон MAb11; Biolegend), и (III) для IFN γ ELISA использовали комбинацию мышиного моноклонального покрывающего антитела против IFN γ человека (клон NIB42; eBioscience), титрованных стандартов rhuIFN γ (PeproTech) и биотинилированных мышиных моноклональных детектирующих антител против IFN γ человека (клон 4S.B3 ; eBioscience).

Супернатанты искусственных антиген-презентирующих клеток HEK293F или обогащенных наивных Т-лимфоцитов человека, которые не культивируются совместно, а культивируются отдельно в течение 2 дней (т.е. 50 000 искусственных антиген-презентирующих клеток/200 мкл/лунка или 50 000 Т-клеток//200 мкл /лунка), не демонстрировали измеримых уровней человеческого IL-2, человеческого TNF α или человеческого IFN γ .

Как показано на фигуре 11A, все исследованные химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека ослабляли/обращали вспять BTLA/HVEM-опосредованное ингибирование TCR/CD28-индуцированного высвобождения IL-2 из совместно культивируемых первичных наивных Т-лимфоцитов человека, экспрессирующих BTLA человека, обогащенных от всех 6 здоровых доноров в различной степени (ранговый порядок; № 45H6 > 11H7 > 36H12 > 49G4 >> 48H6). Кроме того, химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека № 36H12, 45H6 11H7 и 49G4 ослабляли/обращали вспять BTLA/HVEM-опосредованное ингибирование TCR-индуцированного высвобождения IL-2 (если таковое имеется) из совместно культивируемых первичных наивных Т-лимфоцитов человека, экспрессирующих BTLA человека, обогащенных от 2/6 здоровых доноров (т.е. донор А и Н) в различной степени (ранговый порядок; № 45H6 > 11H7 > 36H12 > 49G4).

Как показано на фигуре 11B, все исследованные химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека № 36H12, 45H6 и 11H7 ослабляли/обращали вспять BTLA/HVEM-опосредованное ингибирование TCR/CD28-индуцированного высвобождения TNF α из совместно культивируемых первичных наивных Т-лимфоцитов человека, экспрессирующих BTLA человека, обогащенных от всех 6 здоровых доноров в различной степени (ранговый порядок; № 45H6 > 11H7 > 36H12). Кроме того, химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека № 36H12, 45H6 и 11H7 ослабляли/обращали вспять BTLA/HVEM-опосредованное ингибирование TCR-индуцированного высвобождения TNF α (если таковое имеется) из совместно культивируемых первичных наивных Т-лимфоцитов человека, экспрессирующих BTLA человека, обогащенные от 4/6 здоровых доноров (т.е. А, D, Н и К) в различной степени (ранговый порядок; № 45H6 > 11H7 = 36H12).

Как показано на фигуре 11C, все исследованные химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека № 36H12, 45H6 и 11H7

ослабляли/обращали вспять BTLA/HVEM-опосредованное ингибирование TCR/CD28-индуцированного высвобождения IFN γ из совместно культивируемых первичных наивных Т-лимфоцитов человека, экспрессирующих BTLA человека, обогащенных от всех 6 здоровых доноров в различной степени (ранговый порядок; № 45H6 > 11H7 > 36H12). Кроме того, химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека № 36H12, 45H6 и 11H7 ослабляли/обращали вспять BTLA/HVEM-опосредованное ингибирование TCR-индуцированного высвобождения IFN γ (если таковое имеется) из совместно культивируемых первичных наивных Т-лимфоцитов человека, экспрессирующих BTLA человека, обогащенных от 4/6 здоровых доноров (т.е. А, D, Н и К) в различной степени (ранговый порядок; № 45H6 = 11H7 > 36H12).

Эти результаты продемонстрировали, что химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека № 36H12, 45H6 и 11H7 были способны ослаблять/обращать вспять опосредованное BTLA человека/HVEM человека ингибирование TCR/CD28-индуцированного высвобождения IL-2, TNF α и IFN γ из первичных наивных Т-клеток человека, экспрессирующих BTLA человека. Кроме того, эти результаты продемонстрировали, что химерные мышиные/человеческие антитела против HVEM человека № 36H12, 45H6 и 11H7 были способны ослаблять/обращать вспять опосредованное BTLA человека/HVEM человека ингибирование TCR-индуцированного высвобождения IL-2, TNF α и IFN γ (если таковое имеется) из первичных наивных Т-клеток человека, экспрессирующих BTLA человека.

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO. 1

Аминокислотная последовательность HVEM человека (Swiss-Prot no. Q92956.3; а.к. 1-283)

```

1  MEPPGDWGPP PWRSTPKTDV LRLVLYLTFL GAPCYAPALP SCKEDEYPVG SECCPKCSPG
61  YRVKEACGEL TGTVCPEPCPP GTYIAHLNGL SKCLQCQMC D PAMGLRASRN CSRTENAVCG
121 CSPGHFCIVQ DGDHCAACRA YATSSPGQRV QKGGTESQDT LCQNCPPGTF SPNGTLEECQ
181 HQTKCSWLVT KAGAGTSSSH WWWWFLSGSL VIVIVCSTVG LIICVKRRKP RGDVVKVIVS
241 VQRKRQEAEG EATVIEALQA PPDVTTVAVE ETIPSFTGRS PNH

```

Сигнальный пептид (последовательность а.к. 1-38), внеклеточный домен (последовательность а.к. 39-202, содержащая CRD1 (последовательность а.к. 42-75), CRD2 (последовательность а.к. 78-119), CRD3 (последовательность а.к. 121-162) и усеченная CRD4 (последовательность а.к. 165-179), «линкер» (последовательность а.к. 180-202)), трансмембранный домен (последовательность а.к. 203-223) и цитоплазматический домен (последовательность а.к. 224-283)

SEQ ID NO. 2

последовательность кДНК, кодирующая белок HVEM человека
(оптимизированная для экспрессии у млекопитающих)

```

5      1  ATGGAGCCCC CTGGCGATTG GGGACCTCCA CCTTGGAGAA GCACCCCCAA GACCGACGTG
      61  CTGCGGCTGG TGCTGTACCT GACCTTTCTG GCGCTCCCT GTTACGCCCC TGCCCTGCCT
     121  AGCTGCAAAG AGGACGAGTA CCCTGTGGGC AGCGAGTGCT GCCCTAAGTG CAGCCCTGGC
      TACAGAGTGA AAGAGGCCTG CGGCGAGCTG ACCGGCACCG TGTGTGAACC TTGTCCCCCT
     241  GGCACCTATA TCGCCACCT GAACGGCCTG AGCAAGTGCC TGCAGTGCCA GATGTGCGAC
    10  301  CCCGCTATGG GCCTGAGAGC CAGCAGAAAC TGCAGCCGGA CCGAGAATGC CGTGTGCGGC
      361  TGTTCTCCTG GCCACTTCTG CATCGTGCAG GACGGCGATC ACTGCGCCGC CTGTAGAGCC
      421  TACGCCACAT CTAGCCCAGG CCAGAGAGTG CAGAAGGGCG GCACCGAGAG CCAGGATACC
      481  CTGTGCCAGA ATTGCCCTCC CGGCACCTTC AGCCCCAACG GCACACTGGA AGAGTGCCAG
      541  CACCAGACCA AGTGCAGCTG GTCGTGACC AAAGCCGGCG CTGGCACAAG CAGCTCTCAC
    15  601  TGGGTGTGGT GGTTCCTGAG CGGCAGCCTC GTGATCGTGA TTGTGTGCAG CACCGTGGGC
      661  CTGATCATCT GCGTGAAGCG GAGAAAGCCC AGAGGCGACG TCGTGAAAGT GATCGTGTCC
      721  GTGCAGCGGA AGCGGCAGGA AGCCGAAGGC GAGGCCACAG TGATTGAGGC CCTGCAGGCT
      781  CCCCTGACG TGACAACAGT GGCCGTGGAA GAGACAATCC CCAGCTTCAC CGGCAGATCC
      841  CCCAACCCAC
20

```

SEQ ID NO. 3

Аминокислотная последовательность HVEM человека с усеченной CRD1

```

25      1  MEWSGVFMFL LSVTAGVHSE PCPPGTYIAH LNGLSKCLQC QMCDPAMGLR ASRNCSTRTE
      61  AVCGCSPGHF CIVQDGDHCA ACRAYATSSP GQRVQKGGTE SQDTLCQNCP PGTFSPNGTL
     121  EECQHQTCKS WLVTKAGAGT SSSHWVWWFL SGSLVIVIVC STVGLIICVK RRKPRGDVVK
     181  VIVSVQRKRQ EAEGEATVIE ALQAPPDVT T VAVEETIPSF TGRSPNH

```

30 Сигнальный пептид мышиногo Ig (последовательность а.к. 1-19), внеклеточный
домен (последовательность а.к. 20-146, содержащая CRD2 (последовательность
а.к. 22-63), CRD3 (последовательность а.к. 65-106), и усеченную CRD4
(последовательность а.к. 109-123), «линкерный» фрагмент (последовательность
а.к. 124-146)), трансмембранный домен (последовательность а.к. 147-167) и
35 цитоплазматический домен (последовательность а.к. 168-227)

SEQ ID NO. 4

40 последовательность кДНК, кодирующая белок HVEM человека с усеченной
CRD1 (оптимизированная для экспрессии у млекопитающих)

```

      1  ATGGAGTGGA GCGGCGTGTT CATGTTCCCTG CTGAGCGTGA CAGCCGGCGT GCACAGCGAA
      61  CCTTGTCCCC CTGGCACCTA TATCGCCAC CTGAACGGCC TGAGCAAGTG CCTGCACTGC
    45  121  CAGATGTGCG ACCCGCTAT GGGCCTGAGA GCCAGCAGAA ACTGCAGCCG GACCGAGAAT
      181  GCCGTGTGCG GCTGTTCTCC TGGCCACTTC TGCATCGTGC AGGACGGCGA TCACTGCGCC
      241  GCCTGTAGAG CCTACGCCAC ATCTAGCCCT GGCCAGAGAG TGCAGAAGGG CGGCACCGAG

```

5 301 AGCCAGGATA CCCTGTGCCA GAATTGCCCT CCCGGCACCT TCAGCCCCAA CGGCACACTG
 361 GAAGAGTGCC AGCACCAGAC CAAGTGACAGC TGGCTCGTGA CCAAAGCCGG CGCTGGCACA
 421 AGCAGCTCTC ACTGGGTGTG GTGGTTTCTG AGCGGCAGCC TCGTGATCGT GATTGTGTGC
 481 AGCACCGTGG GCCTGATCAT CTGCGTGAAG CGGAGAAAGC CCAGAGGCCA CGTCGTGAAA
 541 GTGATCGTGT CCGTGACAGC GAAGCGGCAG GAAGCCGAAG GCGAGGCCAC AGTGATTGAG
 601 GCCCTGCAGG CTCCTCCCTGA CGTGACAACA GTGGCCGTGG AAGAGACAAT CCCCAGCTTC
 661 ACCGGCAGAT CCCCCAACCA C

10 SEQ ID NO. 5

Аминокислотная последовательность HVEM яванского макака (эталонная последовательность NCBI: XP_005545061.1; а.к. 1-280)

15 1 MEPPGGWGSP PRRPAPKADI LTLVLYLTFL GSPCYAPALP SCKEDEYPVG SECCPKCGPG
 61 FHVRQACGEQ TGTVCEPCSP GTYIAHFNGL SKCLQCMCD PAMGLRTSRN CSTTANALCG
 121 CSPGHFCIIQ DGDHCAACRA YATSSPGQRV QKGGTESQDT LCQNCPPGTF SSNGTLEECQ
 181 HGTKCSKWLV TEAGPGTSSF RWVWLLSGT LIVIIVGLIL GLIYVKRRKS RGDVVKVIVS
 241 VQRKRQEAEG EAIIVTEALQA PPDITTVAVE ETEPAFTGRS

20 SEQ ID NO. 6

последовательность кДНК, кодирующая белок HVEM яванского макака (оптимизированная для экспрессии у млекопитающих)

25 1 ATGGAGCCTC CAGGCGGATG GGGATCTCCC CCAAGAAGGC CTGCCCCCAA GGCCGATATC
 61 CTGACCCTGG TGCTGTACCT GACCTTCCTG GGCAGCCCTT GTTACGCCCC TGCCCTGCCT
 121 AGCTGCAAAG AGGACGAGTA CCCTGTGGGC AGCGAGTGCT GCCCTAAGTG CGGCCCTGGA
 181 TTTTCATGTGC GGCAGGCCTG TGGCGAGCAG ACCGGCACAG TGTGCGAGCC TTGTAGCCCC
 241 GGCACSTATA TCGCCCACTT CAACGGCCTG AGCAAGTGCC TGCAGTGCCA GATGTGCGAC
 30 301 CCCGSTATGG GCCTGCGGAC CAGCAGAAAT TGCAGCACCA CCGCCAATGC CCTGTGCGGC
 361 TGTTCTCCTG GCCACTTCTG CATTATTTCAG GACGGCGACC ACTGCGCCGC CTGCAGAGCC
 421 TATGCCACAT CTAGCCCTGG CCAGCGGGTG CAGAAGGGCG GAACAGAGTC TCAGGACACC
 481 CTGTGCCAGA ACTGCCCCC TGGCACCTTC AGCAGCAACG GCACCCTGGA AGAGTGCCAG
 541 CACGGCACCA AGTGACGCAA GTGGCTCGTG ACAGAGGCCG GACCTGGCAC CAGCAGCTTC
 35 601 AGATGGGTGT GGTGGCTGCT GAGCGGCACA CTGATCGTGA TCATCGTGGG CCTGATCCTG
 661 GGA CTGATCT ACGTGAAGCG GCGGAAGTCC AGAGGCGACG TCGTGAAAGT GATCGTGTCC
 721 GTGCAGCGGA AGAGACAGGA AGCCGAGGGC GAGGCCATTG TGACCGAAGC CCTGCAGGCC
 781 CCTCCCGACA TTACAACCGT GGCCGTGGAA GAAACCGAGC CCGCCTTTAC CGGCAGATCC

40 SEQ ID NO. 7

Праймер ПЦР

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTG

45 SEQ ID NO. 8

Праймер ПЦР

ATGGATTTWCAGGTGCAGATTWTCAGCTTC

5 SEQ ID NO. 9**Праймер ПЦР**

ATGGGCWTCAAAGATGGAGTCACA

10

SEQ ID NO. 10**Праймер ПЦР**

ACTGGATGGTGGGAAGATGG

15

SEQ ID NO. 11**Праймер ПЦР**

20 ATGAAATGCAGCTGGGGCATSTTCTTC

SEQ ID NO. 12**Праймер ПЦР**

25

ATGRACTTTGGGYTCAGCTTGRTTT

SEQ ID NO. 13**30 Праймер ПЦР**

ATGGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCTT

SEQ ID NO. 14**35 Праймер ПЦР**

ATGGCTTGTCYTTRGSGCTRCTCTTCTGC

40 SEQ ID NO. 15**Праймер ПЦР**

CAGTGGATAGACAGATGGGGG

SEQ ID NO. 16

Консенсусная аминокислотная последовательность варибельной области
тяжелой цепи мышиноного антитела 36H12 против HVEM человека

1 EVQLQQSGAG LVKPGASVKL SCTASGFNIK DTYMHWVRQR PEQGLEWIGR IDPATANTKY
61 DPKFQGKATL TTDTSNTAY LQLSSLTSED TAVYYCVTYG YDVSWFAYWG LGALVTVSA

SEQ ID NO. 17

Консенсусная аминокислотная последовательность варибельной области
легкой цепи мышиноного антитела 36H12 против HVEM человека

1 DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV HSNGITYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVS NRF
61 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHPV LTFGAGTKLE LK

**Области, определяющие комплементарность (CDR) мышиноного антитела
36H12 против HVEM человека: SEQ ID NO. 18-23**

SEQ ID NO. 18

Аминокислотная последовательность CDR1 тяжелой цепи 36H12

DTYMH

SEQ ID NO. 19

Аминокислотная последовательность CDR2 тяжелой цепи 36H12

RIDPATANTKYDPKFQG

SEQ ID NO. 20

Аминокислотная последовательность CDR3 тяжелой цепи 36H12

YGYDVSWFAY

SEQ ID NO. 21

Аминокислотная последовательность CDR1 легкой цепи 36H12

RSSQSIVHSNGITYLE

SEQ ID NO. 22

Аминокислотная последовательность CDR2 легкой цепи 36H12

KVSNRFS

5

SEQ ID NO. 23

Аминокислотная последовательность CDR3 легкой цепи 36H12

FQGS HVPLT

10

SEQ ID NO. 24

Консенсусная аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи мышиноного антитела 45H6 против HVEM человека

