

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202293496 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.04.06

(22) Дата подачи заявки
2021.06.11

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К ВТЛА

(31) 2008860.5

(32) 2020.06.11

(33) GB

(86) PCT/GB2021/051452

(87) WO 2021/250419 2021.12.16

(88) 2022.02.17

(71) Заявитель:

ОКСФОРД ЮНИВЕРСИТИ
ИННОВЕЙШН ЛИМИТЕД;
МИРОБИО ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:

Дэвис Саймон Джон, Корнолл Ричард
Джон, Палух Кристофер Дуглас (GB)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение относится по существу к антителам, которые связываются с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов (ВТЛА) человека, и их применениям. В частности, изобретение относится к агонистическим антителам, которые связываются с ВТЛА человека и модулируют его активность, а также к их применению в лечении воспалительных, аутоиммунных и пролиферативных заболеваний и расстройств. Соответственно, антитела также обладают модификацией Fc, которая усиливает сигнализацию через FcγR2B.

A1

202293496

202293496

A1

АНТИТЕЛА К BTLA

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится по существу к антителам, включающим антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов (BTLA) человека, и их применениям. Более конкретно, настоящее изобретение относится к агонистическим антителам, которые связываются с BTLA человека и модулируют его активность и обладают повышенным связыванием и сигнализацией через FcγR2B, а также к их применению в лечении воспалительных, аутоиммунных и пролиферативных заболеваний и расстройств.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Иммунная система должна обеспечивать баланс между разрушением патогенов или опасно мутированных клеток и толерантностью к собственной здоровой ткани и безвредным симбионтам. Для облегчения поддержания этого баланса активность иммунных клеток зависит от интеграции сигналов от множества стимулирующих и ингибирующих рецепторов, которые адаптируют клетки к окружающей их среде. Эти экспрессируемые на поверхности рецепторы являются привлекательными мишенями для терапевтической модуляции иммунных ответов. Многие заболевания человека являются результатом аномальной или нежелательной активации иммунной системы, включая аутоиммунные заболевания, отторжение трансплантата и реакцию «трансплантат против хозяина». Агонистические агенты, способные индуцировать передачу сигналов через ингибирующие рецепторы, могут ослаблять такие нежелательные иммунные ответы.

Аттенуатор В- и Т-лимфоцитов (BTLA; также обозначается CD272) представляет собой ингибирующий член семейства рецепторов CD28, которое также включает CD28, CTLA-4, ICOS и PD-1 (Watanabe et al., Nat Immunol. 4:670-679, 2003). Он широко экспрессируется во всей иммунной системе как на миелоидных, так и на лимфоидных клетках (Han et al., J Immunol. 172:5931-9, 2004). После связывания со своим лигандом-медиатором входа вирусов герпеса (HVEM) BTLA рекрутирует фосфатазы SHP-1 и SHP-2 к своему цитоплазматическому домену (Sedy et al., Nat Immunol. 6:90-8, 2005), что в свою очередь ингибирует сигнальные каскады активирующих рецепторов. Мыши с отсутствующим

интактным геном BTLA демонстрируют гиперпролиферативные В- и Т-клеточные ответы *in vitro*, более высокие титры к DNP-KLH после иммунизации и повышенную чувствительность к EAE (Watanabe et al, Nat. Immunol, 4:670-679, 2003). Если наблюдать мышей с нокаутом BTLA до пожилого возраста, то у них спонтанно развиваются аутоантитела, заболевание, похожее на аутоиммунный гепатит, и воспалительные инфильтрации клеток во многие органы (Oya et al., Arthritis Rheum 58: 2498-2510, 2008). Это доказательство указывает на то, что ингибиторный рецептор BTLA играет важнейшую роль в поддержании иммунного гомеостаза и ингибировании аутоиммунитета. Кроме того, сигнализация HVEM-BTLA участвует в регуляции воспаления слизистой оболочки и иммунитета к инфекциям (Shui et al., J Leukoc Biol. 89:517-523, 2011).

Весьма желательными являются терапевтические средства, способные модулировать функцию BTLA и ингибировать аутореактивные лимфоциты в контексте аутоиммунных расстройств.

Ранее было показано, что моноклональные антитела, которые связываются с BTLA мыши, могут действовать как агонисты, индуцирующие передачу сигналов через рецептор с ингибированием ответов иммунных клеток. В присутствии агонистического антитела к BTLA (мАт) Т-клетки, активированные антителами к CD3 и антителами к CD28, демонстрируют уменьшение продукции IL-2 и пролиферации (Kreig et al., J. Immunol., 175, 6420-6472, 2005).

Кроме того, было показано, что агонистические антитела к мышинному BTLA облегчают заболевание в мышинных моделях реакции «трансплантат против хозяина» (Sakoda et al., Blood. 117:2506-2514; Albring et al., J Exp Med. 207:2551-9, 2010). Было показано, что агонистические антитела, нацеленные на рецептор BTLA человека, ингибируют ответы Т-клеток *ex vivo* (см. Otsuki et al., Biochem Biophys Res Commun 344:1121-7, 2006; и WO2011/014438), но эти результаты еще не доведены до клинического применения.

В публикации WO2018/213113 (Eli Lilly & Co.) описаны некоторые антитела к BTLA.

В публикации WO2020128446 (Oxford University Innovation Limited и MiroBio Limited), опубликованной 25 июня 2020 г., описаны некоторые антитела к BTLA.

У людей имеется один ингибирующий рецептор Fc-гамма (FcγR2B), тогда как другие Fc-гамма-рецепторы все обеспечивают активирующие иммунитет сигналы (FcγR1A, FcγR2A, FcγR3A и FcγR3B). Важная регуляторная функция FcγR2B была продемонстрирована в исследовании мышей с нокаутом FcγR2B, которые обладают повышенной восприимчивостью к аутоиммунному заболеванию (Nakamura et al. *Journal of Experimental Medicine* 191(5): 899–906, 2000). Кроме того, полиморфизм в гене FcγR2B у людей связан с риском аутоиммунного заболевания, в частности системной красной волчанки (Floto et al. *Nature Medicine* 11(10), 2005). Таким образом, считается, что FcγR2B играет ключевую роль контроле иммунных ответов и представляет собой многообещающую молекулу-мишень для борьбы с аутоиммунными и воспалительными заболеваниями.

Описаны антитела, имеющие Fc с улучшенной активностью связывания с FcγR2B (Chu et al. *Molecular Immunology* 45(15): 3926–33, 2008). В настоящем документе активность связывания с FcγR2B улучшалась путем добавления изменений, таких как S267E/L328F, G236D/S267E и S239D/S267E, в область Fc антитела. Среди них антитело с введенной мутацией S267E/L328F сильнее всего связывается с FcγR2B и обеспечивает тот же уровень связывания с FcγR1A и FcγR2A (аллотип 131H), что и у встречающегося в природе IgG1. Однако в другой публикации показано, что это изменение усиливает связывание с FcγR2A 131R в несколько сотен раз до того же уровня, что и связывание с FcγR2B, что означает, что селективность связывания с FcγR2B не улучшается по сравнению с FcγR2A 131R (патентная публикация США № 2009/0136485).

Чтобы агонистическое антитело к BTLA было эффективным при подавлении иммунных ответов без индукции воспалительной сигнализации FcγR, авторы изобретения предлагают адаптировать антитело для избирательного связывания Fc с FcγR2B. Молекулы с более избирательным связыванием с FcγR2B будут способствовать двусторонней ингибирующей сигнализации через BTLA на экспрессирующей BTLA клетке и через FcγR2B на экспрессирующей FcγR2B клетке, что будет способствовать иммуносупрессивному действию антитела. Это было бы желательно для терапевтического антитела, предназначенного для лечения заболеваний, связанных с гиперактивацией иммунитета.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к агонистическим антителам к BTLA, включая фрагменты таких антител, имеющим одно или более желательных свойств, включая высокую аффинность связывания, высокую агонистическую активность, высокую агонистическую эффективность, хорошую фармакокинетику и низкую антигенность у субъектов-людей. В некоторых вариантах осуществления такие молекулы также обладают повышенным связыванием и, следовательно, индуцируют сигнализацию через FcγR2B и при этом обладают *in vivo* периодом полувыведения, достаточным для соответствующего терапевтического применения. Таким образом, антитела по данному изобретению способствуют двусторонней ингибирующей сигнализации: через BTLA на экспрессирующей BTLA клетке и через FcγR2B на экспрессирующей FcγR2B клетке. В определенных вариантах осуществления такие молекулы имеют сниженное связывание с одним или более активирующими Fc-гамма-рецепторами, такими как FcγR2A или FcγR1A, по сравнению с исходным полипептидом. В определенных вариантах осуществления такие молекулы имеют повышенное соотношение связывания с FcγR2B/FcγR2A по сравнению с исходным полипептидом. В определенных вариантах осуществления такие молекулы имеют повышенное соотношение связывания с FcγR2B/FcγR1A по сравнению с исходным полипептидом. Изобретение также относится к применению антител согласно настоящему изобретению в лечении заболевания, такого как аутоиммунные и/или воспалительные заболевания.

В соответствии с первым аспектом изобретения предлагается выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, причем указанное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом указанная тяжелая цепь содержит область Fc, которая содержит замену, которая приводит к повышению связывания с FcγR2B по сравнению с исходной молекулой, которая не содержит замены.

В некоторых вариантах осуществления антитело имеет повышенное связывание с FcγR2B по сравнению с исходной молекулой таким образом, что величина [KD исходного полипептида к FcγR2B] / [KD вариантного полипептида к FcγR2B] составляет более 1, например более 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 2,5, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 или 100.

В некоторых вариантах осуществления указанное антитело имеет избирательность связывания с FcγR2B по сравнению с FcγR2A.

В некоторых вариантах осуществления антитело имеет повышенную активность связывания с FcγR2B и сохраненную или сниженную активность связывания с FcγR2A (тип R) и/или FcγR2A (тип H) по сравнению с исходным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления величина [KD вариантного полипептида к FcγR2A (тип R)] / [KD вариантного полипептида к FcγR2B] составляет 2 или более, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более. В некоторых вариантах осуществления величина [KD вариантного полипептида к FcγR2A (тип H)] / [KD вариантного полипептида к FcγR2B] составляет 2 или более, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 или 150 или более.

В некоторых вариантах осуществления антитело обладает повышенной активностью связывания с FcγR2B и сохраненную или сниженную активность связывания с FcγR1A по сравнению с исходным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления величина [KD вариантного полипептида к FcγR1A] / [KD вариантного полипептида к FcγR2B] составляет 0,05 или более, например, по меньшей мере 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 2, 3, 4 или более.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело имеет сниженную активность связывания с Fcγ1 по сравнению с исходным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления изобретения величина [KD- вариантного полипептида к FcγR1A] / [KD исходного полипептида к FcγR1A] составляет по меньшей мере 10, 20, 50, 100, 200.

В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из:

- (i) D52, P53, E55, E57, E83, Q86, E103, L106 и E92 (положение в соответствии с SEQ ID NO:225).
- (ii) Y39, K41, R42, Q43, E45 и S47 (положение в соответствии с SEQ ID NO:225);
- (iii) D35, T78, K81, S121 и L123 (положение в соответствии с SEQ ID NO:225);

- (iv) N65 и A64 (положение в соответствии с SEQ ID NO:225); или
- (v) H68 (положение в соответствии с SEQ ID NO:225).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, причем указанная тяжелая цепь содержит область Fc, которая содержит одну или более из следующих аминокислот: аланин (A) в положении 234, аланин (A) в положении 235, аспарагиновую кислоту (D) в положении 236, аспарагиновую кислоту (D) в положении 237, аспарагиновую кислоту (D) в положении 238, аланин (A) в положении 265, глутаминовую кислоту (E) в положении 267, глицин (G) в положении 271, аргинин (R) в положении 330, аланин (A) в положении 332 или аланин (A) в положении 297 (нумерация в соответствии с индексом ЕС). Соответственно, антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, представляет собой агонистическое антитело / антигенсвязывающий фрагмент.

Соответственно, антитело представляет собой IgG1 или IgG4 человека с одной или более аминокислотными заменами, выбранными из группы, состоящей из hIgG1 G236D, hIgG1 G237D, hIgG1 P238D, hIgG1 D265A, hIgG1 S267E, hIgG1 P271G, hIgG1 A330R, hIgG1 K322A, hIgG1 N297A, hIgG4 P238D, hIgG4 G237D, hIgG4 P271G, hIgG4 S330R, hIgG4 F234A и hIgG4 L235A.

В соответствии с одним вариантом первого аспекта настоящего изобретения предложено антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, причем указанное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом указанная тяжелая цепь содержит область Fc, которая содержит аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс ЕС). Соответственно, антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, представляет собой агонистическое антитело / антигенсвязывающий фрагмент.

В соответствии с одним вариантом первого аспекта настоящего изобретения предложено антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, причем указанное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом указанная тяжелая цепь содержит область Fc, которая содержит аспарагиновую кислоту в положении 237 (индекс ЕС). Соответственно, антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, представляет собой агонистическое антитело / антигенсвязывающий фрагмент.

В соответствии с одним вариантом первого аспекта настоящего изобретения предложено антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, причем указанное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом указанная тяжелая цепь содержит область Fc, которая содержит аспарагиновую кислоту в положении 236 (индекс ЕС). Соответственно, антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, представляет собой агонистическое антитело / антигенсвязывающий фрагмент.

В соответствии с одним вариантом первого аспекта настоящего изобретения предложено антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, причем указанное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом указанная тяжелая цепь содержит область Fc, которая содержит аланин в положении 235 (индекс ЕС). Соответственно, антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, представляет собой агонистическое антитело / антигенсвязывающий фрагмент.

В соответствии с вариантом первого аспекта настоящего изобретения предложено антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, причем указанное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом указанная тяжелая цепь содержит область Fc, которая содержит аланин в положении 234 (индекс ЕС). Соответственно, антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, представляет собой агонистическое антитело / антигенсвязывающий фрагмент.

В соответствии с вариантом первого аспекта настоящего изобретения предложено антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, причем указанное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом указанная тяжелая цепь содержит область Fc, которая содержит глицин в положении 271 (индекс ЕС). Соответственно, антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, представляет собой агонистическое антитело / антигенсвязывающий фрагмент.

В соответствии с вариантом первого аспекта настоящего изобретения предложено антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, причем указанное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом указанная тяжелая цепь содержит область Fc, которая содержит глутаминовую кислоту в положении 267 (индекс ЕС). Соответственно, антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, представляет собой агонистическое антитело / антигенсвязывающий фрагмент.

В соответствии с вариантом первого аспекта настоящего изобретения предложено антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, причем указанное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом указанная тяжелая цепь содержит область Fc, которая содержит аланин в положении 265 (индекс ЕС). Соответственно, антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, представляет собой агонистическое антитело / антигенсвязывающий фрагмент.

В соответствии с вариантом первого аспекта настоящего изобретения предложено антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, причем указанное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом указанная тяжелая цепь содержит область Fc, которая содержит аланин в положении 297 (индекс ЕС). Соответственно, антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, представляет собой агонистическое антитело / антигенсвязывающий фрагмент.

В соответствии с вариантом первого аспекта настоящего изобретения предложено антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, причем указанное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом указанная тяжелая цепь содержит область Fc, которая содержит аланин в положении 322 (индекс ЕС). Соответственно, антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, представляет собой агонистическое антитело / антигенсвязывающий фрагмент.

В соответствии с вариантом первого аспекта настоящего изобретения предложено антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, причем указанное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом указанная тяжелая цепь содержит область Fc, которая содержит аргинин в положении 330 (индекс ЕС). Соответственно, антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, представляет собой агонистическое антитело / антигенсвязывающий фрагмент. В соответствии с вариантом первого аспекта настоящего изобретения предложено антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, причем указанное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом указанная тяжелая цепь содержит область Fc, которая содержит аспарагиновую кислоту в положении 237 (индекс ЕС), аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс ЕС), глицин в положении 271 (индекс ЕС) и аргинин в положении 330 (индекс ЕС). Соответственно, антитело, которое

специфически связывается с BTLA человека, представляет собой агонистическое антитело / антигенсвязывающий фрагмент.

В конкретных вариантах осуществления антитело имеет тяжелую цепь и/или легкую цепь с по меньшей мере одной определяющей комплементарность областью (CDR), которая присутствует в антителе, выбранном из группы, состоящей из 6.2, 2.8.6, 3E8, 11.5.1, 12F11, 14D4, 15B6, 15C6, 16E1, 16F10, 16H2, 1H6, 21C7, 24H7, 26B1, 26F3, 27G9, 3A9, 4B1, 4D3, 4D5, 4E8, 4H4, 6G8, 7A1, 8B4, 8C4 и 831, которые представлены в таблице 1 или таблице 2 и описаны в настоящем документе. Соответственно, указанное антитело также содержит область Fc, которая содержит одну или более из следующих аминокислот: аланин (A) в положении 234, аланин (A) в положении 235, аспарагиновую кислоту (D) в положении 236, аспарагиновую кислоту (D) в положении 237, аспарагиновую кислоту (D) в положении 238, аланин (A) в положении 265, глутаминовую кислоту (E) в положении 267, глицин (G) в положении 271, аргинин (R) в положении 330, аланин (A) в положении 332 и аланин (A) в положении 297 (нумерация в соответствии с индексом ЕС).

В дополнительных вариантах осуществления антитело, которое связывается с BTLA человека, выбрано из группы, состоящей из 6.2, 2.8.6, 3E8 или антитела, которое конкурирует за связывание с BTLA человека с любым одним из 6.2, 2.8.6 или 3E8, причем антитело специфически связывается с BTLA и индуцирует передачу сигналов через рецептор. Указанное антитело также содержит область Fc, которая содержит одну или более из следующих аминокислот: аланин (A) в положении 234, аланин (A) в положении 235, аспарагиновую кислоту (D) в положении 236, аспарагиновую кислоту (D) в положении 237, аспарагиновую кислоту (D) в положении 238, аланин (A) в положении 265, глутаминовую кислоту (E) в положении 267, глицин (G) в положении 271, аргинин (R) в положении 330, аланин (A) в положении 332 и аланин (A) в положении 297 (нумерация в соответствии с индексом ЕС).

В соответствии с вариантом первого аспекта настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, причем указанное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, содержащую последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR, описанные в SEQ ID NO: 1, 17, 3, 4, 12 и 6 соответственно, и область Fc, которая содержит замену, которая приводит к повышению связывания с FcγR2B по сравнению с исходной молекулой,

которая не содержит замены. Соответственно, указанное антитело содержит последовательности VH и VL, описанные в SEQ ID NO: 18 и 14 соответственно.