1 DVQLVESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PEKGLEWVAY ISSGNSNIYY
 61 VDTVKGRTTI SRDNPKNLTF LQMTSLRSED TAMYYCARKR AYGDYSGFSM DYWGQGTSVT
 121 VSS

15

20

SEQ ID NO. 25

Консенсусная аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи мышиноного антитела 45H6 против HVEM человека

1 DIVMTQSQKF MSTSVGDRVS VTCKASQNV D TNVAWYQQK GQSPKALIYS ASYRYSQVDP
 61 RFTGSGSGTD FTLTISNVQS EDLAEYFCQQ YNKFPLTFGG GTKLEIK

25

30

Области, определяющие комплементарность (CDR) мышиноного антитела 45H6 против HVEM человека:

SEQ ID NO. 26-31

35

SEQ ID NO. 26

Аминокислотная последовательность CDR1 тяжелой цепи 45H6

SFGMH

SEQ ID NO. 27

40

Аминокислотная последовательность CDR2 тяжелой цепи 45H6

YISSGNSNIYYVDTVKG

SEQ ID NO. 28

Аминокислотная последовательность CDR3 тяжелой цепи 45H6

KRAYGDYSGFSMDY

5

SEQ ID NO. 29

Аминокислотная последовательность CDR1 легкой цепи 45H6

KASQNVDTNVA

10

SEQ ID NO. 30

Аминокислотная последовательность CDR2 легкой цепи 45H6

SASYRYS

15

SEQ ID NO. 31

Аминокислотная последовательность CDR3 легкой цепи 45H6

QQYNKFPLT

20

25

SEQ ID NO. 32

Консенсусная аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи мышинового антитела 48H6 против HVEM человека

1 EVKLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS GYAMSWVRQT PEKRLWVAS ISSGGSTYYP
 61 DSVKGRFTIP RDDARNILYL QMSSLRSEDY AIYYCARGGH GSSYVYWGQG TLTIVSS

30

SEQ ID NO. 33

Консенсусная аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи мышинового антитела 48H6 против HVEM человека

1 DIVMSQSPSS LAVSVGEKVT MSCKSSQSLL YSSNQKNYLA WYQQKPGQSP KLLIYWASTR
 61 ESGVPDRFTG SGSGTDFTLT ISSVKAEDLA VYYCHQYYSY PLTFGAGTKL ELN

40

Области, определяющие комплементарность (CDR) мышинового антитела 48H6 против HVEM человека:

SEQ ID NO. 34-39

SEQ ID NO. 34

Аминокислотная последовательность CDR1 тяжелой цепи 48H6

5 GYAMS

SEQ ID NO. 35

Аминокислотная последовательность CDR2 тяжелой цепи 48H6

10
SISSGGSTYYPDVKG

SEQ ID NO. 36

15 Аминокислотная последовательность CDR3 тяжелой цепи 48H6

GGHGSSYVY

SEQ ID NO. 37

Аминокислотная последовательность CDR1 легкой цепи 48H6

20
KSSQSLLYSSNQKNYLA

SEQ ID NO. 38

25 Аминокислотная последовательность CDR2 легкой цепи 48H6

WASTRES

30 SEQ ID NO. 39

Аминокислотная последовательность CDR3 легкой цепи 48H6

HQYYSYPLT

35

SEQ ID NO. 40

Консенсусная аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи мышинового антитела 11H7 против HVEM человека

40
1 QVQLKQSGPG LVQPSQSLSI TCTVSGFSLT IYGVHWVRQS PGKGLEWLGV IWSGGSTDYN
61 AAFISRLSIS KDNSKSQVFF KMNSLQANDT AIYYCARRDY GSRSFYYAMD YWGQGTSTVTV
121 SS

SEQ ID NO: 41

Консенсусная аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи мышинового антитела 11H7 против HVEM человека

5

1 EIVLTQSPAL MAASPGEKVT ITCSVSSSIS SSNLHWYQQK SETSPKPWIY GTSNLAGVP
61 VRFSGSGSGT SYSLTISSME AEDAATYYCQ QWSSYPLTFG GGTKLEIK

Области, определяющие комплементарность (CDR) мышинового антитела 11H7 против HVEM человека:

10

SEQ ID NO. 42-47

SEQ ID NO. 42

Аминокислотная последовательность CDR1 тяжелой цепи 11H7

15

IYGVH

SEQ ID NO. 43

20

Аминокислотная последовательность CDR2 тяжелой цепи 11H7

VIWSGGSTDYNAAFIS

25

SEQ ID NO. 44

Аминокислотная последовательность CDR3 тяжелой цепи 11H7

RDYGSRSFYAMDY

30

SEQ ID NO. 45

Аминокислотная последовательность CDR1 легкой цепи 11H7

SVSSSISSNLH

35

SEQ ID NO. 46

Аминокислотная последовательность CDR2 легкой цепи 11H7

40

GTSNLAG

SEQ ID NO. 47

Аминокислотная последовательность CDR3 легкой цепи 11H7

QQWSSYPLT

SEQ ID NO. 48

- 5 Консенсусная аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи мышинового антитела 49G4 против HVEM человека

1 EVQLQQSGAE LVKPGASVKL SCRASGFNIK DTYMHWVKQR PEQGLEWIGR IDPARGNTKY
61 DPKFQGKATI TADTSSNTAY LQLSSLTSED TAVYYCASAM DYWGQGTSVT VSS

10

SEQ ID NO. 49

- Консенсусная аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи мышинового антитела 49G4 против HVEM человека

15 1 DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV HSNNGNTYLEW FLQKPGQSPK LLIYKVSNRF
61 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHVP LTFGAGTKLE LK

- 20 **Области, определяющие комплементарность (CDR) мышинового антитела 49G4 против HVEM человека:**
SEQ ID NO. 50-55

SEQ ID NO. 50

- 25 Аминокислотная последовательность CDR1 тяжелой цепи 49G4

DTYMH

- 30 SEQ ID NO. 51

Аминокислотная последовательность CDR2 тяжелой цепи 49G4

RIDPARGNTKYDPKFQG

35

SEQ ID NO. 52

Аминокислотная последовательность CDR3 тяжелой цепи 49G4

AMDY

40

SEQ ID NO. 53

Аминокислотная последовательность CDR1 легкой цепи 49G4

RSSQSIVHSNNGNTYLE

SEQ ID NO. 54

Аминокислотная последовательность CDR2 легкой цепи 49G4

5

KVSNRFS

SEQ ID NO. 55

Аминокислотная последовательность CDR3 легкой цепи 49G4

10

FQGS HVPLT

15 SEQ ID NO. 56

Последовательность кДНК, кодирующая химерную VH 36H12 мыши и константную область тяжелой цепи IgG4 человека

20 1 ATGGAGCTGG GCCTGAGCTG GATTTTTCTG CTGGCCATCC TGAAGGGCGT GCAGTGCGAA
61 GTTCAGCTGC AGCAATCTGG CGCCGGA CTG GTTAAGCCTG GCGCCTCTGT GAAGCTGAGC
121 TGTACCGCCA GCGGCTTCAA CATCAAGGAC ACCTACATGC ACTGGGTCCG ACAGAGGCCT
181 GAGCAGGGAC TCGAATGGAT CGGCAGAATC GATCCCGCCA CCGCCAACAC CAAATACGAC
241 CCCAAGTTCC AGGGCAAAGC CACACTGACC ACCGACACCA GCAGCAACAC AGCCTACCTG
301 CAGCTGTCTA GCCTGACCAG CGAAGATACC GCCGTGTA CTGCTGCTGAC CTACGGCTAC
25 361 GATGTGTCTT GGTTCGCTTA CTGGGGACTG GCGGCCCTGG TTACAGTTTC TGCCGCCTCT
421 ACAAAGGGCC CCAGCGTTTT CCCACTGGCT CCCTGTAGCA GAAGCACCAG CGAATCTACA
481 GCCGCTCTGG GCTGCCTGGT CAAGGACTAC TTTCCTGAGC CTGTGACCGT GTCCTGGAAC
541 TCTGGCGCTC TGACATCTGG CGTGACACACC TTTCAGCCG TGCTGCAAAG CAGCGGCCCTG
601 TACTCTCTGA GCAGCGTGGT CACAGTGCCT AGCTCTAGCC TGGGCACCAA GACCTACACC
30 661 TGTAATGTGG ACCACAAGCC TAGCAACACC AAGGTGGACA AGCGCGTGGA ATCTAAGTAC
721 GGCCCTCCTT GTCCTCCATG TCCTGCACCT GAGTTTCTCG GCGGACCCTC CGTGTTCTCTG
781 TTTCCTCCAA AGCCTAAGGA CACCCTGATG ATCAGCAGAA CCCCTGAAGT GACCTGCGTG
841 GTGGTGGACG TTTCCTAAGA GGACCCTGAG GTGCAGTTCA ATTGGTACGT GGACGGCGTG
901 GAAGTGCACA ACGCCAAGAC CAAGCCTAGA GAGGAACAGT TCAACAGCAC CTACAGAGTG
35 961 GTGTCCGTGC TGACAGTGCT GCACCAGGAT TGGCTGAACG GCAAAGAGTA CAAGTGCAAG
1021 GTGTCCAACA AGGGCCTGCC TAGCAGCATC GAGAAAACCA TCAGCAAGGC CAAGGGCCAG
1081 CCAAGAGAAC CCCAGGTGTA CACACTGCCT CCAAGCCAAG AGGAAATGAC CAAGAACCAG
1141 GTGTCCCTGA CCTGCCTCGT GAAGGGCTTC TACCCTTCCG ATATCGCCGT GGAATGGGAG
1201 AGCAATGGCC AGCCTGAGAA CAACTACAAG ACAACCCCTC CTGTGCTGGA CAGCGACGGC
40 1261 TCATTCTTCC TGTACAGCAG ACTGACCGTG GACAAGAGCA GATGGCAAGA GGGCAACGTG
1321 TTCTCCTGCA GCGTGATGCA CGAGGCCCTG CACAACCACT ACACCCAGAA GTCTCTGTCC
1381 CTGTCTCTGG GCAAG

45

SEQ ID NO. 57

Последовательность кДНК, кодирующая химерную VH 45H6 мыши и константную область тяжелой цепи IgG4 человека

```

1  ATGGAGCTGG GCCTGAGCTG GATTTTTCTG CTGGCCATCC TGAAGGGCGT GCAGTGTGAT
61  GTGCAGCTGG TGGAATCTGG CGGAGGACTG GTTCAACCTG GCGGCAGCAG AAAGCTGTCT
5  121  TGTGCCGCCA GCGGCTTCAC CTTCAGCAGC TTTGGAATGC ACTGGGTCCG ACAGGCCCTT
181  GAGAAAGGCC TTGAGTGGGT CGCCTACATC AGCAGCGGCA ACAGCAACAT CТАCTACGTG
241  GACACCGTGA AGGGCAGATT CACCATCTCC AGAGACAACC CCAAGAATAC CCTGTTCTTG
301  CAGATGACCA GCCTGCGGAG CGAGGATACC GCCATGТАCT ACTGCGCCCCG GAAAAGAGCC
361  TACGGCGACT ACAGCGGCTT TAGCATGGAT TACTGGGGCC AGGGCACCAG CGTGACAGTG
10  421  TCTAGCGCCT CTACAAAGGG CCCTAGCGTG TTCCCTCTGG CTCCTTGТАG CAGAAGCACC
481  AGCGAGTCTA CAGCCGCTCT GGGCTGTCTG GTCAAGGACT ACTTTCCCGA GCCTGTGACC
541  GTGTCCTGGA ATTCTGGCGC TCTGACAAGC GCGGTGCACA CCTTTCAGC TGTGCTGCAA
601  AGCAGCGGCC TGTACTCTCT GAGCAGCGTG GTCACAGTGC CTAGCTCTAG CCTGGGCACC
661  AAGACCTACA CCTGТАATGT GGACCACAAG CCTAGCAACA CCAAGGTGGA CAAGCGCGTG
15  721  GAATCTAAGT ACGGCCCTCC TTGTCCTCCA TGTCTTGCTC CAGAGTTTCT CGGCGGACCC
781  TCCGTGTTCC TGTTTCCTCC AAAGCCTAAG GACACCCTGA TGATCAGCAG AACCCCTGAA
841  GTGACCTGCG TGGTGGTGGA CGTTTCCCAA GAGGACCCTG AGGTGCAGTT CAATTGGTAC
901  GTGGACGGCG TGGAAGTGCA CAACGCCAAG ACCAAGCCTA GAGAGGAACA GTTCAACAGC
961  ACCTACAGAG TGGTGTCCGT GCTGACCGTG CTGCACCAGG ATTGGCTGAA CGGCAAAGAG
20  1021  TACAAGTGCA AGGTGTCCAA CAAGGGCCTG CCTAGCAGCA TCGAGAAAAC CATCAGCAAG
1081  GCCAAGGGCC AGCCAAGAGA ACCCCAGGTG TACACACTGC CTCCAAGCCA AGAGGAAATG
1141  ACCAAGAACC AGGTGTCCCT GACCTGCCTG GTTAAGGGCT TCTACCCCTC CGATATCGCC
1201  GTGGAATGGG AGAGCAATGG CCAGCCTGAG AACAАCTACA AGACCACACC ACCTGTGCTG
1261  GACAGCGACG GCTCATTCTT CCTGTACAGC AGACTGACCG TGGACAAGAG CAGATGGCAA
25  1321  GAGGGCAACG TGTTCACTG CAGCGTGATG CACGAGGCCC TGCACAACCA CTACACCCAG
1381  AAGTCTCTGA GCCTGTCTCT GGGCAAG

```

30 SEQ ID NO. 58

Последовательность кДНК, кодирующая химерную VH 48H6 мыши и константную область тяжелой цепи IgG4 человека

```

1  ATGGAGCTGG GCCTGAGCTG GATTTTTCTG CTGGCCATCC TGAAGGGCGT GCAGTGCГАА
35  61  GTGAAGCTGG TGGAATCTGG CGGCGGACTG GTTAAGCCTG GCGGATCTCT GAAGCTGAGC
121  TGTGCCGCCA GCGGCTTTAC CTTTAGCGGC TACGCCATGA GCTGGGTCCG ACAGACACCC
181  GAGAAGAGAC TGGAATGGGT CGCCAGCATC AGCAGCGGCG GCAGCACATA TTACCCCGAC
241  TCTGTGAAGG GCCGCTTTAC AATCCCАGA GATGACGCCC GGAACATCCT GTACCTGCAG
301  ATGAGCAGCC TGCGGAGCGA GGATACCGCC ATCTACTATT GTGCCAGAGG CGGCCACGGC
40  361  AGCAGCTATG TTTATTGGGG CCAGGGCACC ACACTGACCG TGTCTAGCGC CTCTACAAAG
421  GGCCCTAGCG TGTTCCCTCT GGCTCCTTGT AGCAGAAGCA CCAGCGAGTC TACAGCCGCT
481  CTGGGCTGTC TGGTCAAGGA CТАCTTTCCC GAGCCTGTGA CAGTGTCTTG GAACTCTGGC
541  GCTCTGACAA GCGGCGTGCA CACATTTCCA GCCGTGCTGC AAAGCAGCGG CCTGTACTCT
601  CTGAGCAGCG TGGTCACAGT GCCTAGCTCT AGCCTGGGCA CCAAGACCTA CACCTGТАAT
45  661  GTGGACCACA AGCCTAGCAA CACCAAGGTG GACAAGCGCG TGGAATCTAA GTACGGCCCT
721  CCTTGTCCTC CATGTCCTGC ACCTGAGTTT CTCGGCGGAC CCTCCGTGTT CCTGTTCTCT
781  CCAAGCCTA AGGACACCCT GATGATCAGC AGAACCCTG AAGTGACCTG CGTGGTGGTG
841  GACGTTTCCC AAGAGGACCC TGAGGTGCAG TTCAATTGGT ACGTGACGG CGTGGAGTG
901  CACAACGCCA AGACCAAGCC TAGAGAGGAA CAGTTCAACA GCACCTACAG AGTGGTGTCC

```

961 GTGCTGACAG TGCTGCACCA GGATTGGCTG AACGGCAAAG AGTACAAGTG CAAGGTGTCC
 1021 AACAAAGGGCC TGCCTAGCAG CATCGAGAAA ACCATCAGCA AGGCCAAGGG CCAGCCAAGA
 1081 GAACCCAGG TGTACACACT GCCTCCAAGC CAAGAGGAAA TGACCAAGAA CCAGGTGTCC
 1141 CTGACCTGCC TCGTGAAGGG CTTCTACCCT TCCGATATCG CCGTGGAATG GGAGAGCAAT
 5 1201 GGCCAGCCTG AGAACAAC TAAGACAACC CCTCCTGTGC TGGACAGCGA CGGCTCATTC
 1261 TTCCTGTACA GCAGGCTGAC CGTGGACAAG AGCAGATGGC AAGAGGGCAA CGTGTTCAGC
 1321 TGCAGCGTGA TGCACGAGGC CCTGCACAAC CACTACACCC AGAAGTCTCT GAGCCTGTCT
 1381 CTGGGCAAG

10 SEQ ID NO. 59

Последовательность кДНК, кодирующая химерную VH 11H7 мыши и константную область тяжелой цепи IgG4 человека

15 1 ATGGAGCTGG GCCTGAGCTG GATTTTTCTG CTGGCCATCC TGAAGGGCGT GCAGTGTGAG
 61 GTGCAGCTGA AGCAGTCTGG ACCTGGACTG GTGCAGCCTA GCCAGAGCCT GAGCATCACC
 121 TGTACCGTGT CCGGCTTCAG CCTGACCATC TATGGCGTGC ACTGGGTCCG ACAGAGCCCT
 181 GGCAAAGGAC TGAATGGCT GGGAGTGATT TGGAGCGGCG GCAGACCCGA TTACAACGCC
 241 GCCTTTATCA GCAGACTGAG CATCTCCAAG GACAACAGCA AGAGCCAGGT GTTCTTCAAG
 301 ATGAACCTCC TGCAGGCCAA CGACACCGCC ATCTACTACT GCGCCAGAAG AGACTACGGC
 20 361 AGCCGGTCCT TCTACTACGC TATGGACTAT TGGGGCCAGG GCACCAGCGT GACAGTGTCT
 421 AGCGCCTCTA CAAAGGGCCC TAGCGTGTTC CCTCTGGCTC CTTGTAGCAG AAGCACCAGC
 481 GAGTCTACAG CCGCTCTGGG CTGTCTGGTC AAGGACTACT TTCCCAGGCC AGTGACCGTG
 541 TCCTGGAATT CTGGCGCTCT GACAAGCGGC GTGCACACCT TTCCAGCTGT GCTGCAAAGC
 601 AGCGGCCTGT ACTCTCTGAG CAGCGTGCTC ACAGTGCCTA GCTCTAGCCT GGGCACCAG
 25 661 ACCTACACCT GTAATGTGGA CCACAAGCCT AGCAACACCA AGGTGGACAA GCGCGTGGAA
 721 TCTAAGTACG GCCCTCCTTG TCCTCCATGT CCTGCTCCAG AGTTTCTCGG CGGACCTCC
 781 GTGTTCTCTGT TTCCTCCAAA GCCTAAGGAC ACCCTGATGA TCAGCAGAAC CCCTGAAAGT
 841 ACCTGCGTGG TGGTGGACGT TTCCCAAGAG GACCCTGAGG TGCAATTCAA TTGGTACGTG
 901 GACGGCGTGG AAGTGCACAA CGCCAAGACC AAGCCTAGAG AGGAACAGTT CAACAGCACC
 30 961 TACAGAGTGG TGTCCGTGCT GACCGTGCTG CATCAGGATT GGCTGAACGG CAAAGAGTAC
 1021 AAGTGCAAGG TGTCCAACAA GGGCCTGCCT AGCAGCATCG AGAAAACCAT CAGCAAGGCC
 1081 AAGGGCCAGC CAAGAGAACC CCAGGTGTAC ACACTGCCTC CAAGCCAAGA GGAAATGACC
 1141 AAGAATCAGG TGTCCCTGAC CTGCCTCGTG AAGGGCTTCT ACCCTTCCGA TATCGCCGTG
 1201 GAATGGGAGA GCAATGGCCA GCCTGAGAAC AACTACAAGA CAACCCCTCC TGTGCTGGAC
 35 1261 AGCGACGGCT CATCTCTCCT GTACTCCAGA CTGACCGTGG ACAAGAGCAG ATGGCAAGAG
 1321 GGCAACGTGT TCAGCTGCTC CGTGATGCAC GAGGCCCTGC ACAACCACTA CACCCAGAAG
 1381 TCCCTGAGCC TGTCTCTGGG CAAA

40 SEQ ID NO. 60

Последовательность кДНК, кодирующая химерную VH 49G4 мыши и константную область тяжелой цепи IgG4 человека

45 1 ATGGAGCTGG GCCTGAGCTG GATTTTTCTG CTGGCCATCC TGAAGGGCGT GCAGTGCAG
 61 GTTCAGCTGC AGCAGTCTGG CGCCGAGCTT GTGAAACCTG GCGCCTCTGT GAAGCTGAGC
 121 TGTAGAGCCA GCGGCTTCAA CATCAAGGAC ACCTACATGC ACTGGGTCAA GCAGAGGCCCT
 181 GAGCAGGGCC TCGAATGGAT CGGCAGAATC GATCCCGCCA GAGGCAACAC CAAATACGAC
 241 CCCAAGTTCC AGGGCAAAGC CACCATCACC GCCGACACCT CTAGCAACAC AGCCTACCTG

5 301 CAGCTGTCCA GCCTGACCTC TGAAGATACC GCCGTGTA CT ACTGCGCCAG CGCTATGGAT
 361 TATTGGGGCC AGGGCACAAG CGTGACCGTG TCTAGCGCCT CTACAAAGGG CCCTAGCGTG
 421 TTCCCACTGG CTCCCTGTAG CAGAAGCACC AGCGAATCTA CAGCCGCTCT GGGCTGCCTG
 481 GTCAAGGACT ACTTTCCTGA GCCTGTGACA GTGTCCTGGA ACTCTGGCGC TCTGACAAGC
 541 GGC GTGCACA CATTTCCAGC CGTGCTGCAA AGCAGCGGCC TGTA CTCTCT GAGCAGCGTG
 601 GTCACAGTGC CTAGCTCTAG CCTGGGCACC AAGACCTACA CCTGTAATGT GGACCACAAG
 661 CCTTCCAACA CCAAGGTGGA CAAGCGCGTG GAATCTAAGT ACGGCCCTCC TTGTCCTCCA
 721 TGTCTGTGAC CTGAGTTTCT CGGCGGACCC TCCGTGTTCC TGTTTCCTCC AAAGCCTAAG
 781 GACACCCTGA TGATCAGCAG AACCCTGAA GTGACCTGCG TGGTGGTGGA CGTTTCCCAA
 10 841 GAGGACCCTG AGGTGCAGTT CAATTGGTAC GTGGACGGCG TGGAAGTGCA CAACGCCAAG
 901 ACCAAGCCTA GAGAGGAACA GTTCAACAGC ACCTACAGAG TGGTGTCCGT GCTGACAGTG
 961 CTGCAACAGG ATTTGGCTGAA CGGCAAAGAG TACAAGTGCA AGGTGTCCAA CAAGGGCCTG
 1021 CCTAGCAGCA TCGAGAAAAC CATCAGCAAG GCCAAGGGCC AGCCAAGAGA ACCCCAGGTG
 1081 TACACACTGC CTCCAAGCCA AGAGGAAATG ACCAAGAACC AGGTGTCCCT GACCTGCCTC
 15 1141 GTGAAGGGCT TCTACCCTTC CGATATCGCC GTGGAATGGG AGAGCAATGG CCAGCCTGAG
 1201 AACAACTACA AGACAACCCC TCCTGTGCTG GACTCCGACG GCTCATTTCTT CCTGTACAGC
 1261 AGACTGACCG TGGACAAGAG CAGATGGCAA GAGGGCAACG TGTTCTCCTG CAGCGTGATG
 1321 CACGAAGCCC TGCACAACCA CTACACCCAG AAGTCTCTGT CCCTGTCTCT GGGCAAG

20

SEQ ID NO. 61

последовательность кДНК, кодирующая химерную VL 36H12 мыши и константную легкую каппа-цепь человека

25 1 ATGGACATGA GAGTTCCCGC TCAGCTGCTG GGA CTGCTGC TGCTTTGGTT TCCTGGCGCT
 61 AGATGCGACG TGCTGATGAC CCAGACACCT CTGAGCCTGC CTGTGTCTCT GGGAGATCAG
 121 GCCAGCATCA GCTGCAGATC CAGCCAGAGC ATCGTGACACA GCAACGGCAT CACCTACCTG
 181 GAATGGTATC TGCAGAAGCC CGGACAGAGC CCCAAGCTGC TGATCTACAA GGTGTCCAAC
 241 CGGTTCAGCG GCGTGCCCGA TAGATTTTCT GGCAGCGGCT CTGGCACCGA CTTCAACCTG
 30 301 AAGATCTCCA GAGTGGAAGC CGAGGACCTG GCGGTGTA CT ACTGCTTCCA AGGCTCTCAC
 361 GTGCCCCCTGA CATTTGGAGC CGGCACCAAG CTGGA ACTGA AGAGAACAGT GGCCGCTCCT
 421 AGCGTGTTCA TCTTCCACCC TTCCGACGAG CAGCTGAAAA GCGGCACAGC CTCTGTCTGT
 481 TGCCTGCTGA ACAACTTCTA CCCCAGAGAA GCCAAGGTGC AGTGGAAGGT GGACAACGCC
 541 CTGCAGAGCG GCAATAGCCA AGAGAGCGTG ACCGAGCAGG ACAGCAAGGA CTCTACCTAC
 35 601 AGCCTGAGCA GCACCCTGAC ACTGAGCAAG GCCGACTACG AGAAGCACAA AGTGTACGCC
 661 TGCGAAGTGA CCCACCAGGG CTTTCTAGC CCTGTGACCA AGAGCTTCAA CCGGGGCGAA
 721 TGT

40

SEQ ID NO. 62

последовательность кДНК, кодирующая химерную VL 45H6 мыши и константную легкую каппа-цепь человека

45 1 ATGGACATGA GAGTTCCCGC TCAGCTGCTG GGA CTGCTGC TGCTTTGGTT TCCTGGCGCT
 61 AGATGCGACA TCGTGATGAC CCAGAGCCAG AAATT CATGA GCACCAGCGT GGGCGACAGA
 121 GTGTCCGTGA CATGTAAAGC CAGCCAGAAC GTGGACACCA ACGTGGCCTG GTATCAGCAG
 181 AAGCCTGGAC AGAGCCCCAA GGCTCTGATC TACAGCGCCA GCTACAGATA CAGCGGCGTG

241 CCCGATAGAT TCACAGGCAG CGGCTCTGGC ACCGACTTCA CCCTGACAAAT CAGCAACGTG
 301 CAGAGCGAGG ACCTGGCCGA GTATTTCTGC CAGCAGTACA ACAAGTTCCC TCTGACCTTC
 361 GGCGGAGGCA CCAAGCTGGA AATCAAGAGA ACAGTGGCCG CTCCTAGCGT GTTCATCTTC
 421 CCACCTTCCG ACGAGCAGCT GAAAAGCGGC ACAGCCTCTG TCGTGTGCCT GCTGAACAAC
 5 481 TTCTACCCCA GAGAAGCCAA GGTGCAGTGG AAGGTGGACA ACGCCCTGCA GAGCGGCAAT
 541 AGCCAAGAGA GCGTGACCGA GCAGGACAGC AAGGACTCTA CCTACAGCCT GAGCAGCACA
 601 CTGACCCTGA GCAAGGCCGA CTACGAGAAG CACAAAGTGT ACGCCTGCGA AGTGACCCAC
 661 CAGGGCCTTT CTAGCCCTGT GACCAAGAGC TTCAACCGGG GCGAATGT

10 SEQ ID NO. 63

последовательность кДНК, кодирующая химерную VL 48H6 мыши и
 константную легкую каппа-цепь человека

15 1 ATGGACATGA GAGTTCCCGC TCAGCTGCTG GGA CTGCTGC TGCTTTGGTT TCCTGGCGCT
 61 AGATGCGACA TCGTGATGTC TCAGAGCCCT AGCAGCCTGG CCGTGTCTGT GGGAGAGAAA
 121 GTGACCATGA GCTGCAAGAG CAGCCAGAGC CTGCTGTA CT CCAGCAACCA GAAGAACTAC
 181 CTGGCCTGGT ATCAGCAGAA GCCCGGACAG TCTCCAAGC TGCTGATCTA CTGGGCCAGC
 241 ACCAGAGAAA GCGGCGTGCC CGATAGATT C ACAGGCAGCG GCAGCGGAAC C GACTTCACC
 301 CTGACAATCA GCAGCGTGAA GGCCGAGGAC CTGGCTGTGT ACTACTGCCA CCAGTATTAC
 20 361 AGCTACCCTC TGACCTTCGG AGCCGGCACC AAGCTGGAAC TGAACAGAAC AGTGGCCGCT
 421 CCTAGCGTGT TCATCTTCCC ACCTTCCGAC GAGCAGCTGA AGTCTGGCAC AGCCTCTGTC
 481 GTGTGCCTGC TGAACAAC TT CTACCCCA GAAGCCAAGG TGCAGTGGAA GGTGGACAAC
 541 GCCCTGCAGA GCGGCAATAG CCAAGAGAGC GTGACCGAGC AGGACAGCAA G GACTCTACC
 601 TACAGCCTGA GCAGCACA CT GACCCTGAGC AAGGCCGACT ACGAGAAGCA CAAAGTG TAC
 25 661 GCCTGCGAAG TGACCCACCA GGGCCTTTCT AGCCCTGTGA CCAAGAGCTT CAACCGGGGC
 721 GAATGT

SEQ ID NO. 64

последовательность кДНК, кодирующая химерную VL 11H7 мыши и
 константную легкую каппа-цепь человека

35 1 ATGGACATGA GAGTTCCCGC TCAGCTGCTG GGA CTGCTGC TGCTTTGGTT TCCTGGCGCT
 61 AGATGCGAGA TCGTGCTGAC ACAGAGCCCT GCTCTGATGG CTGCTTCCCC TGGCGAGAAA
 121 GTGACCATCA CCTGTAGCGT GTCCAGCAGC ATCAGCAGCT CCAACCTGCA CTGGTATCAG
 181 CAGAAGTCCG AGACAAGCCC CAAGCCTTGG ATCTACGGCA CCAGCAATCT GGCCAGCGGA
 241 GTGCCTGTCA GATTTTCTGG CAGCGGCTCT GGCACAGCT ACAGCCTGAC AATCAGCAGC
 301 ATGGAAGCCG AGGATGCCGC CACCTACTAC TGCCAGCAGT GGTCTAGCTA CCTCTGACC
 361 TTTGGCGGAG GCACCAAGCT GGAAATCAAG CGGACAGTGG CCGCTCCTAG CGTGTTCATC
 421 TTTCCACCTA GCGACGAGCA GCTGAAGTCT GGCACAGCCT CTGTCTGTGT CCTGCTGAAC
 40 481 AACTTCTACC CCAGAGAAGC CAAGGTGCAG TGGAAGGTGG ACAACGCCCT GCAGAGCGGC
 541 AATAGCCAAG AGAGCGTGAC CGAGCAGGAC AGCAAGGACT CCACCTATAG CCTGAGCAGC
 601 ACCCTGACAC TGAGCAAGGC CGACTACGAG AAGCACAAAG TGTACGCCTG CGAAGTGACC
 661 CACCAGGGCC TTTCTAGCCC TGTGACCAAG AGCTTCAACC GGGGCGAATG T

45

SEQ ID NO. 65

последовательность кДНК, кодирующая химерную VL мыши и 11H7 и
 константную легкую каппа-цепь 49G4 человека