Соответственно, указанное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO: 19, и/или легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16. В конкретном варианте осуществления указанное антитело содержит область Fc, которая содержит аспарагиновую кислоту в положении 236 (индекс ЕС). Соответственно, антитело представляет собой агонистическое антитело.

В конкретном варианте осуществления указанное антитело содержит область Fc, которая содержит аспарагиновую кислоту в положении 237 (индекс ЕС). Соответственно, антитело представляет собой агонистическое антитело.

В конкретном варианте осуществления указанное антитело содержит область Fc, которая содержит аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс ЕС). Соответственно, антитело представляет собой агонистическое антитело.

В конкретном варианте осуществления указанное антитело содержит область Fc, которая содержит аланин в положении 235 (индекс ЕС).

В конкретном варианте осуществления указанное антитело содержит область Fc, которая содержит аланин в положении 234 (индекс ЕС).

В конкретном варианте осуществления указанное антитело содержит область Fc, которая содержит аланин в положении 265 (индекс ЕС).

В конкретном варианте осуществления указанное антитело содержит область Fc, которая содержит глутаминовую кислоту в положении 267 (индекс ЕС).

В конкретном варианте осуществления указанное антитело содержит область Fc, которая содержит глицин в положении 271 (индекс ЕС).

В конкретном варианте осуществления указанное антитело содержит область Fc, которая содержит аланин в положении 297 (индекс ЕС).

В конкретном варианте осуществления указанное антитело содержит область Fc, которая содержит аланин в положении 322 (индекс ЕС).

В конкретном варианте осуществления указанное антитело содержит область Fc, которая содержит аргинин в положении 330 (индекс ЕС).

В конкретном варианте осуществления указанное антитело содержит область Fc, которая содержит аспарагиновую кислоту в положении 237 (индекс ЕС), аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс ЕС), глицин в положении 271 (индекс ЕС) и аргинин в положении 330 (индекс ЕС).

В конкретных вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения антитело обладает повышенным связыванием с FcγR2B по сравнению с исходной молекулой, в которой отсутствует замена в области Fc, т. е. одной или более из hIgG1 G236D, hIgG1 G237D, hIgG1 P238D, hIgG1 D265A, hIgG1 S267E, hIgG1 P271G, hIgG1 A330R, hIgG1 K322A, hIgG1 N297A, hIgG4 P238D, hIgG4 G237D, hIgG4 P271G, hIgG4 S330R, hIgG4 F234A и hIgG4 L235A.

В конкретных вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения антитело обладает повышенным связыванием с FcγR2B и пониженным связыванием с одним или более активирующими Fc-гамма-рецепторами, такими как FcγR2A или FcγR1A, по сравнению с исходной молекулой, в которой отсутствует замена в области Fc.

В конкретных вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения антитело обладает повышенным соотношением связывания с FcγR2B/FcγR2A по сравнению с исходной молекулой, в которой отсутствует замена в области Fc. Соответственно, повышенное соотношение связывания FcγR2B/FcγR2A является по меньшей мере 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,8, 2, 2,2, 2,5, 3, 3,5, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10-кратным по сравнению с исходной молекулой, которая не содержит замены в области Fc.

В конкретных вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения антитело обладает повышенным соотношением связывания с FcγR2B/FcγR1A по сравнению с исходной молекулой, в которой отсутствует замена в области Fc, по сравнению с последовательностью дикого типа. Соответственно, повышенное соотношение связывания FcγR2B/FcγR1A является по меньшей мере 1,1, 1,2, 1,5, 2, 5, 10,

50, 100, 150, 200, 250-кратным по сравнению с исходной молекулой, в которой отсутствует замена в области Fc.

Под «по сравнению с исходной молекулой, в которой отсутствует замена в области Fc», подразумевается сравнение с молекулой антитела, которая имеет аминокислотную последовательность, отличную от аминокислот, указанных в пунктах формулы, которые представляют замену в Fc относительно Fc дикого типа. Например, возможна любая из следующих замен: hIgG1 G236D, hIgG1 G237D, hIgG1 P238D, hIgG1 D265A, hIgG1 S267E, hIgG1 P271G, hIgG1 A330R, hIgG1 K322A, hIgG1 N297A, hIgG4 P238D, hIgG4 G237D, hIgG4 P271G, hIgG4 S330R, hIgG4 F234A и hIgG4 L235A. Таким образом, может быть измерено связывание молекулы антитела с указанной заменой Fc или без нее с Fc γ R2B, а также необязательно может быть измерено связывание молекулы антитела с указанной заменой Fc или без нее с активирующим Fc γ -рецептором, таким как Fc γ R2A или Fc γ R1A. Таким образом, например, если связывание с Fc γ R2B увеличилось в 1,5 раза по сравнению с исходной молекулой без замены, то это отображается как повышенная эффективность связывания 150% по сравнению с исходной молекулой. Если связывание с Fc γ R2A уменьшилось в 1,5 раза по сравнению с исходной молекулой без замены, то это отображается как эффективность связывания 67% по сравнению с исходной молекулой. Для этого примера молекулы антитела изменение соотношения связывания Fc γ R2B/Fc γ R2A будет составлять $150/67 = 2,24$ раза. Любое значение более 1 показывает, что молекула обладает повышенной избирательностью связывания с Fc γ R2B перед Fc γ R2A по сравнению с исходной молекулой.

В конкретных вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения антитело обладает повышенным соотношением связывания [KD связывания с Fc γ R1A] / [KD связывания с Fc γ R2B] по сравнению с исходной молекулой, в которой отсутствует замена в области Fc в сравнении с последовательностью дикого типа. Соответственно, отношение [KD связывания с Fc γ R1A] / [KD связывания с Fc γ R2B] для вариантной молекулы является по меньшей мере 1,1, 1,2, 1,5, 2, 5, 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 или 10000-кратным относительно отношения [KD связывания с Fc γ R1A] / [KD связывания с Fc γ R2B] для исходной молекулы, которая не содержит замены области Fc.

В конкретных вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения антитело обладает повышенным соотношением связывания [KD связывания с FcyR2A 131R] / [KD связывания с FcyR2B] по сравнению с исходной молекулой, в которой отсутствует замена в области Fc в сравнении с последовательностью дикого типа. Соответственно, соотношение [KD связывания с FcyR2A 131R] / [KD связывания с FcyR2B] для вариантной молекулы является по меньшей мере 1,1, 1,2, 1,5, 2, 5, 10, 50 или 100-кратным относительно соотношения [KD связывания с FcyR1A] / [KD связывания с FcyR2B] для исходной молекулы, которая не содержит замены области Fc.

В соответствии со вторым аспектом изобретения предложена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид тяжелой цепи и/или полипептид легкой цепи выделенного антитела по первому аспекту изобретения.

В соответствии с третьим аспектом изобретения предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по второму аспекту изобретения.

В соответствии с четвертым аспектом изобретения предложена клетка-хозяин, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом изобретения или вектор в соответствии с третьим аспектом изобретения.

В соответствии с пятым аспектом изобретения предложен способ получения антитела в соответствии с первым аспектом изобретения, включающий стадию культивирования клетки-хозяина четвертого аспекта изобретения в условиях продукции указанного антитела и необязательно выделение и/или очистку указанного антитела.

В соответствии с шестым аспектом изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и терапевтически эффективное количество антитела по первому аспекту изобретения или полученное в пятом аспекте изобретения.

В соответствии с седьмым аспектом изобретения предложен способ получения фармацевтической композиции, включающий добавление антитела в соответствии с первым аспектом изобретения или антитела, полученного в соответствии с пятым аспектом изобретения, в композицию, включающую по меньшей мере один

дополнительный компонент. В конкретном варианте осуществления по меньшей мере один дополнительный компонент представляет собой фармацевтически приемлемый эксципиент.

В соответствии с восьмым аспектом изобретения предложен набор, содержащий антитело в соответствии с первым аспектом изобретения или фармацевтическую композицию в соответствии с шестым аспектом изобретения. Соответственно, такой набор включает в себя вкладыш в упаковку, содержащий инструкции по применению.

В соответствии с девятым аспектом изобретения предложен способ лечения связанного с BTLA заболевания у пациента, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела по первому аспекту изобретения или фармацевтической композиции по шестому аспекту изобретения.

Соответственно, связанное с BTLA заболевание представляет собой аутоиммунное или воспалительное заболевание.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Авторы изобретения идентифицировали особенно сильные агонистические антитела к BTLA, которые, как предполагается, являются более эффективными, чем существующие антитела, при подавлении Т-клеточных ответов и, следовательно, особенно полезны при лечении опосредованных иммунной системой расстройств. Такие антитела содержат по меньшей мере одну замену в одной позиции области Fc молекулы, которая избирательно усиливает связывание с FcγR2B по сравнению с исходным полипептидом.

Соответственно, антитело содержит замену в одном или более из следующих положений (позиции по индексу ЕС): 234, 235, 236, 237, 238, 265, 267, 271, 297, 330 и 322.

Соответственно, антитело представляет собой IgG1 или IgG4 человека с одной или более аминокислотными заменами, выбранными из группы, состоящей из hIgG1 G236D, hIgG1 G237D, hIgG1 P238D, hIgG1 D265A, hIgG1 S267E, hIgG1 P271G, hIgG1 A330R, hIgG1 K322A, hIgG1 N297A, hIgG4 P238D, hIgG4 G237D, hIgG4 P271G, hIgG4 S330R, hIgG4 F234A и hIgG4 L235A, вся нумерация — по индексу ЕС.

Особенно подходящими являются модификации в одной или более из следующих позиций: 236, 237, 238 и 267 (индекс ЕС).

Кроме того, подходящими являются комбинации модификаций Fc. В конкретном варианте осуществления используют набор модификаций, называемый V9, в котором тяжелая цепь антитела содержит область Fc, которая содержит аспарагиновую кислоту в положении 237, аспарагиновую кислоту в положении 238, глицин в положении 271 и аргинин в положении 330 (нумерация в соответствии с индексом ЕС).

При введении замены P238D (индекс ЕС) в область Fc молекулы (т. е. антитела или его антигенсвязывающего фрагмента) молекула имеет усиленное связывание и индукцию сигнализации FcγR2B, но на уровне, который обеспечивает сохранение достаточного периода полужизни антитела *in vivo*.

В настоящем описании и в приложенных пунктах формулы изобретения формы единственного числа включают обозначения множественного числа, если иное четко не следует из содержания. Например, ссылка на «молекулу» необязательно включает комбинацию двух или более таких молекул и т. п.

Следует понимать, что везде, где аспекты в настоящем документе описаны с использованием формулировки «содержащий», также предусмотрены иные аналогичные аспекты, описанные с использованием терминов «состоящий из» и/или «состоящий по существу из».

Следует понимать, что одна, несколько или все характерные особенности различных вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, можно применить к любому аспекту, если только иное четко не следует из содержания. Кроме того, различные варианты осуществления можно комбинировать с образованием других вариантов осуществления настоящего изобретения. Эти и другие аспекты изобретения станут очевидными для специалиста в данной области техники. Эти и другие варианты осуществления изобретения дополнительно представлены в подробном описании ниже.

Все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, если не дано иное их определение, имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в данной области техники, к которой имеет отношение настоящее изобретение. Например, в Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; и Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press

для специалистов представлен общий словарь многих терминов, используемых в настоящем документе.

Используемый в настоящем документе термин «около» относится к обычному диапазону ошибок для соответствующего значения, хорошо известному специалисту в данной области техники. Ссылка на термин «около» в отношении значения или параметра в настоящем документе включает (и описывает) варианты осуществления, которые относятся к этому значению или параметру как таковому.

Аминокислоты в настоящем документе могут быть обозначены либо их общепринятыми трехбуквенными символами, либо с помощью однобуквенных символов, рекомендованных Комиссией по биохимической номенклатуре ИЮПАК-ИЮБ. Нуклеотиды также могут обозначаться своими общепринятыми однобуквенными кодами.

Карбоксиконцевой участок каждой цепи определяет константную область, главным образом ответственную за эффекторную функцию. Амино-концевая часть каждой цепи определяет переменную область, ответственную за связывание с антигеном. В публикации Kabat et al. (NIH Pub. No. 91/3242, p. 679-687; 1991) собраны многочисленные первичные последовательности переменных областей тяжелых цепей и легких цепей. На основании степени консервативности последовательностей авторы этой публикации разделили индивидуальные первичные последовательности на CDR и каркас и составили их список (см. Kabat et al., SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th edition, NIH publication, No. 91-3242, 1991)

Для идентифицированных CDR-областей антител используется, если не указано иное, определение по Kabat, представленное в публикации Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). Нумерация аминокислот в переменных доменах является порядковой, на основе последовательностей, представленных в перечне последовательностей.

В нумерации аминокислот в константных доменах, таких как C_L, C_H1, C_H2 и C_H3, используется, если не указано иное, нумерация индекса ЕС, описанная в публикации Kabat et al., (NIH Pub. No. 91/3242, p. 679-687; 1991), в данном документе обозначается как «индекс ЕС». Например, индекс ЕС используется для локализации замены в области Fc антител / их антигенсвязывающих фрагментов по данному изобретению. Например,

замена глицина (G) на аспарагиновую кислоту (D) в положении 236 (описывается как G236D) или пролина (P) на аспарагиновую кислоту (D) в положении 238 (описывается как P238D). Специалистам в области антител будет понятно, что указанная система нумерации состоит из непоследовательной нумерации в определенных областях последовательности иммуноглобулина, что позволяет нормировать ссылки на консервативные положения в семействах иммуноглобулинов. Соответственно, позиции в любом данном иммуноглобулине, определенные с помощью индекса ЕС, не обязательно соответствуют его порядковой последовательности.

Термины «аттенуатор В- и Т-лимфоцитов» и BTLA используются взаимозаменяемо и, если контекст не указывает иное, означают белок или ген (или другую нуклеиновую кислоту, кодирующую весь BTLA или его часть). Последовательности BTLA человека охватывают все изотипические и вариантные формы человека. Типичный пример полноразмерного BTLA человека описан в Genbank под учетным номером: AJ717664.1. Другая типичная полипептидная последовательность BTLA человека описана в SEQ ID NO: 225, которая отличается от последовательности AJ717664.1 лишь двумя природными вариантными однонуклеотидными полиморфизмами. Несмотря на аллельные вариации полипептидная последовательность BTLA человека обычно имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности (например, по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) с BTLA человека с SEQ ID NO: 225.

Типичный пример полноразмерного BTLA яванского макака (супо) описан в Genbank под учетным номером XP_005548224. Эталонная полипептидная последовательность BTLA яванского макака описана в SEQ ID NO: 226. Полипептидная последовательность BTLA яванского макака, как правило, имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности (например, по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) BTLA яванского макака, описанной в SEQ ID NO: 226.

Термин «идентичность последовательности» хорошо известен в данной области. Для целей настоящего изобретения, при определении того, соответствует ли последовательность-мишень заданному ограничению (например, 90% идентичности), считается, что она соответствует заданному пределу, если она идентифицируется как таковая с использованием алгоритма BLAST (Basic local alignment search tool) (см. Altschul

et al. J Mol Biol 215:403-410, 1990) или алгоритма Смита-Уотермана (см. Smith and Waterman. J Mol. Biol. 147:195-197, 1981).

Антитела (включая антигенсвязывающие фрагменты антител)

Антитело представляет собой молекулу иммуноглобулина, способную специфически связываться с мишенью, такой как белок, полипептид, пептид, углевод, полинуклеотид, липид или комбинации вышеперечисленного, посредством по меньшей мере одного сайта распознавания антигена, расположенного в переменном домене молекулы иммуноглобулина. В частности, в настоящем документе термин «антитело» охватывает интактные поликлональные антитела, интактные моноклональные антитела, мультиспецифические антитела, такие как биспецифические антитела, полученные из по меньшей мере двух интактных антител, химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела, любую другую модифицированную молекулу иммуноглобулина и любые их фрагменты, содержащие сайт распознавания антигена, при условии, что антитела проявляют желаемую биологическую активность. Антитело может быть получено из любого вида. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой человеческое антитело.

Используемый в настоящем документе термин «антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, которая специфически связывается с антигеном и содержит сайт связывания с FcR, который может быть или не быть функциональным. Термин охватывает целые антитела (такие как IgG1, IgG4 и т. п.) и их антигенсвязывающие фрагменты.

В настоящем документе агонистическим антителом к BTLA называется антитело (включая антигенсвязывающий фрагмент интактного антитела), которое связывается с BTLA и усиливает его ко-ингибирующий сигнал в Т- и/или В-клетках.

Антигенсвязывающим сайтом называется часть молекулы, которая связывается со всем антигеном-мишенью или его частью. В молекуле антитела он может называться антигенсвязывающим сайтом антитела и содержать часть антитела, которая специфически связывается со всем антигеном-мишенью или его частью. Если антиген является большим, антитело может связываться только с определенной частью антигена, которая называется эпитопом. Антигенсвязывающий сайт антитела может быть представлен одним или более переменными доменами антитела. Предпочтительно антигенсвязывающий сайт антитела

содержит вариабельную область легкой цепи антитела (VL) и вариабельную область тяжелой цепи антитела (VH).

Изобретение также охватывает антитела-фрагменты, которые содержат антигенсвязывающий сайт. Таким образом, термин «его антигенсвязывающий фрагмент» применительно к антителу относится к фрагментам антитела, таким как Fab, Fab', F(ab')₂, диатам, Fv-фрагментам и одноцепочечным Fv (scFv) мутантам, которые обладают сайтом распознавания антитела и, таким образом, способностью связываться с антигеном. Антигенсвязывающие фрагменты иммуноглобулина (антитела) хорошо известны в данной области техники. Такой фрагмент не обязательно должен иметь функциональный сайт связывания с Fc-рецептором. В конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит область Fc с заменой, выбранной из одной или более из следующих аминокислот: аланин (A) в положении 234, аланин (A) в положении 235, аспарагиновую кислоту (D) в положении 236, аспарагиновую кислоту (D) в положении 237, аспарагиновую кислоту (D) в положении 238, аланин (A) в положении 265, глутаминовую кислоту (E) в положении 267, глицин (G) в положении 271, аргинин (R) в положении 330, аланин (A) в положении 332 и аланин (A) в положении 297 (нумерация в соответствии с индексом ЕС). В одном конкретном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит область Fc с заменой G236D (индекс ЕС). В одном конкретном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит область Fc с заменой P238D (индекс ЕС). В конкретном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит область Fc, имеющий аспарагиновую кислоту в положении 237 (индекс ЕС), аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс ЕС), глицин в положении 271 (индекс ЕС) и аргинин в положении 330 (индекс ЕС).

Используемые в настоящем документе термины «молекулы-фрагменты антитела по настоящему изобретению», «фрагмент антитела» и «его антигенсвязывающий фрагмент» используются в данном документе взаимозаменяемо. В совокупности антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут называться антигенсвязывающей молекулой.

Используемый в настоящем документе термин «BTLA-связывающая молекула» относится как к антителам, так и их связывающим фрагментам, способным связываться с BTLA.

Существуют пять основных классов (т. е. изотипов) иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, а некоторые из них могут дополнительно подразделяться на подклассы (подтипы),

например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные области тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, обозначены как альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны. Если ограничения контекста не предполагают иного, антитела по настоящему изобретению могут принадлежать к одному из этих классов или подклассов антител. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам антител, как правило, обозначены соответствующими строчными греческими буквами α , δ , ϵ , γ и μ соответственно. Легкие цепи антител любых видов позвоночных можно отнести, в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов, к одному из двух четко различающихся типов, называемых каппа (κ) и лямбда (λ).

«Нативные антитела» обычно представляют собой гетеротетрамерные Y-образные гликопротеины массой около 150 000 дальтон, образованные двумя идентичными легкими (L) цепями и двумя идентичными тяжелыми (H) цепями. Каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью, тогда как число дисульфидных связей между тяжелыми цепями в различных изотипах иммуноглобулина варьирует. Каждая тяжелая и легкая цепь также обладает расположенными на равном расстоянии внутренними дисульфидными мостиками. Каждая тяжелая цепь имеет на одном конце переменный домен (VH), за которой идут несколько константных доменов. Каждая легкая цепь имеет на одном конце переменный домен (VL), а на другом своем конце – константный домен; константный домен легкой цепи находится напротив первого константного домена тяжелой цепи, а переменный домен легкой цепи находится напротив переменного домена тяжелой цепи. Считается, что конкретные аминокислотные остатки образуют границу раздела между переменными доменами легкой цепи и тяжелой цепи. Каждая тяжелая цепь содержит один переменный домен (VH) и константную область, которая в случае антител IgG, IgA и IgD содержит три домена: C_H1, C_H2 и C_H3 (IgM и IgE имеют четвертый домен, C_H4). В классах IgG, IgA и IgD домены C_H1 и C_H2 разделены гибкой шарнирной областью, которая представляет собой богатый пролином и цистеином сегмент переменной длины (от около 10 до около 60 аминокислот в различных подклассах IgG). Переменные домены как в легких, так и в тяжелых цепях соединены с константными доменами в области J, имеющей около 12 или более аминокислот, а тяжелая цепь также имеет область D из около 10 дополнительных

аминокислот. Каждый класс антител дополнительно содержит межцепочечные и внутрицепочечные дисульфидные связи, образованные парными остатками цистеина. Варибельная область тяжелой цепи (VH) и варибельная область легкой цепи (VL) могут быть дополнительно подразделены на области гиперварибельности, именуемые CDR, которые чередуются с более консервативными участками, которые называются каркасными областями (FR). Каждая VH и VL содержит три CDR и четыре FR, расположенные, от аминоконца до карбоксиконца, в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Варибельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Антитело изобретения может принадлежать любому животному, включая мышь, крысу, человека, или может иметь любое другое происхождение (включая химерные или гуманизированные антитела). В некоторых вариантах осуществления антитело является моноклональным, например моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело представляет собой человеческое или гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Нечеловеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть гуманизировано с помощью рекомбинантных методов для снижения его иммуногенности у человека.

Используемый в настоящем документе термин «моноклональное антитело» (мАт) относится к антителу, полученному из по существу однородной популяции антител, т. е. индивидуальные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных мутаций, например мутаций природного происхождения, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Таким образом, определение «моноклональный» указывает, что антитело или его фрагмент не является смесью отдельных антител или антигенсвязывающих фрагментов. мАт, как правило, является высокоспецифичным, направленным против одного сайта/эпитопа антигена, однако моноклональными антителами также может называться популяция по существу однородных молекул биспецифического антитела.

мАт могут быть получены гибридными, рекомбинантными, трансгенными или другими методами, известными специалистам в данной области техники. Например, моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением может быть получено гибридным способом, впервые описанным в Kohler and Milstein (Nature 256:495, 1975), или может быть получено методами рекомбинантной ДНК, например описанными в патентах США №№ 4,816,567 и 6,331,415. «Моноклональные антитела» могут быть также выделены из фаговых библиотек антител с использованием технологий, описанных, например, в публикациях *Clackson et al.*, *Nature* 1991; 352:624-628 и Marks et al., *J. Mol. Biol.* 1991; 222:581-597.

Термин «моноклональный» также может использоваться применительно к антигенсвязывающим фрагментам антитела по изобретению. Это просто означает, что молекула продуцируется или присутствует в форме одного клона.

Термин «человеческое» антитело (HumAb) относится к антителу, имеющему переменные области, в которых как каркасные области, так и CDR-области происходят из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Кроме этого, если антитело содержит константную область, то константная область также получена из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Человеческие антитела могут включать остатки аминокислот, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфичным мутагенезом *in vitro*, или соматической мутацией *in vivo*). Однако термин «антитело человека», в контексте настоящего документа, не предполагает включения антител, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были встроены в каркасные последовательности человека.

Человеческие антитела можно получать путем введения иммуногена/антигена трансгенному животному, которое было модифицировано таким образом, чтобы продуцировать интактные человеческие антитела или интактные антитела с человеческими переменными областями в ответ на антигенную стимуляцию, но эндогенные локусы которого были деактивированы, например иммунизированным ксеномышам (описание технологии XENOMOUSE (товарный знак) см., например, в патентах США №№ 6,075,181 и 6,150,584). См. также, например, Li et al., *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA, 103:3557–3562 (2006), где приведена информация о человеческих антителах, полученных с использованием технологии человеческой В-клеточной гибридомы. Такие животные обычно содержат все или часть локусов иммуноглобулинов человека, которые заменяют эндогенные локусы иммуноглобулинов, или которые присутствуют вне хромосом, или интегрируются случайным образом в хромосомы животного. У таких трансгенных мышей эндогенные локусы иммуноглобулинов обычно инактивируются. Обзор способов получения антител человека из трансгенных животных см. в Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005). См. также, например, патенты США №№ 6,075,181 и 6,150,584, в которых описана технология XENOMOUSE™; патент США № 5,770,429, в котором описана технология HUMAB™; патент США № 7,041,870, в котором описана технология K-M MOUSE™, и опубликованную заявку на патент США № US2007/0061900, в которой описана технология VELOCIMOUSE™. Человеческие переменные области из интактных антител, образованных такими животными, можно дополнительно модифицировать, например путем объединения с разными человеческими константными областями.

Антитела человека также можно получать с помощью способов на основе гибридом. Описаны линии клеток миеломы человека и гетеромиеломы мыши и человека для продуцирования моноклональных антител человека. (См., например, Kozbor J. Immunol, 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); and Boerner et al., J. Immunol., 147:86 (1991)) Human antibodies generated via human B-cell hybridoma technology are also described in Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006). Дополнительные способы включают способы, описанные, например, в патенте США № 7,189,826 (описывающем получение моноклональных антител IgM человека из линий гибридомных клеток) и в публикации Ni, Xiandai Mianyixue, 26:265-268 (2006) (описывающей гибридомы человек-человек). Технология с применением человеческих гибридом (технология Trioma) также описана в Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20:927-937 (2005) и Vollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27:185-91 (2005).

Термины «человеческие антитела» и «полностью человеческие антитела» используются как синонимы. Из данного определения человеческого антитела, в частности, исключено гуманизированное антитело, содержащее нечеловеческие антигенсвязывающие остатки.

Используемый в данном документе термин «гуманизированное антитело» относится к антителу, в котором некоторые, большинство или все аминокислоты за пределами CDR нечеловеческого антитела, замещены соответствующими аминокислотами, полученными из иммуноглобулинов человека. В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины (антитело-реципиент), в которых остатки CDR реципиента заменены остатками CDR не относящегося к человеку вида (антитело-донор), например мыши, крысы или кролика, обладающей желаемой специфичностью, аффинностью и емкостью. Гуманизированное антитело может содержать остатки, которые не находятся ни в реципиентном антителе, ни в импортированных CDR или каркасных последовательностях, но включены для дальнейшего уточнения и оптимизации характеристик антитела. В одном варианте осуществления гуманизированной формы антитела некоторые, большинство или все аминокислоты за пределами CDR были заменены аминокислотами из иммуноглобулинов человека, тогда как некоторые, большинство или все аминокислоты в одной или более областях CDR не изменены. Небольшие добавления, делеции, вставки, замены или модификации аминокислот являются допустимыми, при условии, что они не устраняют способность антитела связываться с конкретным антигеном. «Гуманизированное» антитело сохраняет антигенную специфичность, сходную с исходным антителом. Как правило, гуманизированное антитело будет содержать по существу все из по меньшей мере одного, а обычно двух переменных доменов, в которых все или по существу все из гиперпеременных петель соответствуют таковым в нечеловеческом иммуноглобулине, а все или по существу все каркасные области представляют собой последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело необязательно будет также содержать по меньшей мере участок константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило человеческого иммуноглобулина. Для получения более подробной информации см., например, Jones et al, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al, *Nature* 332:323-329 (1988); и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). См. также, например, Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994); и

патенты США №№ 6,982,321 и 7,087,409. Соответственно, Fc будет содержать мутацию замены P238D (по нумерации «индекса ЕС») для усиления специфичности связывания с FcγR2B.

В настоящем документе Fc или область Fc называется константная область антитела или антителоподобной молекулы, исключая домен первой константной области иммуноглобулина. Таким образом, Fc относится к последним двум доменам константной области иммуноглобулина IgA, IgD и IgG и последним трем доменам константной области иммуноглобулина IgE и IgM и гибкой шарнирной области, расположенной на N-конце этих доменов. В случае IgG Fc включает в себя домены иммуноглобулина C-гамма2 и C-гамма3 (Cγ2 и Cγ3) и шарнирную область между C-гамма1 (Cγ1) и Cγ2. В случае IgA и IgM Fc может включать в себя J-цепь.

Используемый в настоящем документе термин «сконструированное антитело» относится к антителу, которое может представлять собой гуманизированное антитело, в котором конкретные остатки были заменены другими, чтобы уменьшить неблагоприятное воздействие или свойство. Такая замена может находиться в пределах домена CD. Например, как описано в данном документе (см. пример 21), CDRH2 гуманизированного антитела 3E8 модифицировали с помощью замены N57Q для устранения потенциала дезамидирования и/или с помощью замены K63S для снижения прогнозируемой иммуногенности. Нумерация в этом случае является порядковой с отсылкой на указанный идентификатор последовательности.

«Химерным антителом» называется антитело, в котором переменные области происходят из одного вида, а константные области происходят от других видов, например, антитело, в котором переменные области происходят из антитела мыши, а константные области происходят из антитела человека, или наоборот. Термин также охватывает антитело, содержащее V-область от одного субъекта одного вида (например, от первой мыши) и константную область от другого субъекта того же вида (например, второй мыши). Термин «антиген (Ag)» относится к молекулярному объекту, применяемому для иммунизации иммунокомпетентных позвоночных с получением антитела (At), что распознает Ag, или для скрининга экспрессионной библиотеки (например, среди прочего, библиотеки фагового, дрожжевого или рибосомного дисплея). В настоящем документе термин Ag используется более широко, и, как правило, подразумевает молекулы-мишени,

которые специфически распознаются Ат, и, таким образом, включает участки или имитаторы молекулы, используемой в процессе иммунизации для генерации Ат или скрининга библиотеки для выбора Ат.

«Биспецифическое антитело» или «бифункциональное антитело» представляет собой искусственное гибридное антитело, имеющее две разные пары тяжелая цепь / легкая цепь и два разных сайта связывания. Обычно рекомбинантная продукция биспецифических антител основана на совместной экспрессии двух пар тяжелая цепь / легкая цепь иммуноглобулинов, причем две тяжелые цепи обладают различными видами специфичности (Milstein and Cuello, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Способы получения биспецифических антител входят в сферу компетенции специалистов в данной области. Например, биспецифические антитела могут быть получены различными способами, включая слияние гибридом или соединение фрагментов Fab'. См., например, Songsivilai, et al, (1990) *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321, Kostelny, et al, (1992) *J Immunol.* 148:1547-1553. Кроме того, биспецифические антитела могут быть выполнены как «дидантели» (Holliger, et al, (1993) *PNAS USA* 90:6444-6448) или как «янусины» (Traunecker, et al, (1991) *EMBO J.* 10:3655-3659 and Traunecker, et al, (1992) *Int. J. Cancer Suppl.* 7:51-52). Полноразмерные биспецифические антитела можно получать, например, путем обмена Fab-плечами (или обмена полумолекулами) между двумя моноспецифическими двухвалентными антителами, посредством введения в СНЗ-интерфейс тяжелой цепи в каждой полумолекуле замен, способствующих образованию гетеродимера из двух полумолекул антител, имеющих разную специфичность, либо *in vitro* в бесклеточной среде, либо с использованием совместной экспрессии. Реакция обмена Fab-плечами является результатом реакции изомеризации дисульфидного мостика и диссоциации-ассоциации СНЗ-доменов. Восстанавливаются дисульфидные связи тяжелых цепей в шарнирных участках исходных моноспецифических антител. Полученные свободные цистеины одного из исходных моноспецифических антител образуют дисульфидный мостик тяжелых цепей с цистеиновыми остатками второй исходной молекулы моноспецифического антитела, и одновременно происходит высвобождение СНЗ-доменов исходных антител и переформирование путем диссоциации-ассоциации. СНЗ-домены Fab-плеч можно конструировать с возможностью обеспечения скорее гетеродимеризации, чем гомодимеризации. Полученный продукт представляет собой биспецифическое антитело, имеющее два Fab-плеча или полумолекулы, каждая из которых связывается с отдельным

эпитопом. Для получения полноразмерных биспецифических антител можно использовать стратегию «выступ во впадину» (см., например, международную публикацию РСТ № WO 2006/028936). Вкратце, выбранные аминокислоты, образующие интерфейс между СНЗ-доменами в человеческом IgG, можно подвергать мутации в положениях, влияющих на взаимодействия СНЗ-доменов, чтобы способствовать образованию гетеродимера. Аминокислоту с короткой боковой цепью (впадина) вводят в тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с первым антигеном, а аминокислоту с длинной боковой цепью (выступ) вводят в тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося со вторым антигеном. После совместной экспрессии двух антител в результате предпочтительного взаимодействия тяжелой цепи с «впадиной» и тяжелой цепи с «выступом» образуется гетеродимер. Примерами пар замен в СНЗ, образующих выступ и впадину, являются следующие (указаны как модифицированное положение в первом домене СНЗ первой тяжелой цепи / модифицированное положение во втором домене СНЗ второй тяжелой цепи): T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S и T366W/T366S_L368A_Y407V.

Биспецифические антитела также можно создавать *in vitro* в бесклеточной среде, вводя асимметричные мутации в области СНЗ двух моноспецифических гомодимерных антител и образуя биспецифическое гетеродимерное антитело из двух исходных моноспецифических гомодимерных антител в восстановительных условиях для обеспечения изомеризации дисульфидной связи, в соответствии со способами, описанными в международной публикации патента № WO2011/131746. Еще одна стратегия получения биспецифических антител включает стимулирование гетеродимеризации тяжелых цепей с использованием электростатических взаимодействий путем введения замен положительно заряженных остатков на одной поверхности СНЗ и отрицательно заряженных остатков на другой поверхности СНЗ, как описано в патентной публикации США № US2010/0015133; патентной публикации США № US2009/0182127; патентной публикации США № US2010/028637 или патентной публикации США № US2011/0123532.

Соответственно, одна из двух полумолекул антитела в биспецифической молекуле представляет собой антитело к ВТЛА по настоящему изобретению. Предпочтительно

биспецифическое антитело содержит одно связывающее плечо, которое содержит антигенсвязывающую область к ВТЛА, как описано в данном документе, и второе связывающее плечо, которое содержит область для связывания с другим антигеном (например, с другим эпитопом антигена ВТЛА или совершенно другим белком), и при этом молекула содержит область Fc, которая содержит одну или более из следующих аминокислот: аланин (A) в положении 234, аланин (A) в положении 235, аспарагиновую кислоту (D) в положении 236, аспарагиновую кислоту (D) в положении 237, аспарагиновую кислоту (D) в положении 238, аланин (A) в положении 265, глутаминовую кислоту (E) в положении 267, глицин (G) в положении 271, аргинин (R) в положении 330, аланин (A) в положении 332 и аланин (A) в положении 297 (нумерация в соответствии с индексом ЕС).

По существу термин «эпитоп» относится к области или участку антигена, с которым специфически связывается антитело, т. е. область или участок, находящийся в физическом контакте с антителом. Таким образом, термин «эпитоп» относится к участку молекулы, который может распознаваться антителом и связываться с ним в одном или более антигенсвязывающих областях антитела. Как правило, эпитоп определяется в контексте молекулярного взаимодействия между антителом или его антигенсвязывающим участком (Ат) и его соответствующим антигеном. Эпитопы часто состоят из поверхностно расположенной группы молекул, таких как аминокислотные или сахарные боковые цепи, а также имеют специфическую трехмерную структуру и специфические зарядовые характеристики. В некоторых вариантах осуществления эпитоп может представлять собой эпитоп белка. Эпитоп может быть линейным или конформационным. В линейном эпитопе все точки взаимодействия между белком и взаимодействующей с ним молекулой (такой как антитело) расположены линейно вдоль первичной аминокислотной последовательности белка. «Нелинейный эпитоп» или «конформационный эпитоп» содержит несмежные полипептиды (или аминокислоты) в пределах антигенного белка, с которым связывается антитело, специфическое к эпитопу. Используемый в настоящем документе термин «антигенный эпитоп» определяется как участок антигена, с которым специфически связывается антитело, что определено любым способом, хорошо известным в данной области, например, обычными иммунологическими анализами.

Антитело, которое «специфически связывается» с эпитопом, — термин, который хорошо известен в данной области, и способы определения такого специфического связывания также хорошо известны в данной области. Подразумевается, что молекула проявляет «специфическое связывание», если она реагирует или ассоциируется чаще, быстрее, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью с конкретной клеткой, белком или веществом, чем с альтернативными клетками, белками или веществами.