1 ATGGACATGA GAGTTCCCGC TCAGCTGCTG GGA CTGCTGC TGCTTTGGTT TCCTGGCGCT
 61 AGATGCGACG TGCTGATGAC CCAGACACCT CTGAGCCTGC CTGTGTCTCT GGGAGATCAG
 121 GCCAGCATCA GCTGCAGATC CAGCCAGAGC ATCGTGACACA GCAACGGCAA TACCTACCTG
 181 GAATGGTTCC TGCAGAAGCC CGGACAGAGC CCCAAGCTGC TGATCTACAA GGTGTCCAAC
 5 241 CGGTTTCAGCG GCGTGCCCGA TAGATTTTCT GGCAGCGGCT CTGGCACCGA CTTCACCTG
 301 AAGATCTCCA GAGTGGAAGC CGAGGACCTG GCGGTGTACT ACTGCTTCCA AGGCTCTCAC
 361 GTGCCCCTGA CATTTGGAGC CGGCACCAAG CTGGAAGTGA AGAGAACAGT GGCCGCTCCT
 421 AGCGTGTTCA TCTTCCACC TTCCGACGAG CAGCTGAAAA GCGGCACAGC CTCTGTCTGTG
 481 TGCCTGCTGA ACAACTTCTA CCCCAGAGAA GCCAAGGTGC AGTGGAAGGT GGACAACGCC
 10 541 CTGCAGAGCG GCAATAGCCA AGAGAGCGTG ACCGAGCAGG ACAGCAAGGA CTCTACCTAC
 601 AGCCTGAGCA GCACCCTGAC ACTGAGCAAG GCCGACTACG AGAAGCACAA AGTGACGCC
 661 TCGGAAGTGA CCCACCAGGG CCTTTCTAGC CCTGTGACCA AGAGCTTCAA CCGGGGCGAA
 721 TGT

15

SEQ ID NO. 66

Аминокислотная последовательность химерной VH 36H12 мыши и константной области тяжелой цепи IgG4 человека

1 MELGLSWIFL LAILKGVQCE VQLQQSGAGL VKPGASVKLS CTASGFNIKD TYMHWVRQRP
 20 61 EQGLEWIGRI DPATANTKYD PKFQGKATLT TDTSSNTAYL QLSSLTSEDV AVYYCVTYGY
 121 DVSWFAYWGL GALVTVSAAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN
 181 SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGKTYT CNVDHKPSNT KVDKRVESKY
 241 GPPCPPCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSDQEDPE VQFNWYVDGV
 301 EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ
 25 361 PREPQVYTL PPSQEEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG
 421 SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSL LSLGK

SEQ ID NO. 67

Аминокислотная последовательность химерной VH 45H6 мыши и константной области тяжелой цепи IgG4 человека

1 MELGLSWIFL LAILKGVQCD VQLVESGGGL VQPGGSRKLS CAASGFTFSS FGMHWVRQAP
 61 EKGLEWVAYI SSGNSNIYYV DTVKGRFTIS RDNPKNTLFL QMTSLRSEDV AMYYCARKRA
 121 YGDYSGFSMD YWGQGTSTVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT
 35 181 VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT KTYTCNVDHK PSNTKVDKRV
 241 ESKYGPPCPP CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLNISRTPE VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY
 301 VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK
 361 AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL
 421 DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSVMSV HEALHNHYTQ KSLSLSLGK

40

SEQ ID NO. 68

Аминокислотная последовательность химерной VH 48H6 мыши и константной области тяжелой цепи IgG4 человека

45

1 MELGLSWIFL LAILKGVQCE VKLVESGGGL VKPGGSLKLS CAASGFTFSG YAMSWVRQTP
 61 EKRLEWVASI SSGGSTYYPD SVKGRFTIPR DDARNILYLQ MSSLRSEDTA IYYCARGGHG
 121 SSVVYWGQGT TLTVSSASTK GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG
 181 ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS SLGTKTYTCN VDHKPSNTKV DKRVESKYGP
 5 241 PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV
 301 HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR
 361 EPQVYTLPPS QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF
 421 FLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLG LGK

10

SEQ ID NO. 69

Аминокислотная последовательность химерной VH 11H7 мыши и константной области тяжелой цепи IgG4 человека

15 1 MELGLSWIFL LAILKGVQCQ VQLKQSGPGL VQPSQSL SIT CTVSGFSLTI YGVHWVRQSP
 61 GKGLEWLGVI WSGGSTDYNA AFISRLSISK DNSKSQVFFK MNSLQANDTA IYYCARRDYG
 121 SRSFYAMDY WGQGTSVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVT
 181 SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTK TYTCNVDPHKP SNTKVDKRV
 241 SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV
 20 301 DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA
 361 KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD
 421 SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK

SEQ ID NO. 70

25 **Аминокислотная последовательность химерной VH 49G4 мыши и константной области тяжелой цепи IgG4 человека**

30 1 MELGLSWIFL LAILKGVQCE VQLQQSGAEL VKPGASVKLS CRASGFNIKD TYMHWVKQRP
 61 EQGLEWIGRI DPARGNTKYD PKFQKGATIT ADTSSNTAYL QLSSLTSEDV AVYYCASAMD
 121 YWGQGTSVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS
 181 GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPVSSSLGT KTYTCNVDPHK PSNTKVDKRV ESKYGPPCPP
 241 CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVDVSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK
 301 TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV
 361 YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS
 421 RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK

35

SEQ ID NO. 71

Аминокислотная последовательность химерной VL 36H12 мыши и константной легкой каппа-цепи человека

40 1 MDMRVPAQLL GLLLLWFPGA RCDVLMQTTP LSLPVSLGDQ ASISCRSSQS IVHSNGITYL
 61 EWYLQKPGQS PKLLIYKVSF RFGVPDRFS GSGSGTDFTL KISRVEAEDL GVYYCFQGS
 121 VPLTFGAGTK LELKRTVAAP SVFIFPPSDE QLKSGTASVV CLLNMFYPRE AKVQWKVDNA
 181 LQSGNSQESV TEQDSKDYT SLSSTLTLSK ADYEKHKVYA CEVTHQGLSS PVTKSFNRRGE
 241 C

45

SEQ ID NO. 72

Аминокислотная последовательность химерной VL 45H6 мыши и константной легкой каппа-цепи человека

5 1 MDMRVPAQLL GLLLLWFPGA RCDIVMTQSQ KFMSTSVGDR VSVTCKASQN VDTNVAWYQQ
61 KPGQSPKALI YSASYRYSV PDRFTGSGSG TDFTLTISNV QSEDLAEYFC QQYNKFPLTF
121 GGGTKLEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN
181 SQESVTEQDS KDSTYSLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC

SEQ ID NO. 73

10 **Аминокислотная последовательность химерной VL 48H6 мыши и константной легкой каппа-цепи человека**

15 1 MDMRVPAQLL GLLLLWFPGA RCDIVMSQSP SSLAVSVGEK VTMSCKSSQS LLYSSNQKNY
61 LAWYQQKPGQ SPKLLIYWAS TRESGVPDRF TGSGSGTDFT LTISSVKAED LAVYCHQYY
121 SYPLTFGAGT KLELNRTVAA PSVFIFPPSD EQLKSGTASV VCLLNNFYPR EAKVQWKVDN
181 ALQSGNSQES VTEQDSKDST YLSSTLTLS KADYEKHKVY ACEVTHQGLS SPVTKSFNRG
241 EC

20 **SEQ ID NO. 74**

Аминокислотная последовательность химерной VL 11H7 мыши и константной легкой каппа-цепи человека

25 1 MDMRVPAQLL GLLLLWFPGA RCEIVLTQSP ALMAASPGEK VTITCSVSSS ISSSNLHWYQ
61 QKSETSPKPW IYGTSNLASG VPVRFSGSGS GTSYSLTISS MEAEDAATYY CQQWSSYPLT
121 FGGGTKLEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG
181 NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC

SEQ ID NO. 75

30 **Аминокислотная последовательность химерной VL 49G4 мыши и константной легкой каппа-цепи человека**

35 1 MDMRVPAQLL GLLLLWFPGA RCDVIMTQTP LSLPVSLGDQ ASISCRSSQS IVHSNGNTYL
61 EWFLQKPGQS PKLLIYKVSNI RFSGVDPDRFS GSGSGTDFTL KISRVEAEDL GVYYCFQGS
121 VPLTFGAGTK LELKRTVAAP SVFIFPPSDE QLKSGTASVV CLLNNFYPRE AKVQWKVDNA
181 LQSGNSQESV TEQDSKDSTY SLSSTLTLSK ADYEKHKVYA CEVTHQGLSS PVTKSFN
241 C

SEQ ID NO. 76

40 **Аминокислотная последовательность scFv против мембраносвязанного CD3 человека (сигнальный пептид, за которым следует scFv ОКТ3, связанный с доменами CH2-CH3 IgG1 человека и цитоплазматическим хвостом CD80 человека)**

1 MKWVTFISLL FLFSAYSQV QLQQSGAELA RPGASVKMSC KASGYTFTRY TMHWVKQRP
61 QGLEWIGYIN PSRGYTNYNQ KFKDKATLTT DKSSSTAYMQ LSSLTSEDSA VYYCARYYDD

121 HYCLDYWGQG TTLTVSSGGG GSGGGGSGGG GSQIVLTQSP AIMSASPGEK VTMTCSASSS
 181 VSYMNWYQQK SGTSPKRWIY DTSKLAGVP AHFRGSGSGT SYSLTISGME AEDAATYYCQ
 241 QWSSNPFTFG SGTKLEINRA AAPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF
 301 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT
 5 361 ISKAKQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP
 421 PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GWAITLISVN
 481 GIFVICCLTY CFAPRCRERR RNERLRRESV RPY

SEQ ID NO. 77

10 Последовательность кДНК, кодирующая scFv против мембраносвязанного CD3 человека

1 ATGAAATGGG TCACCTTTAT CTCCCTGCTG TTCCTGTTCT CCAGCGCCTA CTCTCAGGTC
 61 CAGTTGCAGC AGTCTGGCGC CGAATTGGCT AGACCTGGCG CCTCCGTGAA GATGTCCTGC
 15 121 AAGGCTTCCG GCTACACCTT CACCAGATAC ACCATGCACT GGGTCAAGCA GAGGCCTGGA
 181 CAGGGCCTTG AGTGGATCGG CTACATCAAC CCTTCTCGGG GCTACACCAA CTACAACCAG
 241 AAGTTCAAGG ACAAGGCTAC CCTGACAACC GACAAGTCCT CCTCCACCGC CTACATGCAG
 301 CTGTCCAGCC TGACCTCTGA GGA CTCCGCC GTGTACTACT GTGCCC GGTA CTACGACGAC
 361 CACTACTGCC TGGATTATTG GGGCCAGGGC ACCACACTGA CAGTGTCTAG CGGAGGCGGA
 20 421 GGATCTGGTG GTGGTGGATC TGGCGGCGGA GGTTCTCAGA TTGTGCTGAC CCAGTCTCCT
 481 GCCATCATGT CCGCTTCTCC CGGCGAGAAA GTGACAATGA CCTGCTCCGC CTCTTCCTCC
 541 GTGTCTACA TGAAGTGGTA TCAGCAGAAG TCCGGCACCT CTCTAAGCG GTGGATCTAC
 601 GACACCTCCA AGCTGGCATC TGGCGTGCCC GCTCACTTTA GAGGCTCTGG CTCTGGCACC
 661 AGCTACTCCC TGACCATCTC TGGCATGGAA GCCGAGGATG CCGCCACCTA CTATTGCCAG
 25 721 CAGTGGTCTA GCAACCCCTT CACCTTCGGC TCCGGCACCA AGCTGGAAAT CAACAGAGCC
 781 GCCGCTCCTT CCGTGTCTTCT GTTCCCTCCA AAGCCTAAGG ACACCCTGAT GATCTCTCGG
 841 ACCCCTGAAG TGACCTGCGT GGTGGTCGAT GTGTCTCACG AGGACCCAGA AGTGAAGTTC
 901 AATTGGTACG TGGACGGCGT GGAAGTGCAC AACGCCAAGA CCAAGCCTAG AGAGGAACAG
 961 TACAACCTCA CCTACAGAGT GGTGTCCGTG CTGACCGTGC TGCACCAGGA TTGGCTGAAC
 30 1021 GGCAAAGAGT ACAAGTGCAA GGTGTCCAAC AAGGCTCTGC CCGCTCCTAT CGAAAAGACC
 1081 ATCTCCAAGG CCAAGGGCCA GCCTAGGGAA CCCCAGGTTT ACACCCTGCC TCCAAGCCGG
 1141 GAAGAGATGA CCAAGAACCA GGTGTCCCTG ACCTGCCTGG TCAAGGGCTT CTACCCTTCC
 1201 GATATCGCCG TGGAATGGGA GAGCAATGGC CAGCCTGAGA ACAACTACAA GACCACACCT
 1261 CCTGTGCTGG ACTCCGACGG CTCATTCTTC CTGTACAGCA AGCTGACAGT GGACAAGTCC
 35 1321 AGATGGCAGC AGGGCAACGT GTTCTCCTGC TCCGTGATGC ACGAGGCCCT GCACAATCAC
 1381 TACACACAGA AGTCCCTGTC TCTGTCCCCT GGCTGGGCTA TCACCCTGAT CTCTGTGAAC
 1441 GGCATCTTCG TGATCTGCTG CCTGACCTAC TGCTTCGCCC CTAGATGCAG AGAGCGGCGG
 1501 AGAAACGAAC GGCTGCGGAG AGAATCTGTC CGGCCTGTG

Формула изобретения

1. Антитело, которое связывает внеклеточный домен-1, богатый цистеином (CRD1), медиатора проникновения вируса герпеса (HVEM) на клетках, экспрессирующих HVEM, и предотвращает связывание аттенюатора В- и Т-лимфоцитов (BTLA) с HVEM, когда указанное антитело связывается с указанной внеклеточной частью HVEM и вытесняет BTLA, связанный с указанной внеклеточной частью HVEM.
2. Антитело по п. 1, отличающееся тем, что указанное антитело не вытесняет LIGHT, связанный с указанной внеклеточной частью HVEM, когда указанное антитело связано с указанной внеклеточной частью HVEM.
3. Антитело по п. 1, отличающееся тем, что указанное антитело частично предотвращает связывание CD160 с HVEM, когда указанное антитело связано с указанной внеклеточной частью HVEM, и частично вытесняет CD160, связанный с указанной внеклеточной частью HVEM.
4. Антитело по пп. 1-3, которое связывает внеклеточную часть HVEM на экспрессирующих HVEM клетках, содержащее вариабельную область тяжелой цепи с последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3, представленными в SEQ ID NO: 26-28, с 0, 1 или 2 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями, и вариабельную область легкой цепи с последовательностями CDR1, CDR2, CDR3, представленными в SEQ ID NO: 29-31, с 0, 1 или 2 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями.
5. Антитело по пп. 1-4, которое связывает внеклеточную часть HVEM на экспрессирующих HVEM клетках, содержащее область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 24, с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 25, с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями.
6. Антитело, которое связывает внеклеточную часть HVEM на экспрессирующих HVEM клетках, содержащее вариабельную область тяжелой цепи с последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3, представленными в SEQ ID NO: 42-44, с 0, 1 или 2 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями, и вариабельную область легкой цепи с последовательностями CDR1, CDR2, CDR3, представленными в SEQ ID NO: 45-47, с 0, 1 или 2 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями.
7. Антитело, которое связывает внеклеточную часть HVEM на экспрессирующей HVEM клетке, содержащее область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 40, с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10

аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 41, с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями.

5

8. Антителу, которое связывает внеклеточную часть HVEM на экспрессирующих HVEM клетках, содержащее вариабельную область тяжелой цепи с последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3, представленными в SEQ ID NO: 18-20, с 0, 1 или 2 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями, и вариабельную область легкой цепи с последовательностями CDR1, CDR2, CDR3, представленными в SEQ ID NO: 21-23, с 0, 1 или 2 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями.

10

9. Антителу, которое связывает внеклеточную часть HVEM на экспрессирующей HVEM клетке, содержащее область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 16, с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 17, с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотными вставками, делециями, заменами или добавлениями.

15

20

10. Антителу по пп. 1-3, 6, 7, отличающееся тем, что указанное антитело не предотвращает связывание LIGHT с указанной внеклеточной частью HVEM, когда указанное антитело связано с указанной внеклеточной частью HVEM.

25

11. Антителу по пп. 1-10, отличающееся тем, что указанное антитело выбрано из моноклонального антитела, поликлонального антитела, гуманизированного антитела и его антигенсвязывающего фрагмента.