Для выбора антитела или белка, который специфически связывается с представляющей интерес молекулой, можно использовать различные форматы анализа. Например, для идентификации антитела, специфически связывающегося с антигеном или рецептором, или его лиганд-связывающим участком, который специфически связывается с узнаваемым лигандом или партнером по связыванию, можно использовать многие виды анализа и, в числе прочего, твердофазный ИФА, иммунопреципитацию, Biacore™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ, США), KinExA, цитометрию посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS), Octet™ (ForteBio, Inc., Menlo Park, CA, США) и вестерн-блоттинг. Как правило, специфическая или избирательная реакция будет превышать фоновый сигнал или шум по меньшей мере в два раза, более типично более чем в 10 раз, еще более типично более чем в 50 раз, более типично более чем в 100 раз, еще более типично более чем в 500 раз, еще более типично более чем в 1000 раз и еще более типично более чем 10 000 раз превышать фоновый сигнал. Кроме того, подразумевается, что антитело «специфически связывается» с антигеном, когда равновесная константа диссоциации (K_D или KD , используется в настоящем документе взаимозаменяемо) составляет < 7 нМ.

В некоторых вариантах осуществления настоящего описания предложен химерный антигенный рецептор, содержащий антигенсвязывающий фрагмент антитела, связывающего BTLA, описанный в данном документе, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен. Термины «химерный антигенный рецептор» (CAR), «искусственный Т-клеточный рецептор», «химерный Т-клеточный рецептор» или «химерный иммунорецептор» в настоящем документе относятся к сконструированному рецептору, который придает произвольную специфичность эффекторной иммунной клетке. CAR обычно имеют внеклеточный домен (эктодомен), который содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен (эндодомен). Термин «сигнальный домен» относится к функциональному участку белка,

который действует путем передачи информации внутри клетки для регуляции клеточной активности через определенные сигнальные пути с генерацией вторичных мессенджеров или функционированием в качестве эффекторов с ответом на такие мессенджеры.

Модификации Fc-гамма

У людей в семействе белков FcγR представлены изоформы FcγR1A (CD64A), FcγR2A (CD32A), FcγR2B (CD32B), FcγR3A (CD16A) и FcγR3B (CD16B), а также отмечены различные аллотипы этих рецепторов (Jefferis and Lund, Immunology Letters 82(1–2): 57–65, 2002). FcγR1A, FcγR2A и FcγR3A называются активирующими FcγR, поскольку они обладают иммунологически активными функциями, и FcγR2B называется ингибирующим FcγR, поскольку он обладает иммуносупрессивными функциями (Smith and Clatworthy, Nat Rev Immunol, 10(5), 328–343, 2010). В литературе и в данном документе FcγR1A также может называться FcγR1.

Если активация FcγR инициируется связыванием с областью Fc антитела, это приводит к фосфорилированию активирующих тирозиновых мотивов иммунорецептора (ITAM), содержащихся в внутриклеточном домене или общей γ-цепи FcR (партнер по взаимодействию), и запуску воспалительного иммунного ответа путем инициации каскада активации (Nimmerjahn and Ravetch, Nat Rev Immunol 8(1): 34–47, 2008). Если при связывании с областью Fc антитела запускается ингибирующий рецептор FcγR2B, это приводит к фосфорилированию ингибирующих тирозиновых мотивов иммунорецептора (ITIM) в цитоплазматическом хвосте с последующим рекрутированием SH2-содержащей инозитолполифосфат-5-фосфатазы (SHIP1), что в свою очередь ингибирует трансдукцию по другим активирующим сигнальным каскадам и, таким образом, подавляет воспалительный иммунный ответ (Ravetch and Lanier, Science 290(5489): 84–89, 2000).

FcγR2B является единственным FcγR, экспрессируемым на В-клетках (Amigorena et al. European Journal of Immunology 19(8): 1379–85, 1989). Отмечено, что взаимодействие области Fc антитела с FcγR2B ингибирует передачу сигналов через В-клеточный рецептор, подавляя пролиферацию В-клеток и продукцию антител (Nimmerjahn and Ravetch, Advances in immunology 96: 179–204, 2007). В тех типах клеток, которые экспрессируют как активирующий, так и ингибирующий FcγR (такие как макрофаги, дендритные клетки (DC), нейтрофилы, тучные клетки и базофилы), порог сигнализации и результат

задействования рецепторов FcγR определяется балансом активирующей и ингибиторной активации FcγR (Nimmerjahn and Ravetch, *Science* 310(5753): 1510–12, 2005).

Важная регуляторная функция FcγR2B была продемонстрирована в исследовании мышей с нокаутом FcγR2B, которые обладают повышенной восприимчивостью к аутоиммунному заболеванию (Nakamura et al. *Journal of Experimental Medicine* 191(5): 899–906, 2000).

Кроме того, полиморфизм в гене FcγR2B у людей связан с риском аутоиммунного заболевания, в частности системной красной волчанки (Floto et al. *Nature Medicine* 11(10), 2005). Таким образом, считается, что FcγR2B играет ключевую роль контроле иммунных ответов и представляет собой многообещающую молекулу-мишень для борьбы с аутоиммунными и воспалительными заболеваниями.

Известно, что IgG1 и IgG4, чаще всего используемые для доступных в продаже фармацевтических препаратов изотипы антител, связываются не только с FcγR2B, но также сильно связываются с активирующими FcγR (Bruhns et al. *Blood* 113(16): 3716–25, 2009). Возможна разработка антительных фармацевтических препаратов, имеющих более иммуносупрессивные свойства по сравнению с характеристиками IgG1 или IgG4, с использованием области Fc с улучшенным связыванием с FcγR2B или улучшенной избирательностью связывания с FcγR2B по сравнению с активирующими FcγR.

Описаны антитела, имеющие Fc с улучшенной активностью связывания с FcγR2B (Chu et al. *Molecular Immunology* 45(15): 3926–33, 2008). В настоящем документе активность связывания с FcγR2B улучшалась путем добавления изменений, таких как S267E/L328F, G236D/S267E и S239D/S267E, в область Fc антитела. Среди них антитело с введенной мутацией S267E/L328F сильнее всего связывается с FcγR2B и обеспечивает тот же уровень связывания с FcγR1A и FcγR2A (аллотип 131H), что и у встречающегося в природе IgG1. Однако в другой публикации показано, что это изменение усиливает связывание с FcγR2A 131R в несколько сотен раз до того же уровня, что и связывание с FcγR2B, что означает, что селективность связывания с FcγR2B не улучшается по сравнению с FcγR2A 131R (патентная публикация США № 2009/0136485). В дополнение к воспалительным эффектам связывание антитела с FcγR2A может приводить к активации тромбоцитов, приводя к тромбозам и тромбоэмболическим явлениям, что показано в контексте терапевтического антитела бевацизумаб (Meyer et al. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 7(1): 171–81, 2009; Scappaticci et al. *Journal of the National Cancer Institute* 99(16): 1232–39, 2007) и антител,

нацеленных на лиганд CD40 (Boumpas et al. *Arthritis and rheumatism* 48(3): 719–27, 2003; Robles-Carrillo et al. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 185(3): 1577–83, 2010). Кроме того, отмечено, что антитела с улучшенным связыванием с FcγR2A усиливают опосредованный макрофагами антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) (Richards et al. *Molecular Cancer Therapeutics* 7(8): 2517–27, 2008). Если антигены антитела фагоцитируются макрофагами, это также приводит к одновременному фагоцитозу самих антител. В этом случае пептидные фрагменты, происходящие из этих антител, также презентуются в виде антигена, и антигенность может стать более высокой с повышением тем самым риска продукции антител против антител (против лекарственных антител). Более конкретно, усиление связывания с FcγR2A приведет к повышению риска продукции антител против антител, и это приведет к значительному снижению их пользы в качестве фармацевтических препаратов. Следовательно, антитела с избирательным связыванием с FcγR2B и пониженным связыванием с FcγR2A могут представлять собой более эффективные иммуносупрессивные средства, а также лучше переносимые терапевтические средства с меньшим риском индукции тромбоэмболических явлений и более низкой иммуногенностью.

Таким образом, чтобы агонистическое антитело к BTLA было эффективным при подавлении иммунных ответов без индукции воспалительной сигнализации FcR, авторы изобретения предлагают адаптировать антитело для избирательного связывания Fc с FcγR2B.

Молекулы с более избирательным связыванием с FcγR2B будут способствовать двусторонней ингибирующей сигнализации через BTLA на экспрессирующей BTLA клетке и через FcγR2B на экспрессирующей FcγR2B клетке, что будет способствовать иммуносупрессивному действию антитела. Это было бы желательно для терапевтического антитела, предназначенного для лечения заболеваний, связанных с гиперактивацией иммунитета.

Однако очень высокая аффинность к FcγR2B может отрицательно влиять на период полужизни антител из-за оборота рецептора в синусоидальных эпителиальных клетках печени (Ganesan et al. *The Journal of Immunology* 189(10): 4981–88, 2012), что продемонстрировано на имеющем усиленное связывание с FcγR2B антителе IgG1

XmAb7195, что связывается с FcγR2B с KD 7,74 нМ (Chu et al. Journal of Allergy and Clinical Immunology 129(4): 1102–15, 2012; <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674911018343> (May 13, 2020) и, по сообщению Xencor, имеет средний период полужизни *in vivo* 3,9 дня в исследовании фазы 1a (American Thoracic Society (ATS) 2016 International Conference in San Francisco, CA - A6476: Poster Board Number 407), по сравнению со средним периодом полужизни около 21 дня для IgG1 дикого типа (Morell, Terry, and Waldmann. Journal of Clinical Investigation 49(4): 673–80, 1970; <http://www.jci.org/articles/view/106279> (May 16, 2020)). Таким образом, в контексте настоящего изобретения, хотя избирательность для FcγR2B и достаточное связывание для обеспечения агонистичности могут быть желательными для агонистического антитела к BTLA, чрезмерно высокая аффинность к FcγR2B может быть нежелательной для терапевтического применения, поскольку возникающий при этом укороченный период полужизни будет требовать более частого введения доз.

Различные мутации, включая аминокислотные замены, могут быть включены в константную область тяжелой цепи антитела для модификации передачи сигналов через один или более рецепторов Fcγ. В публикации WO2006/019447 (Xencor) описаны различные варианты молекул Fc (например, антител) с измененной эффекторной функцией посредством аминокислотной замены в области Fc.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что включение мутации по типу замены P238D в агонистическое антитело к BTLA по данному изобретению усиливает избирательность связывания и передачу сигналов через FcγR2B без значительного уменьшения периода полужизни антитела *in vivo*.

Хотя в область Fc можно вводить другие модификации (такие как аминокислотные замены), в конкретном варианте осуществления модификация P238D является единственной, вводимой в BTLA-связывающие молекулы по настоящему изобретению относительно последовательности Fc иммуноглобулина дикого типа.

В одном варианте осуществления антитело содержит аспарагиновую кислоту в положении, соответствующем положению 238 IgG1 (по индексу EC). Соответственно, антитело изобретения содержит константную область hIgG1, описанную в SEQ ID NO:

227, или область, содержащую до 5 аминокислотных модификаций, при условии, что присутствует замена P238D.

В одном варианте осуществления антитело содержит аспарагиновую кислоту в положении, соответствующем положению 238 IgG4 (по индексу ЕС). Соответственно, антитело изобретения содержит константную область hIgG4, описанную в SEQ ID NO: 235, или область, содержащую до 5 аминокислотных модификаций, при условии, что присутствует замена P238D.

Антитела по данному изобретению способствуют двусторонней ингибирующей сигнализации через BTLA на экспрессирующей BTLA клетке и через FcγR2B на экспрессирующей FcγR2B клетке, и они обладают периодом полужизни *in vivo*, достаточным для соответствующего терапевтического применения. Соответственно, период полужизни *in vivo* составляет по меньшей мере 5 дней, например по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более дней в организме человека. В конкретном варианте осуществления период полужизни *in vivo* у человека составляет по меньшей мере 10 дней, что обеспечивает подходящий режим дозирования, например 3 раза в неделю. Соответственно, период полужизни *in vivo* составляет от приблизительно 10 до 30, например от приблизительно 12 до 20 или от 14 до 25 дней.

В конкретном варианте осуществления изобретения антитело изобретения демонстрирует период полужизни *in vivo* в пределах ± 3 дней от периода полужизни сопоставимого контрольного антитела, который содержит область Fc дикого типа. Сравнимое контрольное антитело представляет собой антитело, которое имеет ту же тяжелую и легкую цепь, за исключением модификации (-ий) Fc, которая увеличивает связывание с FcγR2B, как описано в данном документе.

В конкретном варианте осуществления изобретения антитело изобретения демонстрирует период полужизни *in vivo*, который сохраняет по меньшей мере 50%, например по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% периода полужизни сопоставимого контрольного антитела, которое содержит область Fc дикого типа. Сравнимое контрольное антитело представляет собой антитело, которое имеет ту же тяжелую и легкую цепь, за исключением модификации (-ий) Fc, которая увеличивает связывание с FcγR2B, как описано в данном документе.

Если модификация Fc, которая увеличивает связывание с FcγR2B, представляет собой замену P238D, в конкретном варианте осуществления антитело изобретения демонстрирует период полужизни *in vivo* в пределах ± 3 дней от периода полужизни сопоставимого контрольного антитела, которое содержит область Fc, имеющую пролин в положении 238 (индекс ЕС).

В другом конкретном варианте осуществления, когда модификация Fc, которая увеличивает связывание с FcγR2B, представляет собой замену P238D, антитело изобретения демонстрирует период полужизни *in vivo*, который сохраняет по меньшей мере 50%, например по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% по меньшей мере 90% периода полужизни исходного антитела, которое содержит область Fc, содержащую пролин в положении 238 (индекс ЕС).

Чем больше период полужизни, тем больше период, в течение которого достигается хорошая занятость рецептора. Следовательно, это означает более длительный интервал между дозами, или альтернативно более длительный период полужизни позволит давать более низкую дозу, что может быть важным при наличии ограничивающей дозу токсичности при более высоких пиковых дозах.

Получение антитела с длительным периодом полужизни может также иметь преимущества, такие как снижение стоимости товара, уменьшение нагрузки от лечения на пациента и улучшение соблюдения пациентом режима лечения.

Соответственно, молекулы настоящего изобретения способны обеспечить занятость рецептора $> 80\%$ в течение по меньшей мере 10, например 14, 21, 28, 35, 42 или более дней после однократного введения дозы 10 мг/кг.

Соответственно, молекулы настоящего изобретения можно вводить с интервалом доз 3 недели, в идеале 4 или более недель, например каждые 6 или 8 недель.

В соответствии с первым аспектом изобретения предлагается антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, причем указанное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом указанная тяжелая цепь содержит область Fc, которая содержит замену, которая приводит к повышению связывания с FcγR2B по

сравнению с исходной молекулой, которая не содержит замены. Соответственно, антитело представляет собой выделенное антитело.

В некоторых вариантах осуществления антитело имеет повышенное связывание с FcγR2B по сравнению с исходной молекулой таким образом, что величина [KD исходного полипептида к FcγR2B] / [KD вариантного полипептида к FcγR2B] составляет более 1, например более 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 2,5, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 или 100.

В некоторых вариантах осуществления указанное антитело имеет избирательность связывания с FcγR2B по сравнению с FcγR2A.

В некоторых вариантах осуществления антитело имеет повышенную активность связывания с FcγR2B и сохраненную или сниженную активность связывания с FcγR2A (тип R) и/или FcγR2A (тип H) по сравнению с исходным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления величина [KD вариантного полипептида к FcγR2A (тип R)] / [KD вариантного полипептида к FcγR2B] составляет 2 или более, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более. В некоторых вариантах осуществления величина [KD вариантного полипептида к FcγR2A (тип H)] / [KD вариантного полипептида к FcγR2B] составляет 2 или более, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 или 150 или более.

В некоторых вариантах осуществления антитело обладает повышенной активностью связывания с FcγR2B и сохраненную или сниженную активность связывания с FcγR1A по сравнению с исходным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления величина [KD вариантного полипептида к FcγR1A] / [KD вариантного полипептида к FcγR2B] составляет 0,05 или более, например, по меньшей мере 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 2, 3, 4 или более.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело имеет сниженную активность связывания с Fcγ1 по сравнению с исходным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления изобретения величина [KD- вариантного полипептида к FcγR1A] / [KD исходного полипептида к FcγR1A] составляет по меньшей мере 10, 20, 50, 100, 200.

В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: D52, P53, E55, E57, E83, Q86, E103, L106 и E92 (положение в соответствии с SEQ ID NO:225). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: Y39, K41, R42, Q43, E45 и S47 (положение в соответствии с SEQ ID NO:225). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: D35, T78, K81, S121 и L123 (положение в соответствии с SEQ ID NO:225). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком H68 BTLA человека (положение в соответствии с SEQ ID NO:225). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: N65 и A64 (положение в соответствии с SEQ ID NO:225).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, причем указанная тяжелая цепь содержит область Fc, которая содержит одну или более из следующих аминокислот: аланин (A) в положении 234, аланин (A) в положении 235, аспарагиновую кислоту (D) в положении 236, аспарагиновую кислоту (D) в положении 237, аспарагиновую кислоту (D) в положении 238, аланин (A) в положении 265, глутаминовую кислоту (E) в положении 267, глицин (G) в положении 271, аргинин (R) в положении 330, аланин (A) в положении 332 и аланин (A) в положении 297 (нумерация в соответствии с индексом ЕС). Соответственно, антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, представляет собой агонистическое антитело / антигенсвязывающий фрагмент.

Соответственно, антитело представляет собой IgG1 или IgG4 человека с одной или более аминокислотными заменами, выбранными из группы, состоящей из hIgG1 G236D, hIgG1 G237D, hIgG1 P238D, hIgG1 D265A, hIgG1 S267E, hIgG1 P271G, hIgG1 A330R, hIgG1 K322A, hIgG1 N297A, hIgG4 P238D, hIgG4 G237D, hIgG4 P271G, hIgG4 S330R, hIgG4 F234A и hIgG4 L235A. В конкретных вариантах осуществления антитело, которое связывается с BTLA человека, имеет тяжелую цепь и/или легкую цепь с по меньшей мере одной CDR из антитела, выбранного из группы, состоящей из: 6.2, 2.8.6, 3E8, 11.5.1, 12F11, 14D4, 15B6, 15C6, 16E1, 16F10, 16H2, 1H6, 21C7, 24H7, 26B1, 26F3, 27G9, 3A9, 4B1, 4D3, 4D5, 4E8, 4H4, 6G8, 7A1, 8B4, 8C4 и 831, как представлено в таблице 1 или таблице 2 и описано в данном документе. В одном варианте осуществления антитело конкурирует за

связывание с BTLA с его природным лигандом HVEM. В другом варианте осуществления антитело не влияет на связывание с HVEM.

В конкретных вариантах осуществления выделенное антитело, которое связывается с BTLA человека, выбрано из группы, состоящей из 6.2, 2.8.6, 3E8 или антитела, которое конкурирует за связывание с BTLA человека с любым из 6.2, 2.8.6 или 3E8, причем антитело специфически связывается с BTLA и индуцирует передачу сигналов через рецептор. Указанное антитело также содержит область Fc, которая содержит аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс EC).