30

12. Одна или более молекул нуклеиновой кислоты, содержащих нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело по любому из пп. 4-10 и 11.

13. Клетка, содержащая одну или более нуклеиновых кислот по п. 12, где указанные одна или более нуклеиновых кислот способны к сборке антитела по любому из пп. 1-11.

35

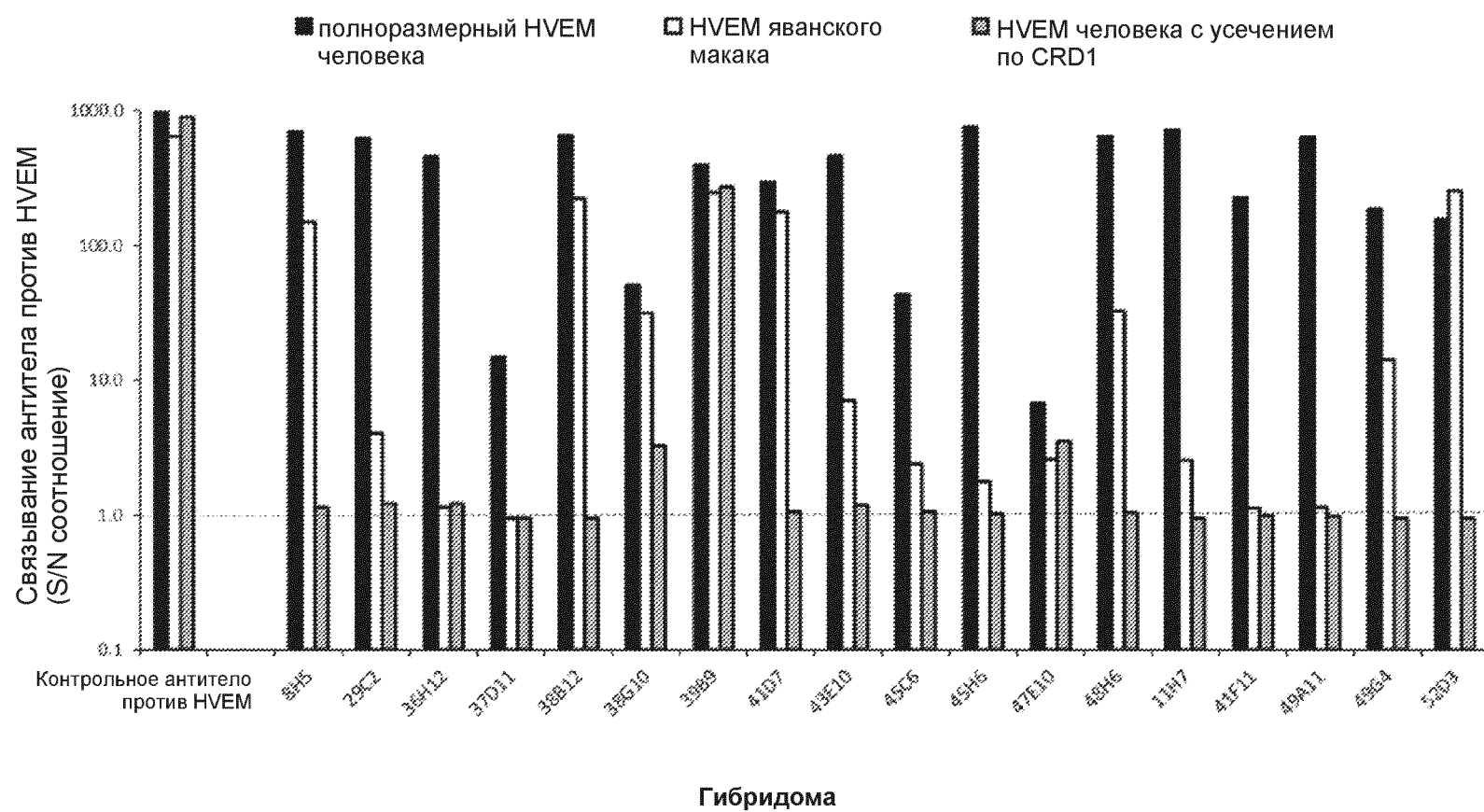
14. Антителу по любому из пп. 1-11 для применения для лечения заболевания.

15. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-12 и фармацевтически приемлемый носитель и/или разбавитель.

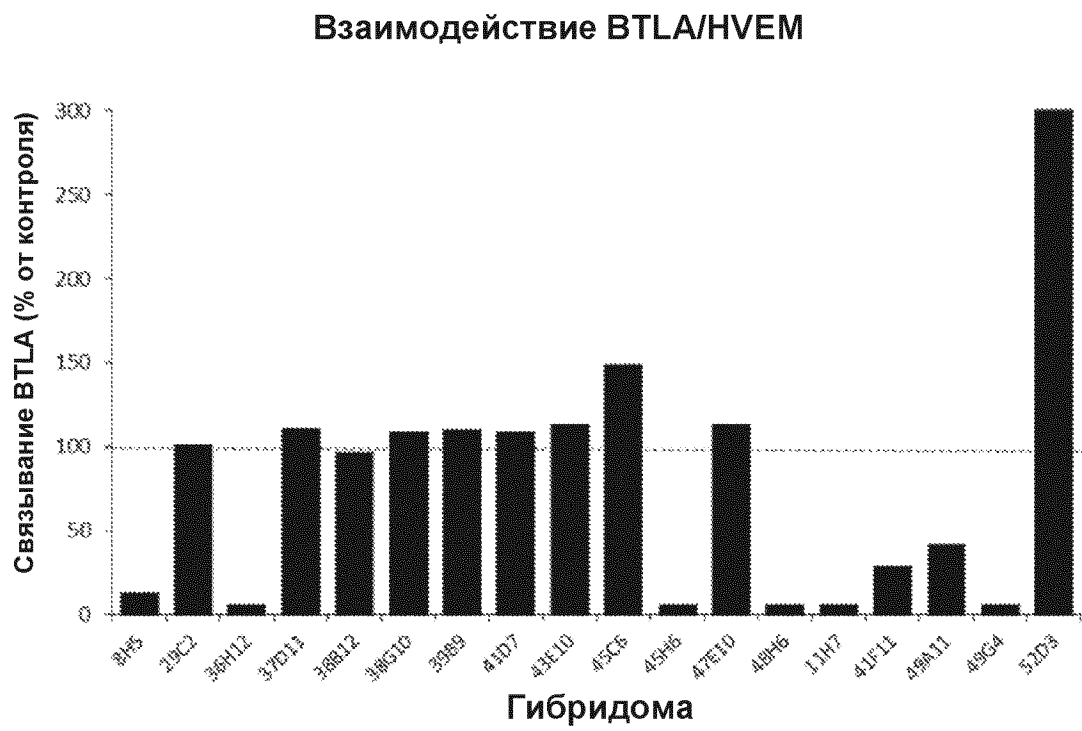
40

16. Фармацевтическая композиция по п. 15 для применения в качестве профилактического средства или для лечения рака и/или нарушений, связанных с иммунитетом.
- 5 17. Способ модулирования сигнальной активности HVEM, включающий приведение клеток, экспрессирующих HVEM, в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или молекулой нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-12.
- 10 18. Способ лечения человека или животного, страдающего медицинским показанием, причем указанный способ включает введение человеку или животному терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-12.
- 15 19. Способ уменьшения роста опухоли у субъекта, включающий введение нуждающемуся субъекту терапевтически эффективного количества композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-12.

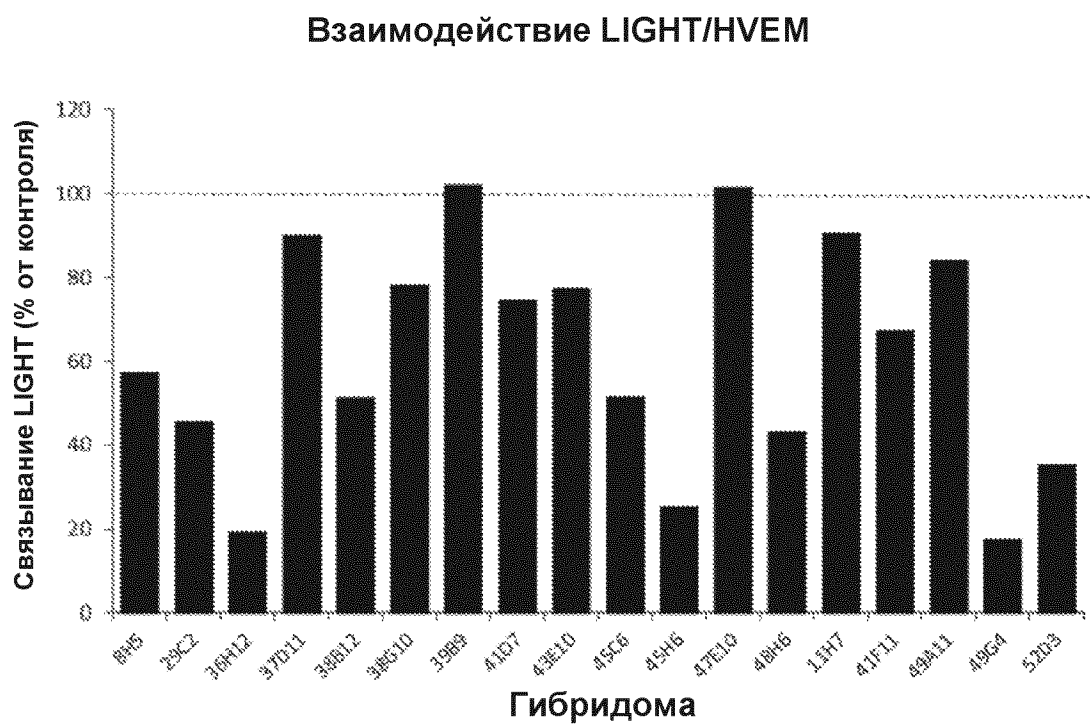
Фигура 1



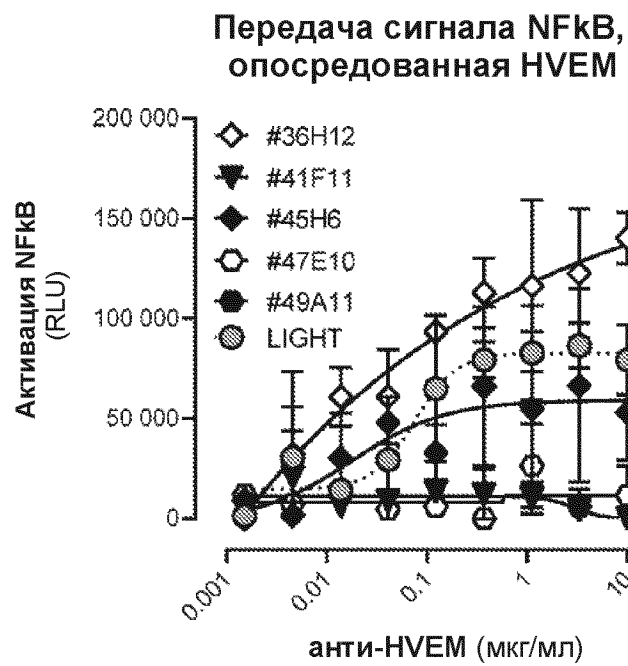
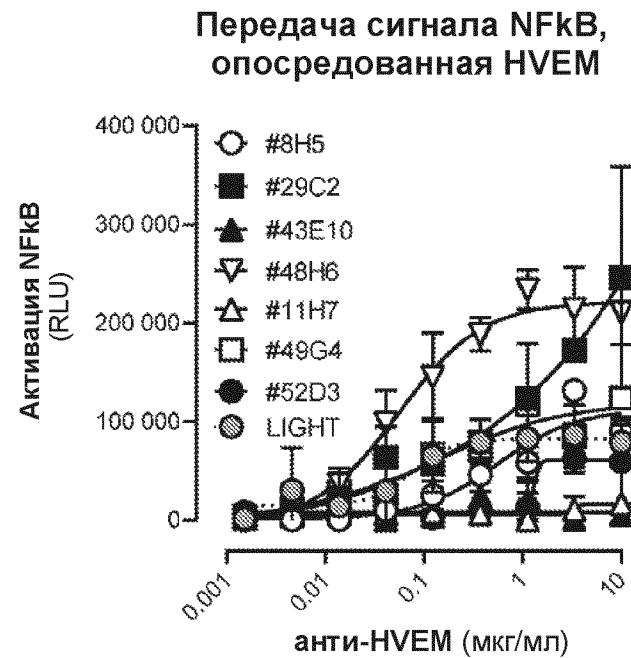
Фигура 2А