Под «антителом, выбранным из группы, состоящей из: 6.2, 2.8.6, 3E8, 11.5.1, 12F11, 14D4, 15B6, 15C6, 16E1, 16F10, 16H2, 1H6, 21C7, 24H7, 26B1, 26F3, 27G9, 3A9, 4B1, 4D3, 4D5, 4E8, 4H4, 6G8, 7A1, 8B4, 8C4 и 831, как представлено в таблице 1 и описано в настоящем документе», понимается любое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который содержит одно или более, например, VH CDR 1, 2 и 3, или VL CDR 1, 2 и 3, или VH CDR 1, 2 и 3 и VL CDR 1, 2 и 3, из любого из антител, представленных в таблицах 1 или 2 (мышинное, гуманизированное или гуманизированное/сконструированное).

В соответствии с вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее по меньшей мере одну VH CDR, которая имеет аминокислотную последовательность, описанную в любой из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 17, с 0–3 аминокислотными модификациями, например, 0, 1, 2 или 3 аминокислотные модификации. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные модификации включают, без ограничений, аминокислотную замену, вставку, делецию или химическую модификацию без устранения аффинности связывания антитела или ингибирующего эффекта на Т-клетки модифицированной аминокислотной последовательности по сравнению с немодифицированной аминокислотной последовательностью.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR: CDRH1, CDRH2 и CDRH3, при этом CDRH1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, CDRH2 имеет

аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 11 или 17, и CDRH3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3.

В соответствии с вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее по меньшей мере одну VL CDR, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 12, с 0–3 аминокислотными модификациями.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR: CDRL1, CDRL2 и CDRL3, при этом CDRL1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, CDRL2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или 12, и CDRL3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR: CDRH1, CDRH2 и CDRH3, при этом CDRH1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, CDRH2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 11 или 17, и CDRH3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, и легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR: CDRL1, CDRL2 и CDRL3, при этом CDRL1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, CDRL2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или 12, и CDRL3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR: CDRH1, CDRH2 и CDRH3, при этом CDRH1 имеет

аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, CDRH2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, и CDRH3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, и легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR: CDRL1, CDRL2 и CDRL3, при этом CDRL1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, CDRL2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и CDRL3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6; и при этом указанная тяжелая цепь содержит аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс ЕС).

В соответствии с вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее по меньшей мере одну VH CDR, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 22, с 0–3 аминокислотными модификациями.

В соответствии с вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR: CDRH1, CDRH2 и CDRH3, при этом CDRH1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, CDRH2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, и CDRH3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22.

В соответствии с вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее по меньшей мере одну VL CDR, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 25, с 0–3 аминокислотными модификациями.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR: CDRL1, CDRL2 и CDRL3, при этом CDRL1 имеет

аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, CDRL2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, и CDRL3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR: CDRH1, CDRH2 и CDRH3, при этом CDRH1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, CDRH2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, и CDRH3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, и легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR: CDRL1, CDRL2 и CDRL3, при этом CDRL1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, CDRL2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, и CDRL3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25.

В соответствии с вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее по меньшей мере одну VH CDR, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 48 или SEQ ID NO: 32, с 0–3 аминокислотными модификациями.

В соответствии с вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR: CDRH1, CDRH2 и CDRH3, при этом CDRH1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, CDRH2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31, 40 или 48, и CDRH3 имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 32.

В соответствии с вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее по меньшей мере одну VL CDR, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную

в SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 35, с 0–3 аминокислотными модификациями.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено соответствующее ему выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, содержащую три CDR: CDRL1, CDRL2 и CDRL3, при этом CDRL1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33, CDRL2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 34, и CDRL3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 35.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR: CDRH1, CDRH2 и CDRH3, при этом CDRH1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, CDRH2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31, 40 или 48, и CDRH3 имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 32, и легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, содержащую три CDR: CDRL1, CDRL2 и CDRL3, при этом CDRL1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33, CDRL2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 34, и CDRL3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 35.

В каждом из этих аспектов антитело имеет область Fc, которая содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, которая приводит к повышению связывания с FcγR2B по сравнению с исходной молекулой, в которой отсутствует эта замена. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело имеет избирательность связывания с FcγR2B относительно FcγR2A по сравнению с исходной молекулой, которая не содержит замены. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело имеет избирательность связывания с FcγR2B относительно FcγR1A по сравнению с исходной молекулой, которая не содержит замены.

В конкретном варианте осуществления антитело содержит область Fc, которая содержит аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс ЕС).

В конкретном варианте осуществления антитело содержит область Fc, которая содержит аспарагиновую кислоту в положении 237 (индекс ЕС), аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс ЕС), глицин в положении 271 (индекс ЕС) и аргинин в положении 330 (индекс ЕС).

В соответствии с другим вариантом первого аспекта настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, причем указанное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь содержит область Fc и переменную область тяжелой цепи, содержащую три определяющие комплементарность области (CDR): CDRH1, CDRH2 и CDRH3, а легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, содержащую три CDR: CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем (1) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 3 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 6 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или (2) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или (3) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 32 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 35 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и при этом участок области Fc содержит аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс ЕС).

Типичное антитело содержит 2 тяжелые цепи и 2 легкие цепи, причем парные тяжелые цепи содержат область Fc, таким образом, при использовании в данном документе термин

«тяжелая цепь, которая содержит область Fc» относится к области на полипептиде Н-цепи, которая вместе с областью Fc другой Н-цепи образует функциональную область Fc.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее по меньшей мере одну VH CDR, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в (1) SEQ ID NO: 45, 46 или 47, с 0–3 аминокислотными модификациями; (2) SEQ ID NO: 53, 54 или 55, с 0–3 аминокислотными модификациями; (3) SEQ ID NO: 61, 62 или 63, с 0–3 аминокислотными модификациями; (4) SEQ ID NO: 61, 69 или 70, с 0–3 аминокислотными модификациями; (5) SEQ ID NO: 76, 77 или 78, с 0–3 аминокислотными модификациями; (6) SEQ ID NO: 45, 46 или 84, с 0–3 аминокислотными модификациями; (7) SEQ ID NO: 88, 89 или 90, с 0–3 аминокислотными модификациями; (8) SEQ ID NO: 95, 96 или 97, с 0–3 аминокислотными модификациями; (9) SEQ ID NO: 103, 104 или 105, с 0–3 аминокислотными модификациями; (10) SEQ ID NO: 76, 111 или 112, с 0–3 аминокислотными модификациями; (11) SEQ ID NO: 118, 119 или 120, с 0–3 аминокислотными модификациями; (12) SEQ ID NO: 126, 127 или 128, с 0–3 аминокислотными модификациями; (13) SEQ ID NO: 133, 134 или 135, с 0–3 аминокислотными модификациями; (14) SEQ ID NO: 103, 134 или 139, с 0–3 аминокислотными модификациями; (15) SEQ ID NO: 143, 144 или 145, с 0–3 аминокислотными модификациями; (16) SEQ ID NO: 151, 152 или 153, с 0–3 аминокислотными модификациями; (17) SEQ ID NO: 159, 160 или 161, с 0–3 аминокислотными модификациями; (18) SEQ ID NO: 167, 168 или 169, с 0–3 аминокислотными модификациями; (19) SEQ ID NO: 45, 46 или 177, с 0–3 аминокислотными модификациями; (20) SEQ ID NO: 181, 182 или 183, с 0–3 аминокислотными модификациями; (21) SEQ ID NO: 45, 191 или 192, с 0–3 аминокислотными модификациями; (22) SEQ ID NO: 196, 197 или 198, с 0–3 аминокислотными модификациями; (23) SEQ ID NO: 204, 205 или 206, с 0–3 аминокислотными модификациями; (24) SEQ ID NO: 212, 213 или 214, с 0–3 аминокислотными модификациями; (25) SEQ ID NO: 1, 2 или 3, с 0–3 аминокислотными модификациями; (26) SEQ ID NO: 20, 163 или 22, с 0–3 аминокислотными модификациями; (27) SEQ ID NO: 30, 48 или 32, с 0–3 аминокислотными модификациями; (28) SEQ ID NO: 1, 11 или 3, с 0–3 аминокислотными модификациями; (29) SEQ ID NO: 1, 17 или 3, с 0–3 аминокислотными модификациями; (30) SEQ ID NO: 20, 21 или 22, с 0–3

аминокислотными модификациями; (33) SEQ ID NO: 30, 31 или 32, с 0–3 аминокислотными модификациями; или (34) SEQ ID NO: 30, 40 или 32, с 0–3 аминокислотными модификациями. Указанное антитело также содержит область Fc, которая содержит аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс EC).

В соответствии с вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR: CDRH1, CDRH2 и CDRH3, причем CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в (1) SEQ ID NO: 45, 46 и 47 соответственно; (2) SEQ ID NO: 53, 54 и 55 соответственно; (3) SEQ ID NO: 61, 62 и 63 соответственно; (4) SEQ ID NO: 61, 69 и 70 соответственно; (5) SEQ ID NO: 76, 77 и 78 соответственно; (6) SEQ ID NO: 45, 46 и 84 соответственно; (7) SEQ ID NO: 88, 89 и 90 соответственно; (8) SEQ ID NO: 95, 96 и 97 соответственно; (9) SEQ ID NO: 103, 104 и 105 соответственно; (10) SEQ ID NO: 76, 111 и 112 соответственно; (11) SEQ ID NO: 118, 119 и 120 соответственно; (12) SEQ ID NO: 126, 127 и 128 соответственно; (13) SEQ ID NO: 133, 134 и 135 соответственно; (14) SEQ ID NO: 103, 134 и 139 соответственно; (15) SEQ ID NO: 143, 144 и 145 соответственно; (16) SEQ ID NO: 151, 152 и 153 соответственно; (17) SEQ ID NO: 159, 160 и 161 соответственно; (18) SEQ ID NO: 167, 168 и 169 соответственно; (19) SEQ ID NO: 45, 46 и 177 соответственно; (20) SEQ ID NO: 181, 182 и 183 соответственно; (21) SEQ ID NO: 45, 191 и 192 соответственно; (22) SEQ ID NO: 196, 197 и 198 соответственно; (23) SEQ ID NO: 204, 205 и 206 соответственно; (24) SEQ ID NO: 212, 213 и 214 соответственно; (25) SEQ ID NO: 1, 2 и 3 соответственно; (26) SEQ ID NO: 20, 163 и 22 соответственно; (27) SEQ ID NO: 30, 48 и 32 соответственно; (28) SEQ ID NO: 1, 11 и 3 соответственно; (29) SEQ ID NO: 1, 17 и 3 соответственно; (30) SEQ ID NO: 20, 21 и 22 соответственно; (33) SEQ ID NO: 30, 31 и 32 соответственно; или (34) SEQ ID NO: 30, 40 и 32 соответственно; причем 0–3 аминокислотных модификаций могут присутствовать в любой CDR/SEQ ID NO: Указанное антитело также содержит область Fc, которая содержит аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс EC).

В соответствии с вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее по меньшей мере одну VL CDR, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную

в (1) SEQ ID NO: 33, 34 или 35; (2) SEQ ID NO: 56, 57 или 58; (3) SEQ ID NO: 64, 65 или 66; (4) SEQ ID NO: 71, 72 или 73; (5) SEQ ID NO: 79, 80 или 81; (6) SEQ ID NO: 33, 34 или 85; (7) SEQ ID NO: 91, 65 или 92; (8) SEQ ID NO: 98, 99 или 100; (9) SEQ ID NO: 106, 107 или 108; (10) SEQ ID NO: 113, 114 или 115; (11) SEQ ID NO: 121, 122 или 123; (12) SEQ ID NO: 79, 129 или 130; (13) SEQ ID NO: 106, 107 или 136; (14) SEQ ID NO: 146, 147 или 148; (15) SEQ ID NO: 154, 155 или 156; (16) SEQ ID NO: 4, 12 или 164; (17) SEQ ID NO: 170, 171 или 172; (18) SEQ ID NO: 154, 155 или 178; (19) SEQ ID NO: 184, 185 или 186; (20) SEQ ID NO: 79, 80 или 189; (21) SEQ ID NO: 154, 155 или 193; (22) SEQ ID NO: 199, 200 или 201; (23) SEQ ID NO: 207, 208 или 209; (24) SEQ ID NO: 215, 34 или 216; (25) SEQ ID NO: 4, 5 или 6; (26) SEQ ID NO: 23, 176 или 25; (27) SEQ ID NO: 33, 34 или 35; (28) SEQ ID NO: 4, 12 или 6; (29) SEQ ID NO: 23, 24 или 25; или (30) SEQ ID NO: 33, 34 или 35; причем 0–3 аминокислотных модификаций могут присутствовать в любой CDR/SEQ ID NO: и при этом указанное антитело также содержит область Fc, которая содержит аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс ЕС).

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR: CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в (1) SEQ ID NO: 33, 34 и 35 соответственно; (2) SEQ ID NO: 56, 57 и 58 соответственно; (3) SEQ ID NO: 64, 65 и 66 соответственно; (4) SEQ ID NO: 71, 72 и 73 соответственно; (5) SEQ ID NO: 79, 80 и 81 соответственно; (6) SEQ ID NO: 33, 34 и 85 соответственно; (7) SEQ ID NO: 91, 65 и 92 соответственно; (8) SEQ ID NO: 98, 99 и 100 соответственно; (9) SEQ ID NO: 106, 107 и 108 соответственно; (10) SEQ ID NO: 113, 114 и 115 соответственно; (11) SEQ ID NO: 121, 122 и 123 соответственно; (12) SEQ ID NO: 79, 129 и 130 соответственно; (13) SEQ ID NO: 106, 107 и 136 соответственно; (14) SEQ ID NO: 146, 147 и 148 соответственно; (15) SEQ ID NO: 154, 155 и 156 соответственно; (16) SEQ ID NO: 4, 12 и 164 соответственно; (17) SEQ ID NO: 170, 171 и 172 соответственно; (18) SEQ ID NO: 154, 155 и 178 соответственно; (19) SEQ ID NO: 184, 185 и 186 соответственно; (20) SEQ ID NO: 79, 80 и 189 соответственно; (21) SEQ ID NO: 154, 155 и 193 соответственно; (22) SEQ ID NO: 199, 200 и 201 соответственно; (23) SEQ ID NO: 207, 208 и 209 соответственно; (24) SEQ ID NO: 215, 34 и 216 соответственно; (25) SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно; (26) SEQ ID

NO: 23, 176 и 25 соответственно; (27) SEQ ID NO: 33, 34 и 35 соответственно; (28) SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно; (29) SEQ ID NO: 4, 12 и 6 соответственно; (30) SEQ ID NO: 23, 24 и 25 соответственно; или (31) SEQ ID NO: 33, 34 и 35 соответственно; причем 0–3 аминокислотных модификаций могут присутствовать в любой CDR/SEQ ID NO: и при этом указанное антитело также содержит область Fc, которая содержит аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс EC)

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR: CDRH1, CDRH2 и CDRH3, а легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR: CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем (1) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45, 46 и 47 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33, 34 и 35 соответственно; (2) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 53, 54 и 55 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 56, 57 и 58 соответственно; (3) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 61, 62 и 63 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, 65 и 66 соответственно; (4) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 61, 69 и 70 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 71, 72 и 73 соответственно; (5) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 76, 77 и 78 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 79, 80 и 81 соответственно; (6) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45, 46 и 84 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33, 34 и 85 соответственно; (7) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 88, 89 и 90 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID

[illegible]

SEQ ID NO: 4, 12 и 164 соответственно; (18) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 167, 168 и 169 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 170, 171 и 172 соответственно; (19) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 47 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 170, 171 и 172 соответственно; (20) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45, 46 и 177, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 154, 155 и 178 соответственно; (21) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 181, 182 и 183 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 184, 185 и 186; (22) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 76, 77 и 78 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 79, 80 и 189 соответственно; (23) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45, 191 и 192 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 154, 155 и 193 соответственно; (24) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 196, 197 и 198 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 199, 200 и 201 соответственно; (25) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 204, 205 и 206 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 207, 208 и 209 соответственно; (26) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 212, 213 и 214 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 215, 34 и 216 соответственно; (27) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 2 и 3 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID

NO: 4, 5 и 6 соответственно; (28) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, 163 и 22 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, 176 и 25 соответственно; (29) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, 48 и 32 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33, 34 и 35 соответственно; (30) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 11 и 3 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, 12 и 6 соответственно; (31) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 11 и 3 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно; (32) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 17 и 3 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, 12 и 6 соответственно; (33) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, 21 и 22 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, 24 и 25 соответственно; (34) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, 31 и 32 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33, 34 и 35 соответственно; или (35) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, 40 и 32 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33, 34 и 35 соответственно; причем 0–3 аминокислотных модификаций могут присутствовать в любой CDR/SEQ ID NO: и при этом указанное антитело также содержит область Fc, которая содержит аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс EC).

В соответствии с другим вариантом первого аспекта настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее: (1) по меньшей мере одну VH CDR с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 45, 46 или 47, и по меньшей мере одну VL CDR с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 33, 34 или 35; (2) по

меньшей мере одну VH CDR с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 53, 54 или 55, и по меньшей мере одну VL CDR с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 56, 57 и 58; (3) по меньшей мере одну VH CDR с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 61, 62 или 63, и по меньшей мере одну VL CDR с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 64, 65 или 66; (4) по меньшей мере одну VH CDR с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 61, 69 или 70, и по меньшей мере одну VL CDR с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 71, 72 и 73 атомов; (5) по меньшей мере одну VH CDR с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 76, 77 или 78, и по меньшей мере одну VL CDR с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 79, 80 или 81, (6) по меньшей мере одну VH CDR с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 45, 46 или 84, и по меньшей мере одну VL CDR с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 33, 34 или 85; (7) по меньшей мере одну VH CDR с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 88, 89 или 90, и по меньшей мере одну VL CDR с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 91, 65 или 92; (8) по меньшей мере одну VH CDR с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 95, 96 или 97, и по меньшей мере одну VL CDR с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 98, 99 или 100; (9) по меньшей мере одну VH CDR с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 103, 104 или 105, и по меньшей мере одну VL CDR с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 106, 107 или 108; (10) по меньшей мере одну VH CDR с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 76, 111 или 112, и по меньшей мере одну VL CDR с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 113, 114 или 115; (11) по меньшей мере одну VH CDR с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 118, 119 или 120, и по меньшей мере одну VL CDR с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 121, 122 или 123; (12) по меньшей мере одну VH CDR с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 126, 127 или 128, и по меньшей мере одну VL CDR с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 79, 129 или 130; (13) по меньшей мере одну VH CDR с аминокислотной последовательностью,

[illegible]

меньшей мере одну VL CDR с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 33, 34 или 35; причем 0–3 аминокислотных модификаций могут присутствовать в любой CDR/SEQ ID NO: и при этом указанное антитело также содержит область Fc, которая содержит аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс EC).