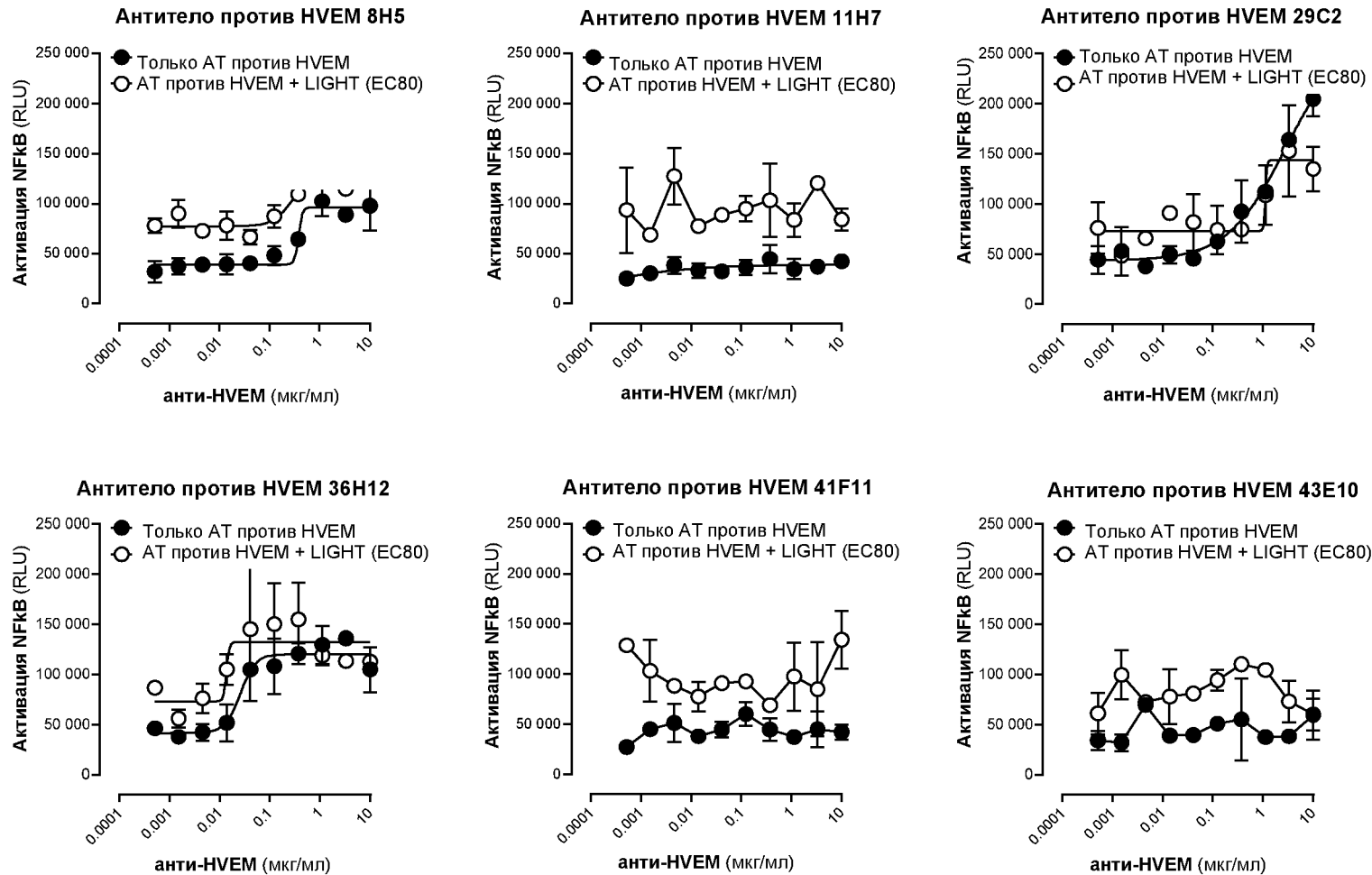
Фигура 2В



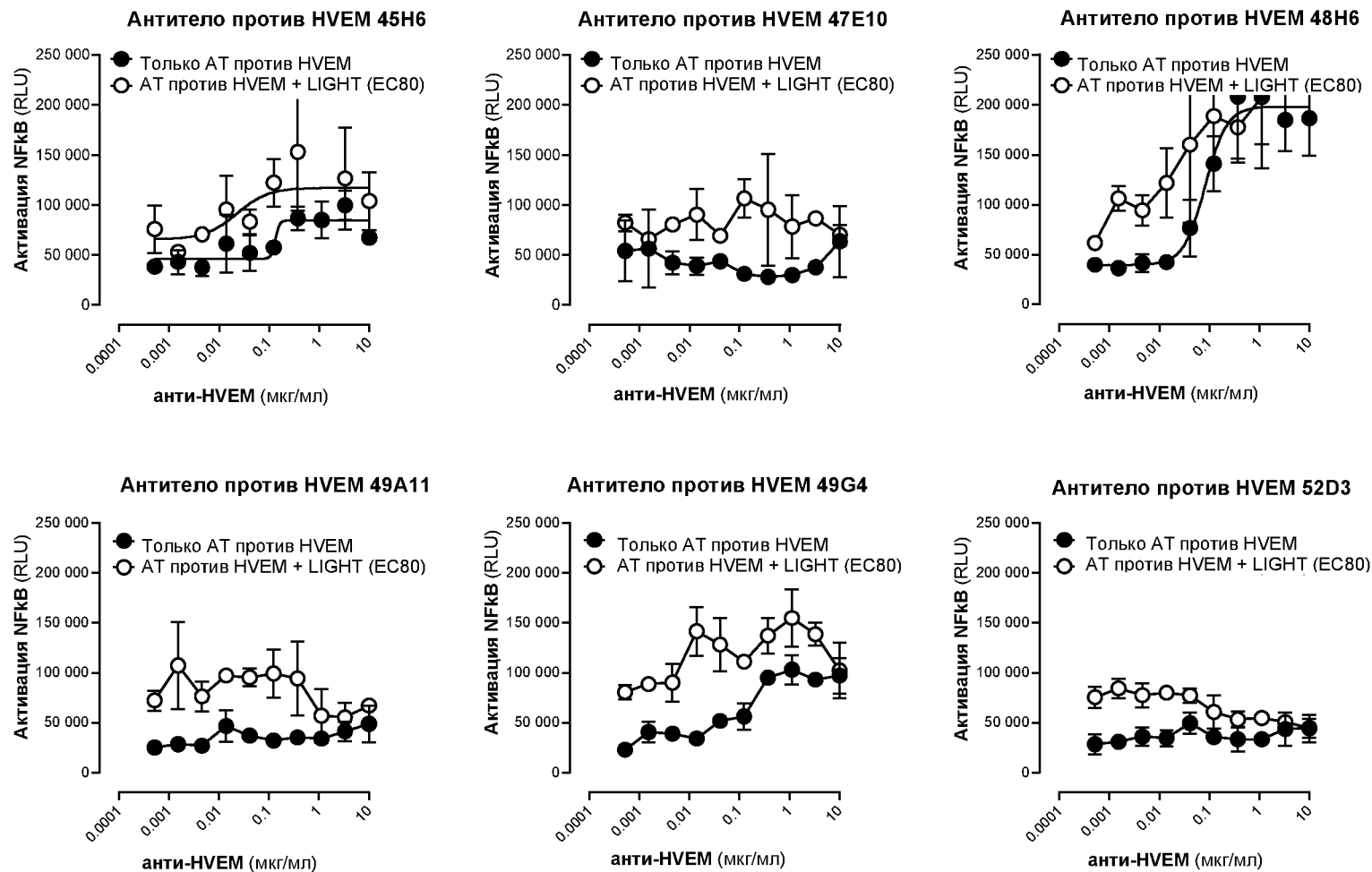
Фигура 3А



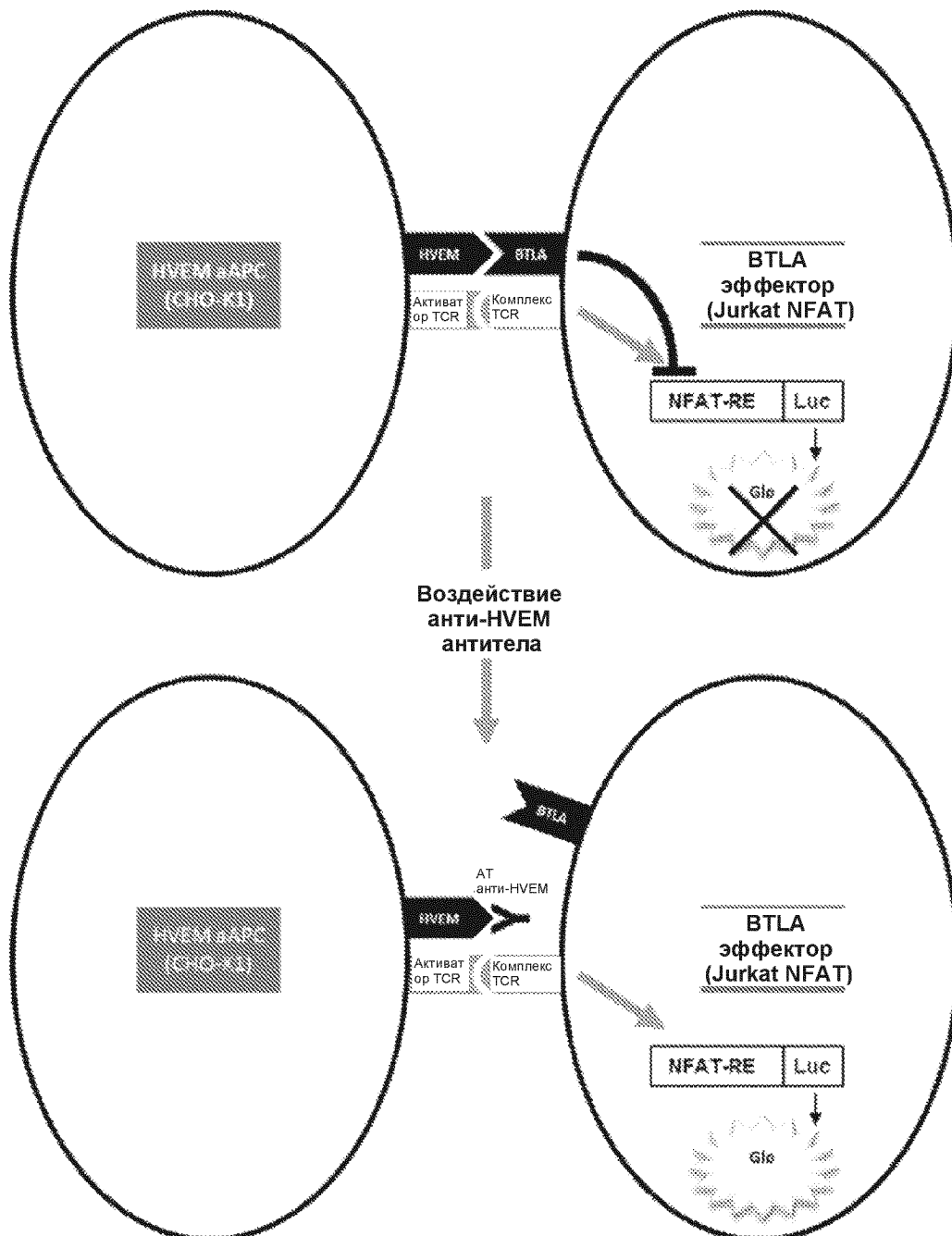
Фигура 3В



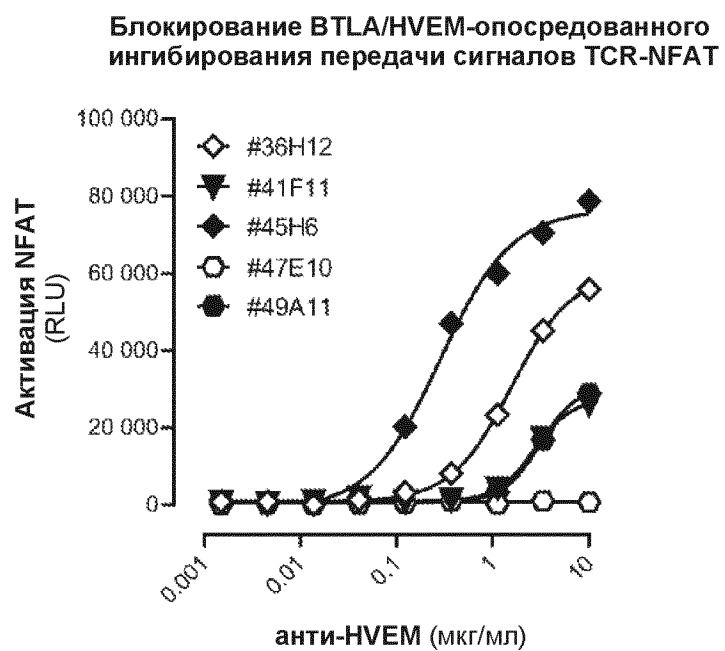
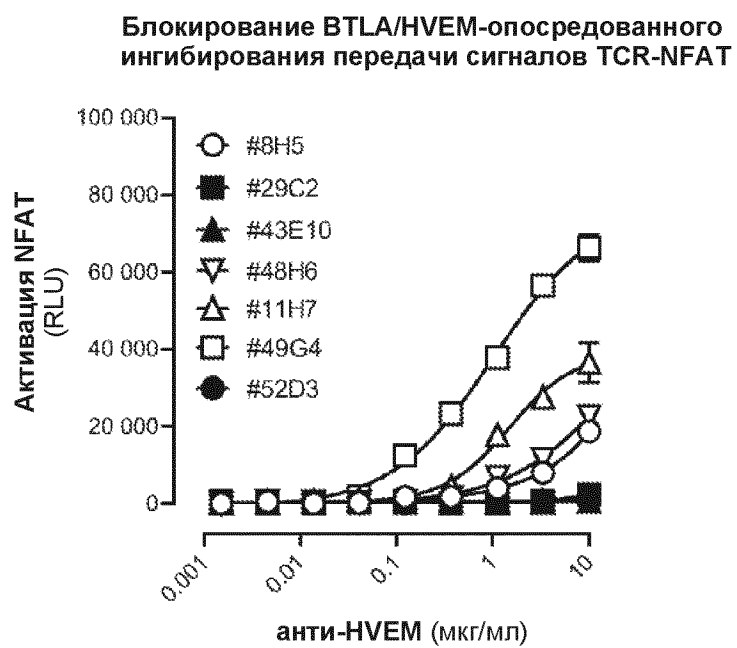
Фигура 3В (продолжение)



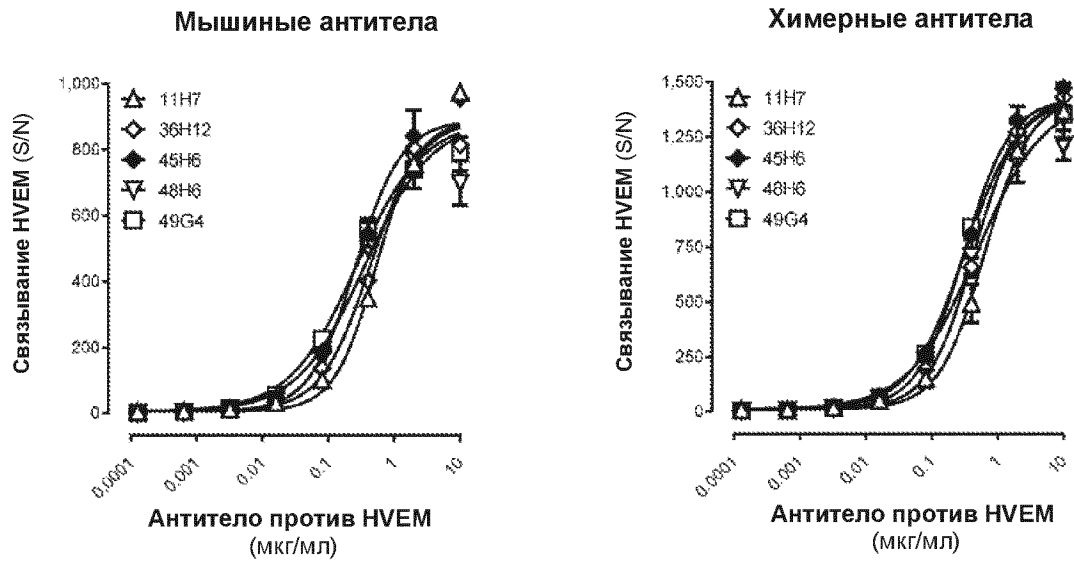
Фигура 4А



Фигура 4В

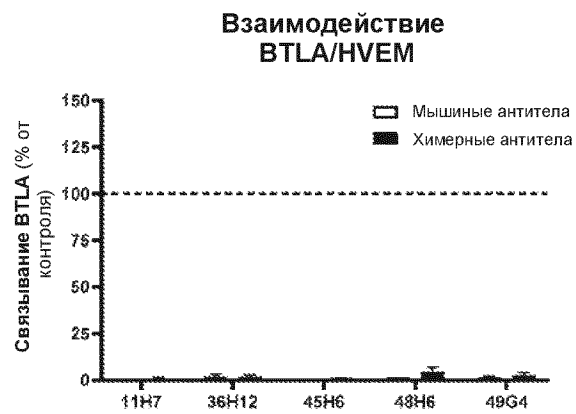


Фигура 5

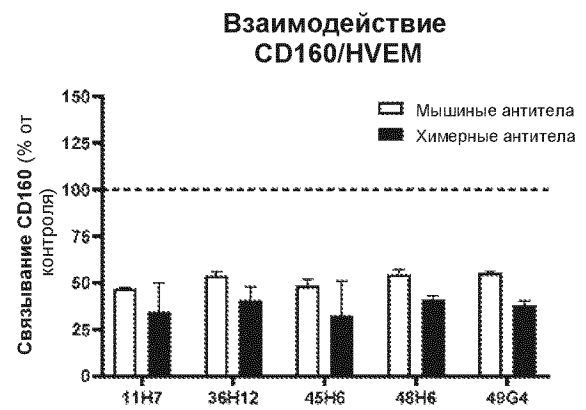


Фигура 6

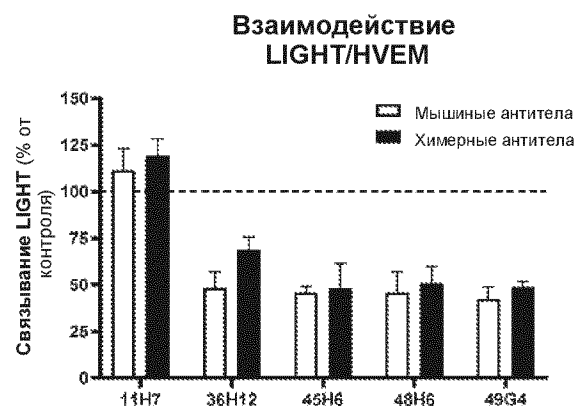
A



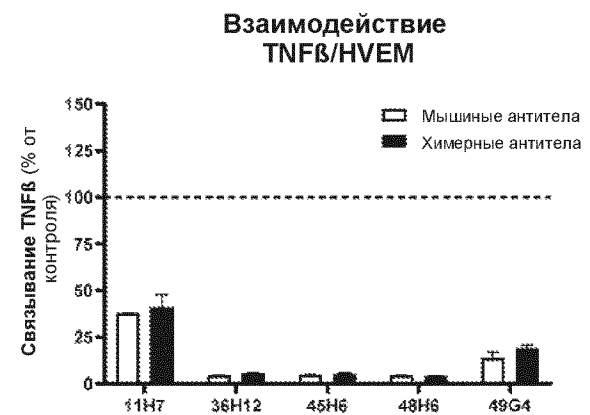
B



C



D

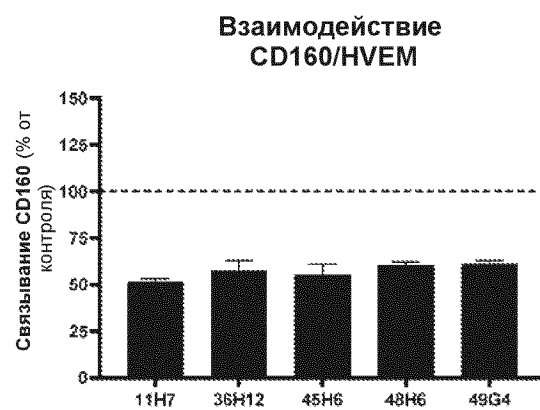


Фигура 7

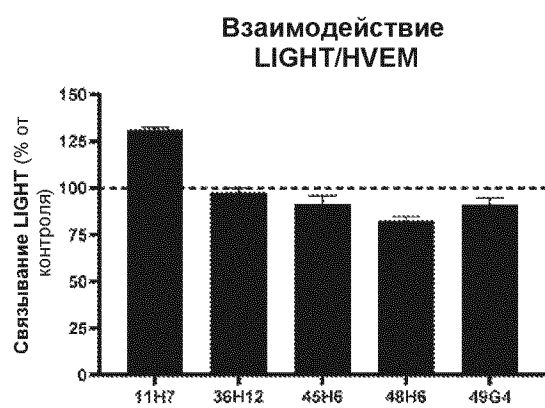
A



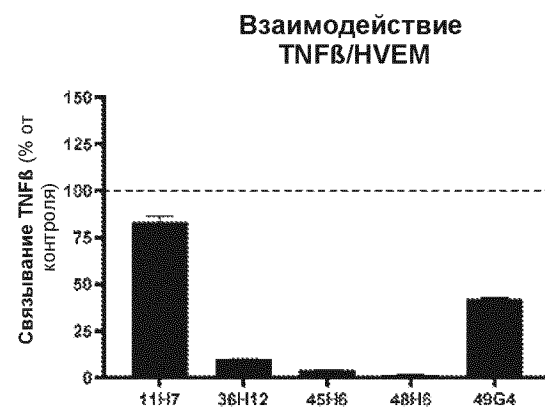
B

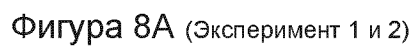


C

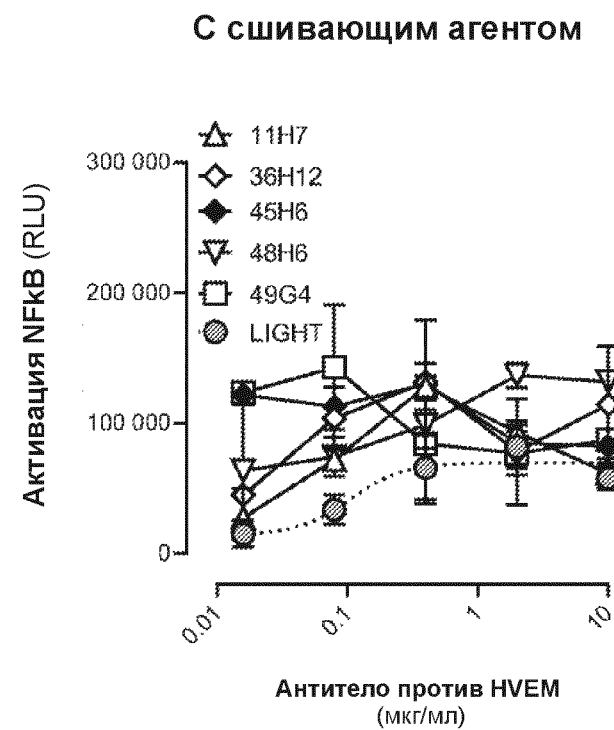
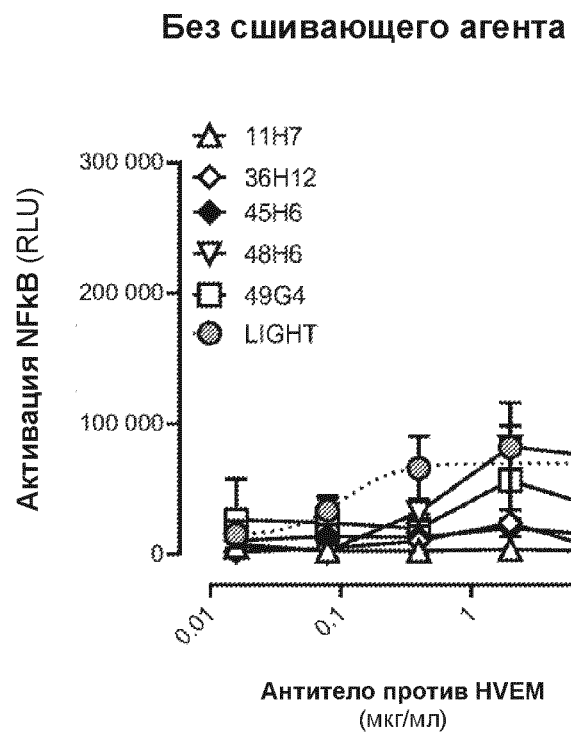


D

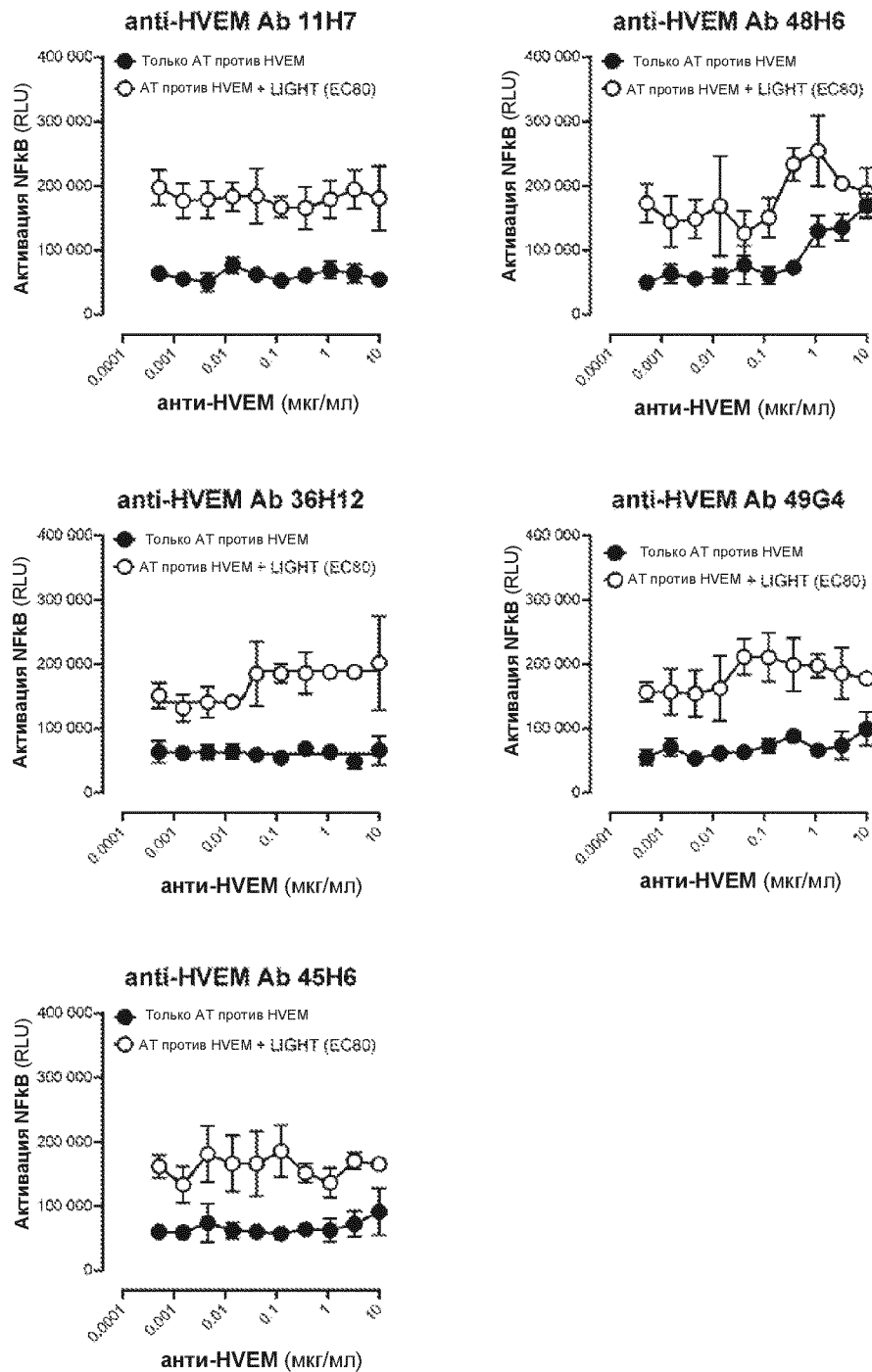




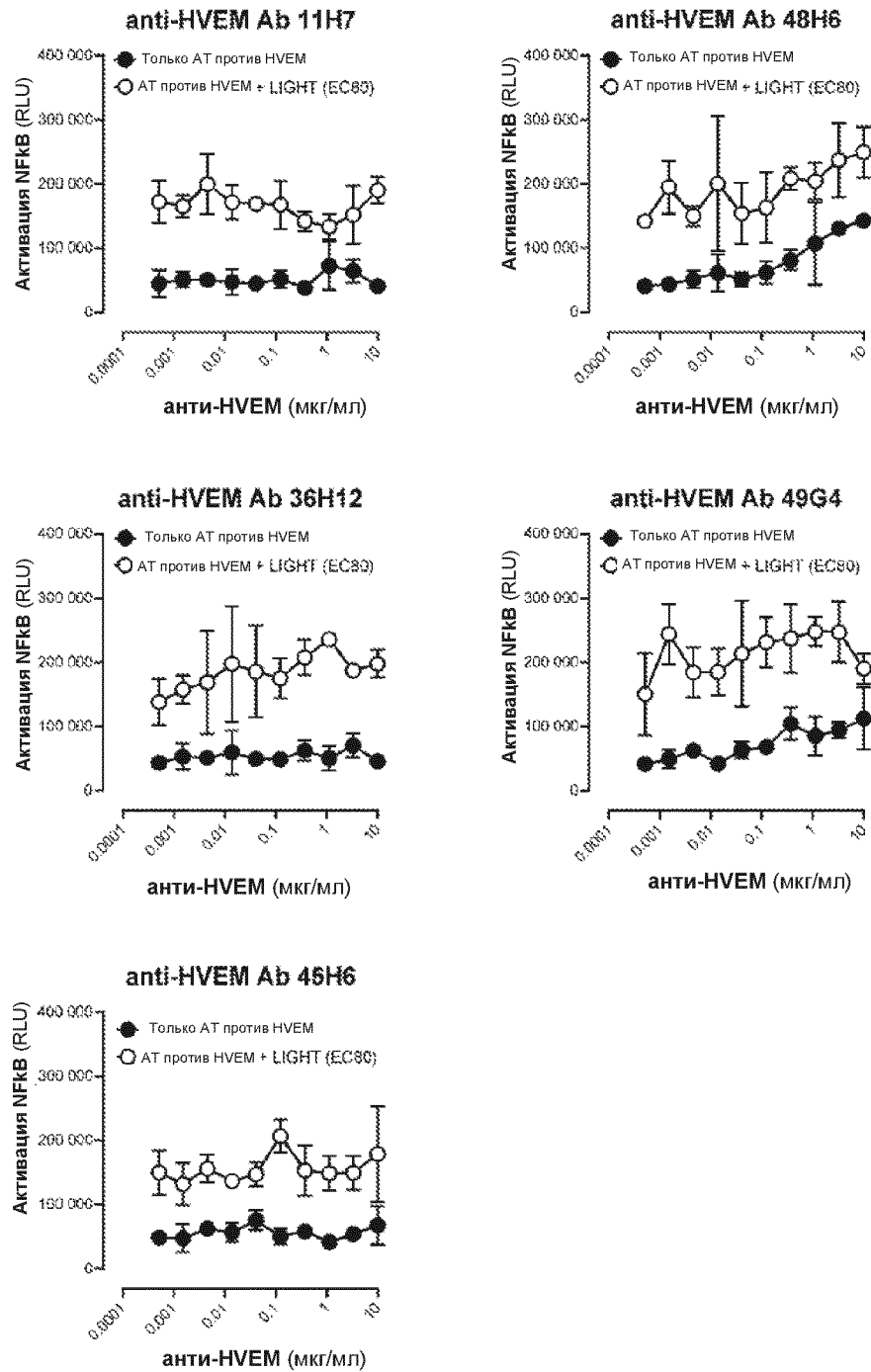
Фигура 8В



Фигура 8С (Эксперимент 1)

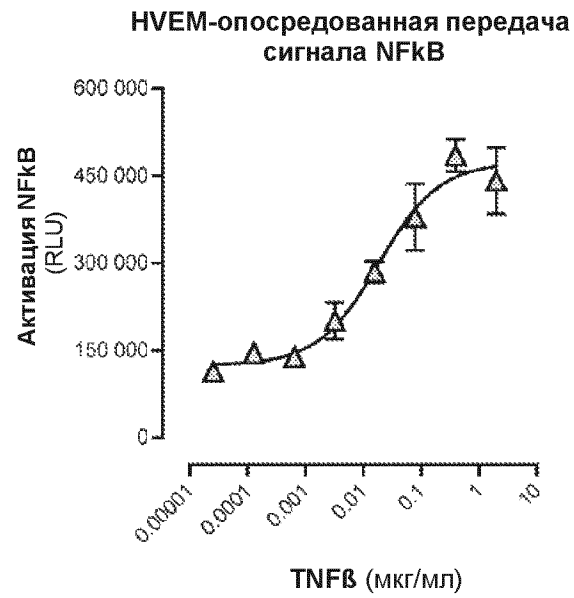


Фигура 8С, продолжение (Эксперимент 2)

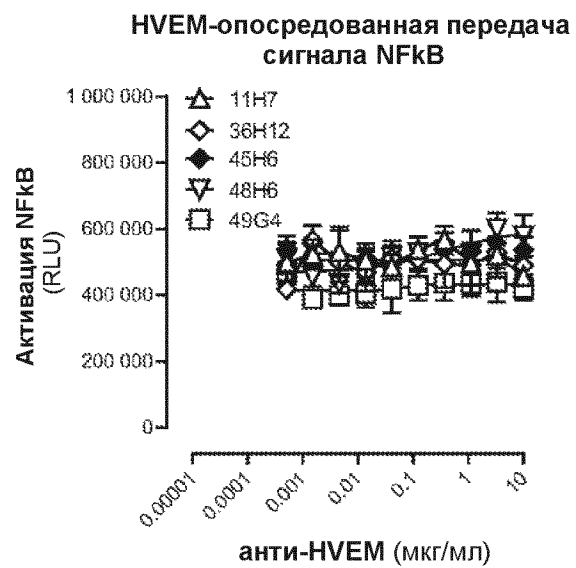


Фигура 9

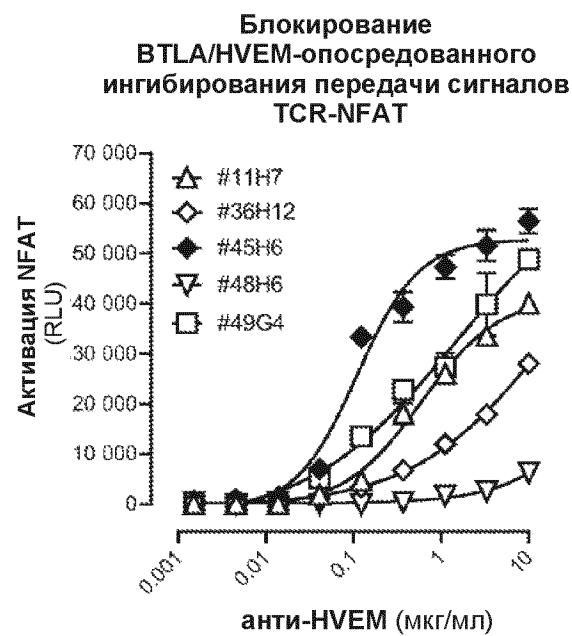
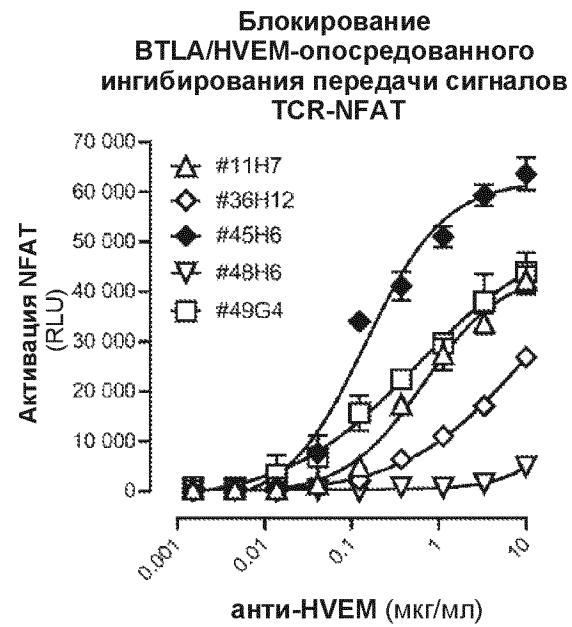
А