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, 13 или 18, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

В других вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, 13 или 18, содержащую до 10 модификаций, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8 или 14, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

В других вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8 или 14, содержащую до 10 модификаций, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций.

В каждом из этих вариантов осуществления антитело имеет область Fc, которая содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, которая приводит к повышению связывания с FcγR2B по сравнению с исходной молекулой, в которой отсутствует эта замена. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело имеет избирательность связывания с FcγR2B относительно FcγR2A по сравнению с исходной молекулой, которая не содержит замены.

В конкретных вариантах осуществления антитело содержит область Fc, содержащую аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс EC).

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7, 13 или 18, и легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8 или 14.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 13, и легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, и легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, и легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь

и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, и легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, и легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, 15 или 19, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, 15 или 19, или последовательность, имеющую до 10 модификаций например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, 16 или 29, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, 16 или 29, или последовательность, имеющую до 10 модификаций, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или последовательность, которая идентична ей на по меньшей мере 90%, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или последовательность, имеющую до 10 модификаций, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций, и при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, или последовательность, имеющую до 10 модификаций, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, или последовательность, которая идентична ей на по меньшей мере 90%, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, или последовательность, имеющую до 10 модификаций, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций, и при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, или последовательность, имеющую до 10 модификаций, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, или последовательность, которая идентична ей на по меньшей мере 90%, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, или последовательность, имеющую до 10 модификаций, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций, и при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, или последовательность, имеющую до 10 модификаций, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, или последовательность, которая идентична ей на по меньшей мере 90%, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, или последовательность, имеющую до 10 модификаций, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций, и при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, или последовательность, имеющую до 10 модификаций, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

В других вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26, содержащую до 10 модификаций, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

В других вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, содержащую до 10 модификаций, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 26, и легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 27.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26, и легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28, или последовательность, имеющую до 10 модификаций, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29, или последовательность, имеющую до 10 модификаций, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28, или последовательность, которая идентична ей на по меньшей мере 90%, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO: 28, или последовательность, имеющую до 10 модификаций, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций, и при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29, или последовательность, имеющую до 10 модификаций, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36 или 41, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

В других вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36 или 41, содержащую до 10 модификаций, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37 или 43, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

В других вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37 или 43, содержащую до 10 модификаций, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 36 или 41, и легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную

последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 37 или 43.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36, и легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41, и легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36, и легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38 или 42, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38 или 42, или последовательность, имеющую до 10 модификаций, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39 или 44, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39 или 44, или последовательность, имеющую до 10 модификаций, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38, или последовательность, которая идентична ей на по меньшей мере 90%, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38, или последовательность, имеющую до 10 модификаций, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций, и при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39, или последовательность, имеющую до 10 модификаций, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42, или последовательность, которая идентична ей на по меньшей мере 90%, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO: 39, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42, или последовательность, имеющую до 10 модификаций, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций, и при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39, или последовательность, имеющую до 10 модификаций, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38, или последовательность, которая идентична ей на по меньшей мере 90%, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 44, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38, или последовательность, имеющую до 10 модификаций, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций, и при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 44, или последовательность, имеющую до 10 модификаций, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций.

В других вариантах осуществления полипептид вариабельной области тяжелой цепи имеет по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности, описанной в SEQ ID NO: 18.

В других вариантах осуществления полипептид вариабельной области тяжелой цепи имеет по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности, описанной в SEQ ID NO: 26.

В других вариантах осуществления полипептид вариабельной области тяжелой цепи имеет по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности, описанной в SEQ ID NO: 36.

В других вариантах осуществления полипептид вариабельной области легкой цепи имеет по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности, описанной в SEQ ID NO: 14.

В других вариантах осуществления полипептид вариабельной области легкой цепи имеет по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности, описанной в SEQ ID NO: 27.

В других вариантах осуществления полипептид вариабельной области легкой цепи имеет по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности, описанной в SEQ ID NO: 43.

В соответствии с другим вариантом первого аспекта настоящего изобретения предложено выделенное антитело, имеющее первичный домен VH и/или первичный домен VL с по меньшей мере одним CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 любого клона антитела, указанного в **таблице 1** или **таблице 2**. В определенных вариантах осуществления в данном документе предложено выделенное антитело, выбранное из клонов антитела, представленных в **таблице 1** или **таблице 2**.

Таблица 1. Примеры агонистических антител к BTLA

Клон	Библиотеки	SEQ ID NO							
		CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3	VH	VL
10B1	Kabat	45	46	47	33	34	35	51	52
12F11	Kabat	53	54	55	56	57	58	59	60
14D4	Kabat	61	62	63	64	65	66	67	68
15B6	Kabat	61	69	70	71	72	73	74	75
15C6	Kabat	76	77	78	79	80	81	82	83
16E1	Kabat	45	46	84	33	34	85	86	87
16F10	Kabat	88	89	90	91	65	92	93	94
16H2	Kabat	95	96	97	98	99	100	101	102
1H6	Kabat	103	104	105	106	107	108	109	110
21C7	Kabat	76	111	112	113	114	115	116	117
24H7	Kabat	118	119	120	121	122	123	124	125
26B1	Kabat	126	127	128	79	129	130	131	132
26F3	Kabat	133	134	135	106	107	136	137	138
27G9	Kabat	103	134	139	106	107	136	141	138
3A9	Kabat	143	144	145	146	147	148	149	142
4B1	Kabat	151	152	153	154	155	156	157	158
4D3	Kabat	159	160	161	4	12	164	165	166
4D5	Kabat	167	168	169	170	171	172	173	174
4E8	Kabat	45	46	47	170	171	172	175	174
4H4	Kabat	45	46	177	154	155	178	179	180
6G8	Kabat	181	182	183	184	185	186	187	188
7A1	Kabat	76	77	78	79	80	189	82	190
8B4	Kabat	45	191	192	154	155	193	194	195
8C4	Kabat	196	197	198	199	200	201	202	203
11.5.1	Kabat	204	205	206	207	208	209	210	211
831	Kabat	212	213	214	215	34	216	217	218
6,2	Kabat	1	2	3	4	5	6	219	220
2.8.6	Kabat	20	163	22	23	176	25	221	222
3E8	Kabat	30	48	32	33	34	35	223	150

Таблица 2. Гуманизированные и сконструированные антитела

Клон	SEQ ID No.									
	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3	VH	VL	Тяжелая цепь	Легкая цепь
гуманизированное 6.2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Сконструированное гуманизированное 6.2 (вариант А)	1	11	3	4	12	6	13	14	15	16
Сконструированное гуманизированное 6.2 (вариант В)	1	11	3	4	5	6	13	8	15	10
Сконструированное гуманизированное 6.2 (вариант С)	1	17	3	4	12	6	18	14	19	16
Гуманизированное 2.8.6	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
Гуманизированное 3Е8	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
Сконструированное гуманизированное 3Е8 (вариант А)	30	40	32	33	34	35	41	37	42	39
Сконструированное гуманизированное 3Е8 (вариант В)	30	31	32	33	34	35	36	43	38	44

В каждом из первых аспектов изобретения антитело имеет область Fc, которая содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, которая приводит к повышению связывания с FcγR2B по сравнению с исходной молекулой, которая не содержит замены, и/или повышенной избирательности связывания с FcγR2B относительно FcγR2A по сравнению с исходной молекулой, которая не содержит замены. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело имеет повышенную избирательность связывания с FcγR2B относительно FcγR1A по сравнению с исходной молекулой, которая не содержит замены.

В конкретном варианте осуществления каждое из антител в соответствии с первым аспектом изобретения (включая любой вариант первого аспекта) содержит область Fc, которая содержит одну или более из следующих аминокислот: аланин (A) в положении 234, аланин (A) в положении 235, аспарагиновую кислоту (D) в положении 236, аспарагиновую кислоту (D) в положении 237, аспарагиновую кислоту (D) в положении 238, аланин (A) в положении 265, глутаминовую кислоту (E) в положении 267, глицин (G)

в положении 271, аргинин (R) в положении 330, аланин (A) в положении 332 и аланин (A) в положении 297 (нумерация в соответствии с индексом ЕС).

В конкретном варианте осуществления каждое из антител в соответствии с первым аспектом изобретения содержит область Fc с аспарагиновой кислотой в положении 238 (индекс ЕС).

В конкретном варианте осуществления каждое из антител в соответствии с первым аспектом изобретения содержит область Fc с аспарагиновой кислотой в положении 237 (индекс ЕС).

В конкретном варианте осуществления каждое из антител в соответствии с первым аспектом изобретения содержит область Fc с аспарагиновой кислотой в положении 236 (индекс ЕС).

В конкретном варианте осуществления каждое из антител в соответствии с первым аспектом изобретения содержит область Fc с аланином в положении 235 (индекс ЕС).

В конкретном варианте осуществления каждое из антител в соответствии с первым аспектом изобретения содержит область Fc с аланином в положении 234 (индекс ЕС).

В конкретном варианте осуществления каждое из антител в соответствии с первым аспектом изобретения содержит область Fc с аланином в положении 265 (индекс ЕС).

В конкретном варианте осуществления каждое из антител в соответствии с первым аспектом изобретения содержит область Fc с глутаминовой кислотой в положении 267 (индекс ЕС).

В конкретном варианте осуществления каждое из антител в соответствии с первым аспектом изобретения содержит область Fc с глицином в положении 271 (индекс ЕС).

В конкретном варианте осуществления каждое из антител в соответствии с первым аспектом изобретения содержит область Fc с аланином в положении 297 (индекс ЕС).

В конкретном варианте осуществления каждое из антител в соответствии с первым аспектом изобретения содержит область Fc с аланином в положении 322 (индекс ЕС).

В конкретном варианте осуществления каждое из антител в соответствии с первым аспектом изобретения содержит область Fc с аргинином в положении 330 (индекс ЕС).

В конкретном варианте осуществления каждое из антител в соответствии с первым аспектом изобретения содержит область Fc, которая содержит аспарагиновую кислоту в положении 237 (индекс ЕС), аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс ЕС), глицин в положении 271 (индекс ЕС) и аргинин в положении 330 (индекс ЕС).

В конкретных вариантах осуществления антитело в соответствии с первым аспектом изобретения содержит Fc-изотип с заменой, выбранной из группы, состоящей из hIgG1 G236D, hIgG1 G237D, hIgG1 P238D, hIgG1 D265A, hIgG1 S267E, hIgG1 P271G, hIgG1 A330R, hIgG1 K322A, hIgG1 N297A, hIgG4 P238D, hIgG4 G237D, hIgG4 P271G, hIgG4 S330R, hIgG4 F234A и hIgG4 L235A.

В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь или легкая цепь также содержит константную область. Если молекула представляет собой полноразмерную молекулу антитела типа IgG, тяжелая цепь может содержать три константных домена. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, имеет K_D связывания с BTLA человека не более чем около 10×10^{-9} М. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, имеет K_D связывания с BTLA человека не более около 4×10^{-9} М. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, имеет K_D связывания с BTLA человека не более около 1×10^{-9} М.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело (например, гуманизированное) по изобретению связывается с BTLA человека при 37 °C с K_D не более чем около 10 нМ (1×10^{-8} М); подходящий вариант — не более чем около 1 нМ; более подходящими являются варианты осуществления, в которых антитела имеют значения K_D при 37 °C не более чем около 500 пМ (5×10^{-10} М), 200 пМ, 100 пМ, 50 пМ, 20 пМ, 10 пМ, 5 пМ или даже 2 пМ. Термин «около», используемый в данном контексте, означает +/- 10%.

В определенных вариантах осуществления выделенное антитело (например, гуманизированное) по изобретению связывается с BTLA человека при 37 °C со скоростью ассоциации по меньшей мере $1,0 \times 10^5$ (1/М с). В определенных вариантах осуществления

выделенное антитело (например, гуманизированное) по изобретению связывается с BTLA человека при 37 °C со скоростью ассоциации по меньшей мере $2,0 \times 10^5$ (1/Мс), $3,0 \times 10^5$ (1/Мс), $4,0 \times 10^5$ (1/Мс), $5,0 \times 10^5$ (1/Мс), $6,0 \times 10^5$ (1/Мс) или $7,0 \times 10^5$ (1/Мс).

В определенных вариантах осуществления выделенное антитело (например, гуманизированное) по изобретению связывается с BTLA человека при 37 °C со скоростью диссоциации не более чем или менее чем $1,0 \times 10^{-3}$ (1/с). В определенных вариантах осуществления выделенное антитело (например, гуманизированное) по изобретению связывается с BTLA человека при 37 °C со скоростью диссоциации не более или менее $3,0 \times 10^{-4}$ (1/с). В определенных вариантах осуществления выделенное антитело (например, гуманизированное) по изобретению связывается с BTLA человека при 37 °C со скоростью диссоциации не более чем или менее чем $2,0 \times 10^{-4}$ (1/с) или $1,0 \times 10^{-4}$ (1/с).

В конкретных вариантах осуществления первого аспекта изобретения в настоящем документе предложены выделенные агонистические антитела, которые специфически связываются с аттенюатором В- и Т-лимфоцитов человека (BTLA) с KD менее 10 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °C с использованием способа, такого как описанный в примере 2, и при этом указанное антитело связывается с BTLA яванского макака с KD менее 20 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °C с использованием способа, такого как описанный в примере 2; не ингибирует связывание BTLA с медиатором входа вируса герпеса (HVEM), что определено, например, с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием способа, такого как описанный в примере 4; и ингибирует пролиферацию Т-клеток *in vitro*, что определено, например, с помощью анализа реакции смешанной культуры лимфоцитов с использованием способа, такого как описанный в примере 9. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывается с аттенюатором В- и Т-лимфоцитов человека (BTLA) со скоростью ассоциации по меньшей мере $5,0 \times 10^5$ (1/Мс), что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °C с использованием способа, такого как описанный в примере 2. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывается с аттенюатором В- и Т-лимфоцитов человека (BTLA) со скоростью диссоциации менее $3,0 \times 10^{-4}$ (1/с), что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °C с использованием

способа, такого как описанный в примере 2. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов человека (BTLA) со скоростью диссоциации от $3,0 \times 10^{-4}$ (1/с) до $1,0 \times 10^{-3}$ (1/с), что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С с использованием способа, такого как описанный в примере 2. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: D52, P53, E55, E57, E83, Q86, E103, L106 и E92, что определено с помощью рентгенокристаллографии или с помощью проточной цитометрии мутированных рецепторов с использованием способа, такого как описанный в примере 5 (нумерация в данном случае, например D52, относится к положению в SEQ ID NO: 225). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: Y39, K41, R42, Q43, E45 и S47. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: D35, T78, K81, S121 и L123. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком H68 BTLA человека. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: N65 и A64 (положение в соответствии с SEQ ID NO:225).

Способы для характеристики свойств антитела хорошо известны в данной области. Подходящий способ определения специфичности связывания с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С описан в примере 2. Подходящий способ определения того, ингибирует ли тестируемое антитело/его фрагмент связывание BTLA с медиатором входа вируса герпеса (HVEM), описан в примере 4; в этом способе также используют поверхностный плазмонный резонанс (SPR). Подходящий способ определения того, ингибирует ли тестируемое антитело/его фрагмент пролиферацию Т-клеток *in vitro*, представляет собой анализ реакции смешанной культуры лимфоцитов, такой как описанный в примере 9. В подходящих способах определения сайта связывания антитела/его фрагмента с BTLA можно использовать рентгенокристаллографию или проточную цитометрию мутированных рецепторов, например, способом, описанным в примере 5

В конкретных вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения в данном документе предложены выделенные агонистические антитела, которые специфически связываются с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов (BTLA) человека со

скоростью ассоциации по меньшей мере $5,0 \times 10^5$ (1/Мс), что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С с использованием способа, такого как описанный в примере 2, причем указанное антитело не ингибирует связывание BTLA с медиатором входа вируса герпеса (HVEM), что определено, например, с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием способа, такого как описанный в примере 4; и при этом указанное антитело ингибирует пролиферацию Т-клеток *in vitro*, что определено, например, с помощью анализа реакции смешанной культуры лимфоцитов с использованием способа, такого как описанный в примере 9. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов человека (BTLA) со скоростью диссоциации менее $3,0 \times 10^{-4}$ (1/с), что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С с использованием способа, такого как описанный в примере 2. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов человека (BTLA) с KD менее 10 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С с использованием способа, такого как описанный в примере 2. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывается с BTLA яванского макака с KD менее 20 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С с использованием способа, такого как описанный в примере 2. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: D52, P53, E55, E57, E83, Q86, E103, L106 и E92, что определено с помощью рентгенокристаллографии или с помощью проточной цитометрии мутированных рецепторов с использованием способа, такого как описанный в примере 5. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: Y39, K41, R42, Q43, E45 и S47. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: D35, T78, K81, S121 и L123. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком H68 BTLA человека (положение в соответствии с SEQ ID NO:225). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA, выбранным из: N65 и A64 (положение в соответствии с SEQ ID NO:225).

В конкретных вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения в данном документе предложено выделенное агонистическое антитело, которое специфически связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов (BTLA) человека со

скоростью диссоциации от $3,0 \times 10^{-4}$ (1/с) до $1,0 \times 10^{-3}$ (1/с), что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °C с использованием способа, такого как описанный в примере 2, причем указанное антитело не ингибирует связывание BTLA с медиатором входа вируса герпеса (HVEM), что определено, например, с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием способа, такого как описанный в примере 4; и при этом указанное антитело ингибирует пролиферацию Т-клеток *in vitro*, что определено, например, с помощью анализа реакции смешанной культуры лимфоцитов с использованием способа, такого как описанный в примере 9. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов человека (BTLA) с KD менее 10 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °C с использованием способа, такого как описанный в примере 2. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывается с BTLA яванского макака с KD менее 20 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °C с использованием способа, такого как описанный в примере 2. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов человека (BTLA) со скоростью ассоциации по меньшей мере $5,0 \times 10^5$ (1/Мс), что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °C с использованием способа, такого как описанный в примере 2. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: D52, P53, E55, E57, E83, Q86, E103, L106 и E92 (положения согласно SEQ ID NO:225), что определено с помощью рентгенокристаллографии или с помощью проточной цитометрии мутированных рецепторов с использованием способа, такого как описанный в примере 5. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: Y39, K41, R42, Q43, E45 и S47 (положения в соответствии с SEQ ID NO:225). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: D35, T78, K81, S121 и L123. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком H68 BTLA человека (положение в соответствии с SEQ ID NO:225). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: N65 и A64 (положение в соответствии с SEQ ID NO:225).

В конкретных вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения в данном документе предложены выделенные агонистические антитела, которые

специфически связываются с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов (ВТЛА) человека со скоростью диссоциации менее $1,0 \times 10^{-3}$ (1/с) и скоростью ассоциации по меньшей мере $5,0 \times 10^5$ (1/Мс), что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С с использованием способа, такого как описанный в примере 2, причем указанное антитело не ингибирует связывание ВТЛА с медиатором входа вируса герпеса (HVEM), что определено, например, с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием способа, такого как описанный в примере 4; и при этом указанное антитело ингибирует пролиферацию Т-клеток *in vitro*, что определено, например, с помощью анализа реакции смешанной культуры лимфоцитов с использованием способа, такого как описанный в примере 9. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов человека (ВТЛА) с КD менее 10 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С с использованием способа, такого как описанный в примере 2. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывается с ВТЛА яванского макака с КD менее 20 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С с использованием способа, такого как описанный в примере 2. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком ВТЛА человека, выбранным из: D52, P53, E55, E57, E83, Q86, E103, L106 и E92 (положения согласно SEQ ID NO:225), что определено с помощью рентгенокристаллографии или с помощью проточной цитометрии мутированных рецепторов с использованием способа, такого как описанный в примере 5. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком ВТЛА, выбранным из: Y39, K41, R42, Q43, E45 и S47. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком ВТЛА человека, выбранным из: D35, T78, K81, S121 и L123. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком H68 ВТЛА человека. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком ВТЛА человека, выбранным из: N65 и A64.

В конкретных вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения в данном документе предложено выделенное агонистическое антитело, которое специфически связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов (ВТЛА) человека с КD менее 2 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С с использованием способа, такого как описанный в примере 2, причем указанное антитело ингибирует связывание ВТЛА с медиатором входа вируса герпеса (HVEM), что

определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием способа, такого как описанный в примере 4; и ингибирует пролиферацию Т-клеток *in vitro*, что определено, например, с помощью анализа реакции смешанной культуры лимфоцитов с использованием способа, такого как описанный в примере 9. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов человека (BTLA) со скоростью ассоциации менее $1,0 \times 10^6$ (1/Мс), что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С с использованием способа, такого как описанный в примере 2. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов человека (BTLA) со скоростью диссоциации менее $1,0 \times 10^{-3}$ (1/с), что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С с использованием способа, такого как описанный в примере 2. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов (BTLA) яванского макака с K_D менее 10 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С с использованием способа, такого как описанный в примере 2. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: D52, P53, E55, E57, E83, Q86, E103, L106 и E92 (положения согласно SEQ ID NO:225), что определено с помощью рентгенокристаллографии или с помощью проточной цитометрии мутированных рецепторов с использованием способа, такого как описанный в примере 5. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: Y39, K41, R42, Q43, E45 и S47 (положение в соответствии с SEQ ID NO:225). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: D35, T78, K81, S121 и L123 (положение в соответствии с SEQ ID NO:225). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком H68 BTLA (положение в соответствии с SEQ ID NO:225). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: N65 и A64 (положение в соответствии с SEQ ID NO:225).

В конкретных вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения в данном документе предложено выделенное агонистическое антитело, которое специфически связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов (BTLA) человека со скоростью ассоциации диссоциации менее 1×10^{-3} (1/с), что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С с использованием способа, такого

как описанный в примере 2, причем указанное антитело ингибирует связывание BTLA с медиатором входа вируса герпеса (HVEM), что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием способа, такого как описанный в примере 4, и ингибирует пролиферацию Т-клеток *in vitro*, что определено, например, анализом реакции смешанной культуры лимфоцитов с использованием способа, такого как описанный в примере 9. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов (BTLA) яванского макака с KD менее 10 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °C с использованием способа, такого как описанный в примере 2. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов человека (BTLA) с KD менее 2 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °C с использованием способа, такого как описанный в примере 2. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: D52, P53, E55, E57, E83, Q86, E103, L106 и E92 (положения согласно SEQ ID NO:225), что определено с помощью рентгенокристаллографии или с помощью проточной цитометрии мутированных рецепторов с использованием способа, такого как описанный в примере 5. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: Y39, K41, R42, Q43, E45 и S47 (положения в соответствии с SEQ ID NO:225). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: D35, T78, K81, S121 и L123 (положения в соответствии с SEQ ID NO:225). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком H68 BTLA человека (положение в соответствии с SEQ ID NO:225). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: N65 и A64 (положение в соответствии с SEQ ID NO:225).

В конкретных вариантах осуществления первого аспекта изобретения в настоящем документе предложено выделенное агонистическое антитело, которое специфически связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов (BTLA) человека, причем указанное антитело связывается с BTLA яванского макака с KD по меньшей мере 5 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °C с использованием способа, такого как описанный в примере 2; и при этом указанное антитело ингибирует связывание BTLA с медиатором входа вируса герпеса (HVEM), что

определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR), с использованием способа, такого как описанный в примере 4; и ингибирует пролиферацию Т-клеток *in vitro*, что определено, например, с помощью анализа реакции смешанной культуры лимфоцитов с использованием способа, такого как описанный в примере 9. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: D52, P53, E55, E57, E83, Q86, E103, L106 и E92 (положения согласно SEQ ID NO:225), что определено с помощью рентгенокристаллографии или с помощью проточной цитометрии мутированных рецепторов с использованием способа, такого как описанный в примере 5. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: Y39, K41, R42, Q43, E45 и S47 (положения в соответствии с SEQ ID NO:225). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: D35, T78, K81, S121 и L123 (положения в соответствии с SEQ ID NO:225). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком H68 BTLA человека (положение в соответствии с SEQ ID NO:225). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: N65 и A64 (положение в соответствии с SEQ ID NO:225).

В конкретных вариантах осуществления первого аспекта изобретения в настоящем документе предложено выделенное агонистическое антитело, которое специфически связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов (BTLA) человека, причем указанное антитело связывается с BTLA яванского макака с KD по меньшей мере 50 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °C с использованием способа, такого как описанный в примере 2; и при этом указанное антитело не ингибирует связывание BTLA с медиатором входа вируса герпеса (HVEM), что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием способа, такого как описанный в примере 4; и ингибирует пролиферацию Т-клеток *in vitro*, что определено, например, с помощью анализа реакции смешанной культуры лимфоцитов с использованием способа, такого как описанный в примере 9. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: D52, P53, E55, E57, E83, Q86, E103, L106 и E92 (положения согласно SEQ ID NO:225), что определено с помощью рентгенокристаллографии или с помощью проточной цитометрии мутированных рецепторов с использованием способа, такого как описанный в примере 5. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с

остатком BTLA человека, выбранным из: Y39, K41, R42, Q43, E45 и S47 (положения в соответствии с SEQ ID NO:225). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: D35, T78, K81, S121 и L123 (положения в соответствии с SEQ ID NO:225). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком H68 BTLA человека (положение в соответствии с SEQ ID NO:225). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: N65 и A64 (положение в соответствии с SEQ ID NO:225).

В конкретных вариантах осуществления первого аспекта изобретения в настоящем документе предложено выделенное агонистическое антитело, которое специфически связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов (BTLA) человека с KD от 1400 нМ до 3500 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °C с использованием способа, такого как описанный в примере 2; и при этом указанное антитело не ингибирует связывание BTLA с медиатором входа вируса герпеса (HVEM), что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием способа, такого как описанный в примере 4; и ингибирует пролиферацию Т-клеток *in vitro*, что определено, например, с помощью анализа реакции смешанной культуры лимфоцитов с использованием способа, такого как описанный в примере 9. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывается с BTLA человека со скоростью ассоциации по меньшей мере $2,0 \times 10^5$ (1/Mc), что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °C с использованием способа, такого как описанный в примере 2. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывается с BTLA человека со скоростью диссоциации менее $10,0 \times 10^{-1}$ (1/c), что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °C с использованием способа, такого как описанный в примере 2. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: D52, P53, E55, E57, E83, Q86, E103, L106 и E92 (положения согласно SEQ ID NO:225), что определено с помощью рентгенокристаллографии или с помощью проточной цитометрии мутированных рецепторов с использованием способа, такого как описанный в примере 5. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: Y39, K41, R42, Q43, E45 и S47 (положения в соответствии с SEQ ID NO:225). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: D35, T78, K81, S121 и L123 (положения в соответствии с SEQ ID

NO:225). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком H68 BTLA человека (положение в соответствии с SEQ ID NO:225). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: N65 и A64 (положение в соответствии с SEQ ID NO:225).

В конкретных вариантах осуществления первого аспекта изобретения в настоящем документе предложено выделенное агонистическое антитело, которое специфически связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов (BTLA) человека со скоростью ассоциации от $1,7 \times 10^5$ (1/Мс) до $2,5 \times 10^5$ (1/Мс), что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С с использованием способа, такого как описанный в примере 2; и при этом указанное антитело не ингибирует связывание BTLA с медиатором входа вируса герпеса (HVEM), что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием способа, такого как описанный в примере 4; и ингибирует пролиферацию Т-клеток *in vitro*, что определено, например, с помощью анализа реакции смешанной культуры лимфоцитов с использованием способа, такого как описанный в примере 9. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывается с BTLA человека со скоростью диссоциации менее $3,0 \times 10^{-1}$ (1/с), что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С с использованием способа, такого как описанный в примере 2. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывается с BTLA человека со скоростью диссоциации от $3,0 \times 10^{-1}$ (1/с) до $5,0 \times 10^{-1}$ (1/с), что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С с использованием способа, такого как описанный в примере 2. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывается с BTLA человека с KD по меньшей мере 150 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С с использованием способа, такого как описанный в примере 2. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывается с BTLA человека с KD от 150 нМ до 1500 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С с использованием способа, такого как описанный в примере 2. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывается с эпитопом, который блокирует связывание антитела 286. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: D52, P53, E55, E57, E83, Q86, E103, L106 и E92, что определено с помощью рентгенокристаллографии или с помощью проточной

цитометрии мутированных рецепторов с использованием способа, такого как описанный в примере 5. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: Y39, K41, R42, Q43, E45 и S47 (положения в соответствии с SEQ ID NO:225). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: D35, T78, K81, S121 и L123 (положения в соответствии с SEQ ID NO:225). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком H68 BTLA человека (положение в соответствии с SEQ ID NO:225). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: N65 и A64 (положение в соответствии с SEQ ID NO:225).

В конкретных вариантах осуществления первого аспекта изобретения в настоящем документе предложено выделенное агонистическое антитело, которое специфически связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов (BTLA) человека с KD от 40 нМ до 1200 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °C с использованием способа, такого как описанный в примере 2; и при этом указанное антитело не ингибирует связывание BTLA с медиатором входа вируса герпеса (HVEM), что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием способа, такого как описанный в примере 4; и ингибирует пролиферацию Т-клеток *in vitro*, что определено, например, с помощью анализа реакции смешанной культуры лимфоцитов с использованием способа, такого как описанный в примере 9. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывается с BTLA человека со скоростью ассоциации по меньшей мере $1,0 \times 10^5$ (1/Mc), что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °C с использованием способа, такого как описанный в примере 2. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывается с BTLA человека со скоростью ассоциации от $1,0 \times 10^5$ (1/Mc) до 10×10^5 (1/Mc), что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °C с использованием способа, такого как описанный в примере 2. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывается с BTLA человека со скоростью диссоциации менее $6,0 \times 10^{-1}$ (1/c), что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °C с использованием способа, такого как описанный в примере 2. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывается с BTLA человека со скоростью диссоциации от $6,0 \times 10^{-1}$ (1/c) до $10,0 \times 10^{-2}$ (1/c), что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °C с

использованием способа, такого как описанный в примере 2. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: D52, P53, E55, E57, E83, Q86, E103, L106 и E92 (положения согласно SEQ ID NO:225), что определено с помощью рентгенокристаллографии или с помощью проточной цитометрии мутированных рецепторов с использованием способа, такого как описанный в примере 5. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: Y39, K41, R42, Q43, E45 и S47 (положения в соответствии с SEQ ID NO:225). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: D35, T78, K81, S121 и L123 (положения в соответствии с SEQ ID NO:225). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком H68 BTLA человека (положение в соответствии с SEQ ID NO:225). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: N65 и A64 (положение в соответствии с SEQ ID NO:225).

В определенных вариантах осуществления выделенное антитело изобретения, которое специфически связывается с BTLA человека, увеличивает активность BTLA и/или сигнализацию через этот рецептор.

Как отмечено выше, термин «антитело» при использовании в отношении первого аспекта изобретения охватывает цельные антитела, а также их антигенсвязывающие фрагменты.

Конкретные варианты осуществления связывания рецептора Fc

В определенных вариантах осуществления изобретения, в частности в соответствии с первым аспектом изобретения, тяжелая цепь содержит область Fc, которая имеет замену, обеспечивающую молекуле антитела повышенное связывание и, следовательно, улучшенную передачу сигналов через FcγR2B. В определенных вариантах осуществления такие молекулы имеют сниженное связывание с одним или более активирующими Fc-гамма-рецепторами, такими как FcγR2A или FcγR1A, по сравнению с исходным полипептидом. В определенных вариантах осуществления такие молекулы имеют повышенное соотношение связывания с FcγR2B/FcγR2A по сравнению с исходным полипептидом. В определенных вариантах осуществления такие молекулы имеют повышенное соотношение связывания с FcγR2B/FcγR1A по сравнению с исходным полипептидом.

Как отмечено выше, в конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения, в частности в соответствии с первым аспектом изобретения, антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, причем указанная тяжелая цепь содержит область Fc, которая содержит одну или более из следующих аминокислот: аланин (A) в положении 234, аланин (A) в положении 235, аспарагиновую кислоту (D) в положении 236, аспарагиновую кислоту (D) в положении 237, аспарагиновую кислоту (D) в положении 238, аланин (A) в положении 265, глутаминовую кислоту (E) в положении 267, глицин (G) в положении 271, аргинин (R) в положении 330, аланин (A) в положении 332 и аланин (A) в положении 297 (нумерация в соответствии с индексом ЕС). Соответственно, область Fc и, следовательно, само антитело способны связываться с Fcγ-рецептором.

В конкретном варианте осуществления такая область Fc связывается с FcγR2B с более высокой аффинностью относительно сопоставимого контрольного антитела, которое содержит область Fc, не имеющую одной или более указанных выше замен в области Fc. В конкретных вариантах осуществления антитело связывается с FcγR2B с константой диссоциации (KD) от около 5 мкМ до 0,1 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Соответственно, антитело связывается с FcγR2B посредством своей области Fc.

В конкретных вариантах осуществления антитело связывается с FcγR2B с KD не более 5 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

В конкретных вариантах осуществления антитело связывается с FcγR2A (аллотип 131R) с более низкой или равной аффинностью относительно исходной молекулы. Исходная молекула представляет собой эквивалентное антитело, в котором отсутствует замена в Fc, придающая молекуле антитела повышенное связывание с FcγR2B и, следовательно, улучшающая передачу сигналов через него.

В конкретных вариантах осуществления, когда антитело содержит замену P238D, антитело связывается с FcγR2A (аллотип 131R) с более низкой или равной аффинностью относительно сопоставимого контрольного антитела, которое содержит область Fc, имеющую пролин в положении 238 (индекс ЕС).

В конкретных вариантах осуществления антитело связывается с FcγR2A (аллотип 131R) с KD по меньшей мере 20 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

В конкретных вариантах осуществления антитело связывается с FcγR2A (аллотип 131R) с KD от около 25 мкМ до 35 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

В конкретных вариантах осуществления антитело связывается с FcγR2A (аллотип 131H) с более низкой или равной аффинностью относительно исходной молекулы.

В конкретных вариантах осуществления, когда антитело содержит замену P238D, антитело связывается с FcγR2A (аллотип 131H) с более низкой или равной аффинностью относительно сопоставимого контрольного антитела, которое содержит область Fc, имеющую пролин в положении 238 (индекс EC).

В конкретных вариантах осуществления антитело связывается с FcγR2A (аллотип 131H) с KD по меньшей мере 50 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

В конкретных вариантах осуществления антитело имеет величину [KD антитела для FcγR2A (131R) / KD антитела для FcγR2B], равную 3 или более, например по меньшей мере 5. Соответственно, это определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

В конкретных вариантах осуществления антитело имеет величину [KD антитела для FcγR2A (131H) / KD антитела для FcγR2B], равную 10 или более, например по меньшей мере 15. Соответственно, это определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

В конкретных вариантах осуществления антитело имеет величину [KD антитела для FcγR2A (131R) / KD антитела для FcγR2B], равную 3 или более, например по меньшей мере 5, и/или величину [KD антитела для FcγR2A(131H)] / [KD антитела для FcγR2B], равную 10 или более, например по меньшей мере 15. Соответственно, это определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

Соответственно, антитело по изобретению проявляет повышенный агонизм к BTLA человека, экспрессируемого на поверхности иммунной клетки человека, по сравнению с сопоставимым контрольным антителом/исходным антителом, что измерено с помощью анализа агонистичности к BTLA, выбранного из анализа активации Т-клеток, такого как

описанный в примере 24, реакции смешанной культуры лимфоцитов, такой как описанная в примере 25, или анализа активации В-клеток, такого как описанный в примере 26.

Таким образом, если антитело содержит замену P238D, то антитело проявляет повышенный агонизм к BTLA человека, экспрессируемого на поверхности иммунной клетки человека, по сравнению с сопоставимым контрольным антителом / исходным антителом, которое содержит область Fc, имеющую пролин в положении 238, что измерено с помощью анализа агонистичности к BTLA, выбранного из анализа активации Т-клеток, такого как описанный в примере 24, реакции смешанной культуры лимфоцитов, такой как описанная в примере 25, или анализа активации В-клеток, такого как описанный в примере 26.

В конкретных вариантах осуществления антитело изобретения выбрано из группы, состоящей из антитела человека, гуманизированного антитела, химерного антитела, мультиспецифического антитела (такого как биспецифическое антитело).

В конкретных вариантах осуществления антитело изобретения представляет собой антигенсвязывающий фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из scFv, sc(Fv)², dsFv, Fab, Fab', (Fab')₂ и диатела.

В конкретных вариантах осуществления молекулы тяжелой цепи и легкой цепи, которые образуют антигенсвязывающий фрагмент, соединены гибким линкером. Существует множество широко используемых гибких линкеров, и специалист в данной области техники может выбрать подходящий линкера.