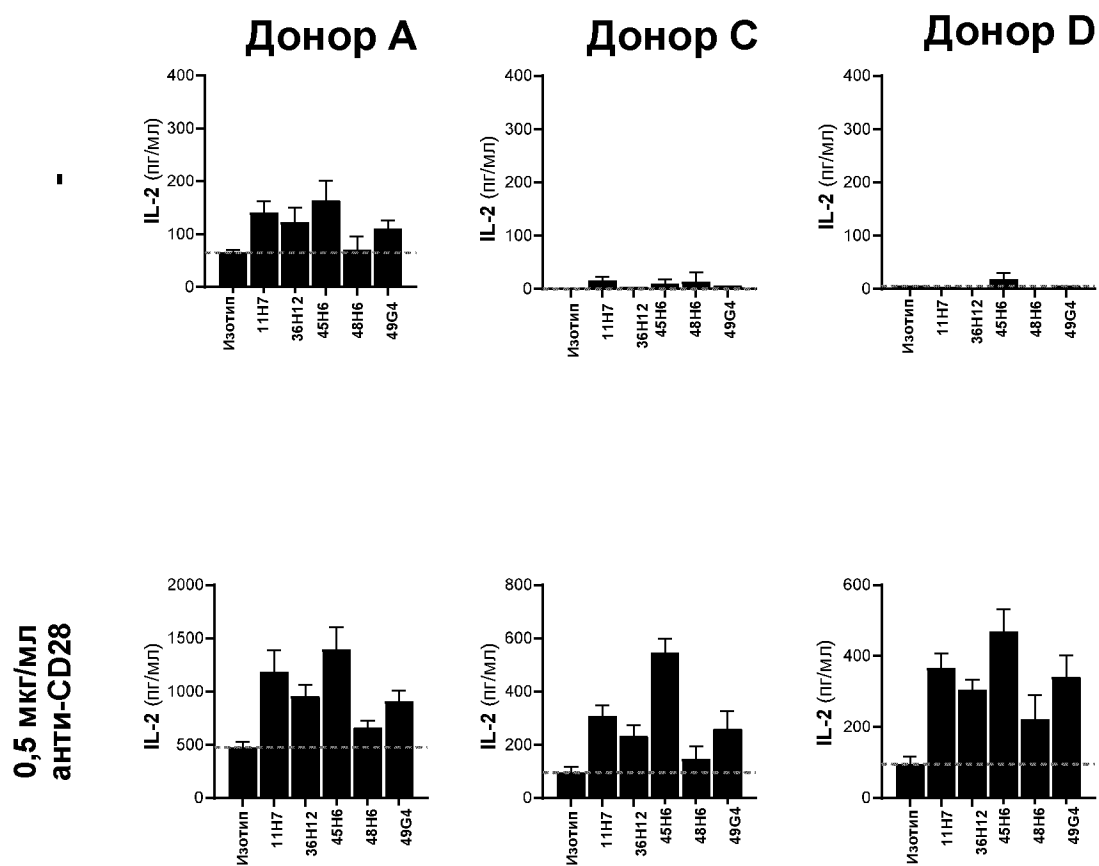


В



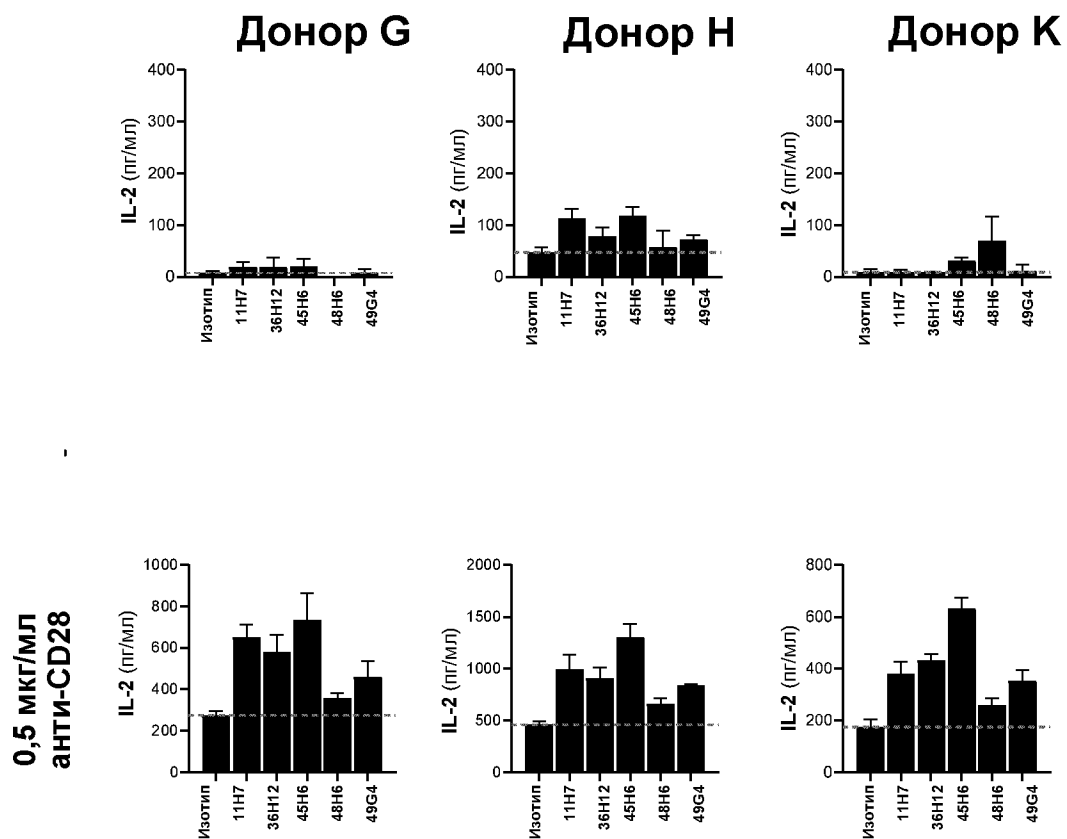
Фигура 10 (Эксперимент 1 и 2)



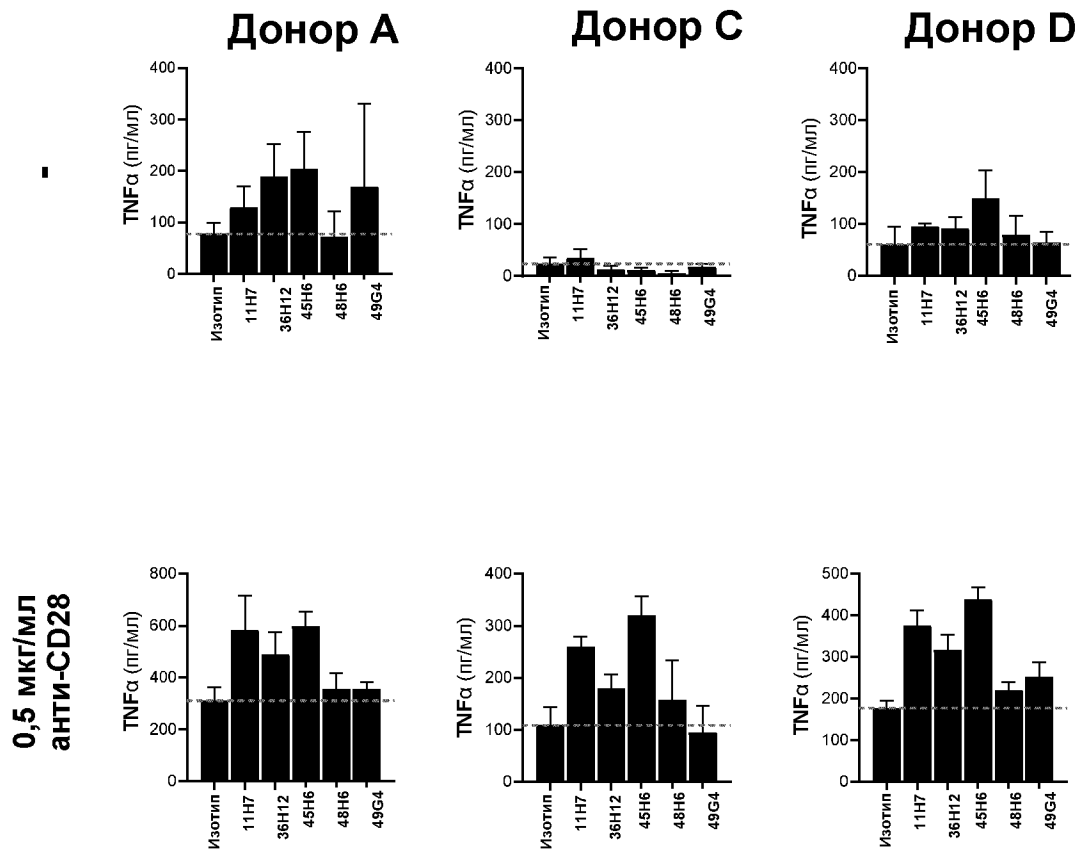


Фигура 11А

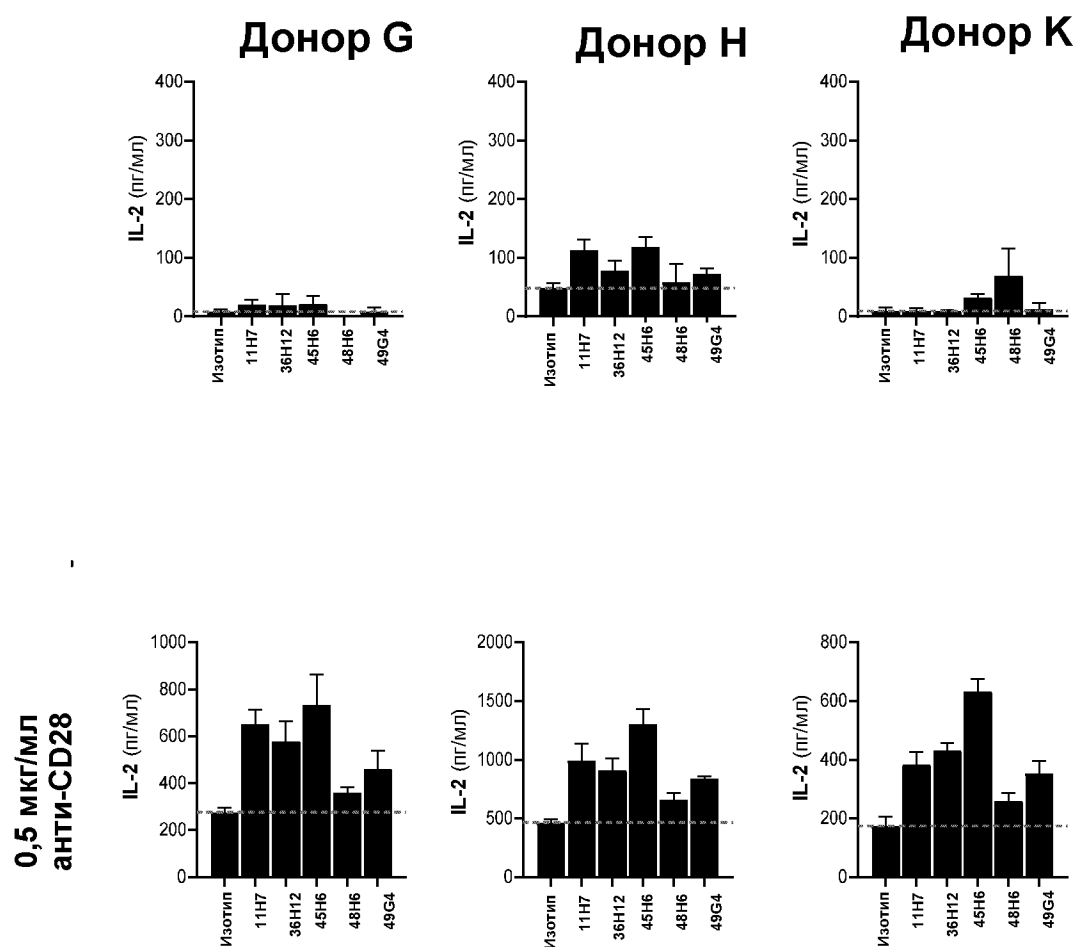
Фигура 11А (продолжение)



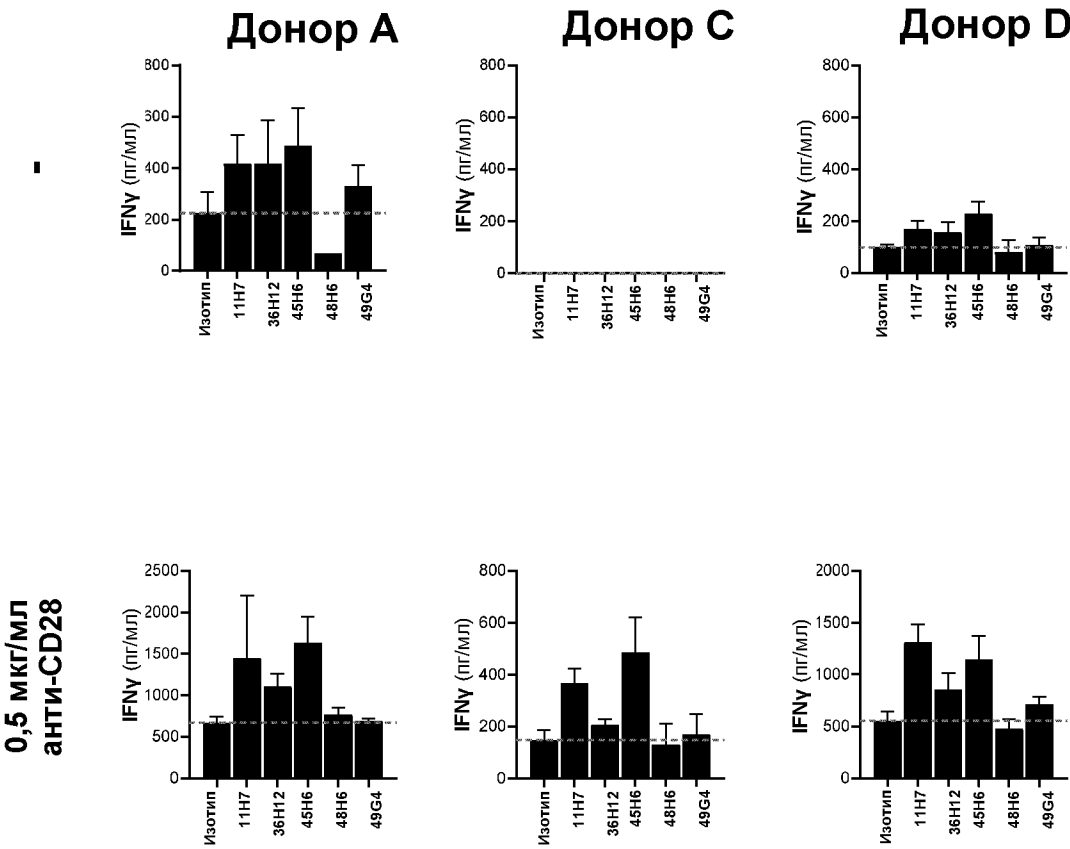
Фигура 11В



Фигура 11В (продолжение)



Фигура 11С



Фигура 11С (продолжение)