Пептидный линкер, соединяющий домены scFv VH и VL, соединяет карбоксильный конец одного домена вариабельной области с амино-концом другого домена вариабельной области без существенного снижения точности спаривания VH–VL и антигенсвязывающих сайтов. Пептидные линкеры могут иметь длину от 10 до 25 аминокислот и обычно, но не всегда, состоят из гидрофильных аминокислот, таких как глицин (G) и серин (S). Линкер может быть таким, который встречается в природных мультидоменных белках (например, см. Argos P. J Mol Biol. 211:943-958, 1990; и Heringa G. Protein Eng. 15:871-879, 2002), или может быть адаптирован из него.

Обычно используемые гибкие линкеры имеют последовательности, состоящие преимущественно из участков с остатками Gly и Ser (линкер GS). Пример наиболее широко используемого гибкого линкера имеет последовательность (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n (SEQ ID NO:232). Путем корректировки числа копий n длину такого GS-линкера можно изменять для обеспечения надлежащего разделения функциональных доменов или для поддержания необходимых междоменных взаимодействий. Как правило, в качестве линкера для scFv используется пептидный линкер GS с n = 3 (Leith et al., Int. J. Oncol. 24:765–771, 2004; Holiger et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444–6448, 1993). Такая 15-аминокислотная линкерная последовательность [обозначена как линкер (GGGGS)₃] используется в рекомбинантной фаговой системе антител (набор RPAS), доступной в продаже от компании Amersham. Для создания молекул scFV также используют несколько других линкеров (например, KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 233) и EGKSSSGSGSESKST (SEQ ID NO: 234); Bird et al., Science 242:432-426, 1988).

Связывание с эпитопами

Авторы настоящего изобретения выполнили картирование эпитопов на BTLA, с которыми связываются описанные в данном документе эффективные агонисты и антитела.

В конкретных вариантах осуществления антитело изобретения связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: D52, P53, E55, E57, E83, Q86, E103, L106, E92, Y39, K41, R42, Q43, E45, S47, D35, T78, K81, S121, L123, H68, N65, A64.

В конкретных вариантах осуществления антитело изобретения связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: D52, P53, E55, E57, E83, Q86, E103, L106, E92.

В конкретных вариантах осуществления антитело изобретения связывается по меньшей мере с двумя остатками BTLA человека, выбранным из: D52, P53, E55, E57, E83, Q86, E103, L106, E92.

В конкретных вариантах осуществления антитело изобретения связывается по меньшей мере с тремя остатками BTLA человека, выбранным из: D52, P53, E55, E57, E83, Q86, E103, L106 и E92.

В конкретных вариантах осуществления антитело изобретения связывается по меньшей мере с пятью остатками BTLA человека, выбранным из: D52, P53, E55, E57, E83, Q86, E103, L106 и E92.

В конкретных вариантах осуществления антитело изобретения связывается со всеми остатками BTLA человека, выбранными из: D52, P53, E55, E57, E83, Q86, E103, L106 и E92.

В конкретных вариантах осуществления антитело изобретения связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: Y39, K41, R42, Q43, E45 и S47.

В конкретном варианте осуществления антитело изобретения связывается по меньшей мере с двумя остатками BTLA человека, выбранными из: Y39, K41, R42, Q43, E45 и S47.

В конкретных вариантах осуществления антитело изобретения связывается со всеми остатками BTLA человека, выбранными из: Y39, K41, R42, Q43, E45 и S47.

В конкретных вариантах осуществления антитело изобретения связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: D35, T78, K81, S121 и L123.

В конкретном варианте осуществления антитело изобретения связывается по меньшей мере с двумя остатками BTLA человека, выбранными из: D35, T78, K81, S121 и L123.

В конкретных вариантах осуществления антитело изобретения связывается с остатком H68 BTLA человека.

В конкретных вариантах осуществления антитело изобретения связывается с остатком BTLA человека, выбранным из: N65 и A64.

В конкретных вариантах осуществления антитело изобретения связывается с обоими остатками N65 и A64 BTLA человека.

Нумерация остатков, например K41, относится к аминокислоте (K; лизин) в положении 41; причем нумерация относится к положению в полипептиде BTLA человека, описанном в SEQ ID NO: 225.

В конкретных вариантах осуществления антитело изобретения представляет собой антитело IgG1, IgG2 или IgG4. В конкретных вариантах осуществления антитело представляет собой мышиное или человеческое антитело.

В конкретном варианте осуществления антитело изобретения представляет собой гуманизированное антитело.

В конкретном варианте осуществления антитело изобретения представляет собой полностью человеческое антитело.

В конкретном варианте осуществления антитело по данному изобретению действует как агонист, индуцирующий сигнализацию через рецептор BTLA.

Особенно эффективными агонистами являются антитела (включая антигенсвязывающие фрагменты) изобретения.

В конкретном варианте осуществления антитело изобретения имеет EC50 не более 1 нМ.

Особенно высокой эффективностью обладают агонистические антитела (например, полноразмерные/цельные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты) изобретения.

В конкретном варианте осуществления антитело изобретения ингибирует пролиферацию Т-клеток на по меньшей мере 20%, целесообразно на по меньшей мере 30%, более целесообразно на по меньшей мере 40%.

В конкретном варианте осуществления антитело изобретения ингибирует продукцию интерферона-гамма Т-клетками на по меньшей мере 50%, целесообразно на по меньшей мере 75%, более целесообразно на по меньшей мере 95%, при измерении, например, методом твердофазного ИФА в супернатантах и по реакции смешанной культуры лимфоцитов *in vitro*.

В конкретном варианте осуществления антитело изобретения ингибирует продукцию IL-2 Т-клетками на по меньшей мере 50%, целесообразно, на по меньшей мере 75%, более целесообразно, на по меньшей мере 95%, при измерении, например, методом твердофазного ИФА в супернатантах и по реакции смешанной культуры лимфоцитов *in vitro*.

В конкретном варианте осуществления антитело изобретения ингибирует продукцию IL-17 Т-клетками на по меньшей мере 50%, целесообразно на по меньшей мере 75%, более целесообразно на по меньшей мере 95%, при измерении, например, методом твердофазного ИФА в супернатантах и по реакции смешанной культуры лимфоцитов *in vitro*.

В конкретном варианте осуществления антитело по данному изобретению снижает смертность в мышинной модели GVHD на по меньшей мере 50%, целесообразно на по меньшей мере 75%, более целесообразно на по меньшей мере 95% с использованием способа, такого как описанный в примере 12.

В конкретном варианте осуществления антитело изобретения снижает потерю массы при мышинном Т-клеточном колите на по меньшей мере 50%, целесообразно на по меньшей мере 75%, более целесообразно на по меньшей мере 95% с использованием способа, такого как описанный в примере 11.

В конкретном варианте осуществления антитело по данному изобретению снижает воспаление толстой кишки при Т-клеточном колите у мышей на по меньшей мере 50%, целесообразно на по меньшей мере 75%, более целесообразно на по меньшей мере 95% с использованием способа, такого как описанный в примере 11.

В некоторых аспектах изобретение также относится к выделенному полипептиду, содержащему VL-домены или VH-домены любого из антител, описанных в данном документе.

Как отмечено в данном документе, в конкретных вариантах осуществления антитело, которое связывается с BTLA, содержит тяжелую цепь и легкую цепь, причем указанная тяжелая цепь содержит область Fc, которая имеет аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс ЕС).

Молекулы нуклеиновых кислот

Антитело изобретения будет кодироваться нуклеиновой кислотой. Антитело (включая его антигенсвязывающий фрагмент) может быть кодировано одной молекулой нуклеиновой кислоты или может быть кодировано двумя или более молекулами нуклеиновой кислоты.

Например, поскольку антигенсвязывающий сайт, как правило, формируется путем сведения вариабельной полипептидной области тяжелой цепи и вариабельной полипептидной области легкой цепи, эти две вариабельные (тяжелая и легкая) полипептидные области могут быть кодированы отдельными молекулами нуклеиновой кислоты. Альтернативно, например в случае ScFv, они могут быть кодированы одной и той же молекулой нуклеиновой кислоты.

В соответствии со вторым аспектом изобретения предложена одна или более молекул нуклеиновой кислоты, которые кодируют антитело в соответствии с первым аспектом изобретения.

По первичной аминокислотной последовательности полипептида (-ов), кодирующего (-их) антитело изобретения, специалист в данной области техники способен определить подходящую (-ие) нуклеотидную (-ые) последовательность (-и), кодирующую (-ие) полипептид (-ы), и, при необходимости, последовательность, являющуюся кодон-оптимизированной (например, см. Mauro and Chappell. Trends Mol Med. 20(11):604-613, 2014).

При использовании в настоящем документе, при отсылке к предыдущему аспекту изобретения, например, «в соответствии с первым (или вторым и т. д.) аспектом изобретения», следует понимать, что эта отсылка также охватывает любую указанную вариацию указанного аспекта (например, вариацию первого (или второго и т. д.) аспекта). Кроме того, любой вариант осуществления, который относится к конкретному аспекту изобретения, также относится к любой вариации этого аспекта, таким образом, вариант осуществления, который относится к первому аспекту изобретения, также относится к вариации первого аспекта изобретения.

В соответствии с вариацией второго аспекта настоящего изобретения предложена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид вариабельной области тяжелой цепи или полипептид вариабельной области легкой цепи согласно изобретению. Вариабельным полипептидом тяжелой цепи или вариабельным полипептидом легкой цепи согласно изобретению называются индивидуальные полипептидные цепи, которые включают аминокислоты, составляющие часть антигенсвязывающего сайта. Конечно, указанные полипептиды могут также

содержать другие домены, такие как константные домены, шарнирные области и область Fc, например, содержать один или более сайтов связывания с Fc-рецептором.

В соответствии с другой вариацией второго аспекта настоящего изобретения предложена выделенная нуклеиновая кислота, которая содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих полипептиды, способные образовывать антитело изобретения. В конкретных вариантах осуществления указанные полипептиды могут также содержать другие домены, такие как константные домены, шарнирные области и область Fc, например, содержать один или более сайтов связывания с Fc-рецептором.

Одна из молекул нуклеиновой кислоты может кодировать только полипептидную последовательность, которая содержит VL-домен антитела или его фрагмент. Одна из молекул нуклеиновой кислоты может кодировать только полипептидную последовательность, которая содержит VH-домен антитела или его фрагмент. Однако молекула нуклеиновой кислоты также может кодировать полипептидные последовательности, содержащие как VH-, так и VL-домен, способные образовывать антитело (например, полноразмерное/цельное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) по данному изобретению.

Молекула (-ы) нуклеиновой кислоты, которая (-ые) кодирует (-ют) антитело по изобретению, например в соответствии с первым аспектом изобретения, может быть или не быть частью вектора (такого как плазмидный вектор, космидный вектор, или вирусный вектор, или искусственная хромосома), который может содержать другие функциональные области (элементы), такие как один или более промоторов, одна или более точек начала репликации, один или более селективируемых маркеров, и один или более других элементов, обычно встречающихся в экспрессионных векторах. Клонирование и экспрессия нуклеиновых кислот, кодирующих белки, включая антитела, хорошо установлены и известны специалистам в данной области.

В соответствии с третьим аспектом изобретения предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по второму аспекту изобретения. В конкретных вариантах осуществления вектор представляет собой плазмидный вектор, космидный вектор, вирусный вектор или искусственную хромосому.

Нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению, включая векторные нуклеиновые кислоты, которые содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептиды, способные образовывать антитело изобретения, могут присутствовать в очищенной/выделенной форме.

Выделенные/очищенные нуклеиновые кислоты, которые кодируют антитело по изобретению, не будут содержать или по существу не будут содержать материала, с которым они естественным образом ассоциированы, например, другие белки или нуклеиновые кислоты, с которыми они встречаются в естественной среде или в среде, в которой их получают (например, клеточной культуре), если такое получение осуществляется с помощью технологии рекомбинантной ДНК, реализуемой *in vitro* или *in vivo*.

В конкретных вариантах осуществления нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению имеют чистоту более 80%, например более 90%, более 95%, более 97% и более 99%.

Таким образом, в соответствии с другой вариацией третьего аспекта настоящего изобретения предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту или нуклеотидную последовательность, которая кодирует переменный полипептид тяжелой цепи или переменный полипептид легкой цепи согласно изобретению. В конкретном варианте осуществления вектор содержит нуклеиновую кислоту, которая кодирует переменные области тяжелой и легкой цепей. В конкретных вариантах осуществления указанные полипептиды могут также содержать другие домены, такие как константные домены, шарнирные области и область Fc, например, содержать один или более сайтов связывания с Fc-рецептором.

Нуклеиновая кислота и/или вектор по изобретению могут быть введены в клетку-хозяина. При введении может использоваться любая доступная методика. В случае эукариотических клеток подходящие методики могут включать трансфекцию с фосфатом кальция, DEAE-декстраном, электропорационную, липосомно-опосредованную трансфекцию и трансдукцию с использованием ретровируса или другого вируса, например вируса коровьей оспы или, в случае клеток насекомых, бакуловируса. При введении нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина, в частности в эукариотическую клетку, можно

использовать систему на основе вируса или плазмиды. Плазмидную систему можно поддерживать эписомально или внедрить в клетку-хозяина или в искусственную хромосому. Внедрение может осуществляться путем случайной или целенаправленной интеграции одной или более копий в один или множество локусов. В случае бактериальных клеток подходящие методики могут включать трансформацию с хлоридом кальция, электропорацию и трансфекцию с использованием бактериофага.

В одном варианте осуществления нуклеиновую кислоту изобретения интегрируют в геном клетки-хозяина (например, в хромосому). Интеграцию можно стимулировать путем включения последовательностей, которые способствуют рекомбинации с геномом, в соответствии со стандартными методиками.

Клетки-хозяева

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложена клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту, описанную в данном документе. Такая клетка-хозяин может присутствовать *in vitro* и может присутствовать в культуре.

Клетка-хозяин может быть получена из любого вида, такого как бактерии или дрожжи, но подходящей клеткой-хозяином является клетка млекопитающего, например, клетка человека или клетка грызуна, например клетка НЕК293Т или клетка СНО-K1.

Таким образом, в соответствии с четвертым аспектом изобретения предложена клетка-хозяин, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом изобретения или вектор в соответствии с третьим аспектом изобретения.

Клетка-хозяин может быть обработана так, чтобы вызвать или допускать экспрессию белка по изобретению с нуклеиновой кислоты, например, путем культивирования клеток-хозяев в условиях, подходящих для экспрессии кодирующей нуклеиновой кислоты. Очистку экспрессированного продукта можно обеспечить способами, известными специалисту в данной области техники.

Таким образом, нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению, включая векторные нуклеиновые кислоты, которые содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептиды, способные образовывать антитела изобретения, могут присутствовать в выделенной клетке-хозяине. Клетка-хозяин, как правило, является

частью клональной популяции клеток-хозяев. В настоящем документе ссылка на клетку-хозяина также охватывает клональную популяцию указанной клетки. Клональная популяция является популяцией, которая была выращена из одной исходной клетки-хозяина. Клетка-хозяин может быть получена из любого подходящего организма. Подходящие клетки-хозяева включают бактериальные, грибковые клетки или клетки млекопитающего.

Клетка-хозяин может способствовать амплификации векторной нуклеиновой кислоты (такой как плазида), или она может служить в качестве биологической фабрики для экспрессии полипептида (-ов) по изобретению для образования антитела к BTLA по изобретению. Подходящим хозяином для амплификации векторной нуклеиновой кислоты может быть бактериальная или грибковая клетка, например клетка *Escherichia coli* или *Saccharomyces cerevisiae*. Подходящий хозяин для экспрессии белков по данному изобретению (т. е. полипептидов, которые образуют связывающееся с BTLA человека антитело изобретения) может представлять собой клетку млекопитающего, такую как клетка HEK293T или CHO-K1. В конкретном варианте осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, такую как клетка HEK293T или CHO-K1.

Для экспрессии связывающей BTLA молекулы, описанной в настоящем документе, можно использовать различные векторные системы для экспрессии в клетке-хозяине (см., например, патент США № 5,807,715). Например, клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), в сочетании с вектором, таким как промоторный элемент мажорного промежуточно-раннего гена из цитомегаловируса человека, являются эффективной системой для экспрессии белков CEA (Foecking et al., *Gene*, 45:101 (1986); и Cockett et al., *Bio/Technology*, 8:2 (1990)). Различные клетки-хозяева обладают характерными и специфическими механизмами пост-трансляционного процессинга и модификации белков и генных продуктов. Можно подобрать подходящие клеточные линии или системы-хозяева для обеспечения правильной модификации и процессинга белка изобретения. Для этого можно применять эукариотическую клетку-хозяина, которая обладает клеточным аппаратом для надлежащего процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования генного продукта. Такие клетки-хозяева из млекопитающих включают, без ограничений, клетки CHO, HEK, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 и T47D, NS0, CRL7030 и HsS78Bst.

Продукция антител

В соответствии с пятым аспектом изобретения предложен способ получения антитела в соответствии с первым аспектом изобретения, включающий стадию культивирования клетки-хозяина четвертого аспекта изобретения в условиях продукции указанного антитела и необязательно выделение и/или очистку указанного антитела.

В соответствии с вариацией пятого аспекта настоящего изобретения предложен способ получения антитела, которое связывается с BTLA человека, включающий стадию культивирования клетки-хозяина, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид (-ы), образующий (-ие) антитело, которое связывается с BTLA человека, в условиях, подходящих для получения указанного антитела, и необязательно дополнительно включающий выделение/очистку указанного антитела.

Под «выделением/очисткой» подразумевается, что антитело изобретения или полипептиды, которые составляют эти молекулы, не будут содержать или по существу не будут содержать материала, с которым они естественным образом ассоциированы, например, другие белки или нуклеиновые кислоты, с которыми они встречаются в естественной среде или в среде, в которой их получают (например, клеточной культуре), если такое получение осуществляется с помощью технологии рекомбинантной ДНК, реализуемой *in vitro* или *in vivo*.

В соответствии с вариацией пятого аспекта изобретения предложен способ получения антитела, которое специфически связывается с BTLA человека, причем способ включает следующие стадии:

- а) обеспечение клетки-хозяина, содержащей одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более полипептидов, которые содержат аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи и/или переменного домена легкой цепи, которые при экспрессии способны объединяться для создания связывающейся с BTLA молекулы человека;
- б) культивирование клетки-хозяина, экспрессирующей кодируемую (-ые) аминокислотную (-ые) последовательность (-и); и с) выделение молекулы антитела.

Одна или более молекул нуклеиновой кислоты являются молекулами, описанными выше, которые кодируют один или более полипептидов, способных образовывать антитело изобретения, которое специфически связывается с BTLA человека.

В конкретном варианте осуществления антитело содержит: i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR: CDRH1, CDRH2 и CDRH3, при этом CDRH1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, CDRH2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, и CDRH3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3; и

ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR: CDRL1, CDRL2 и CDRL3, при этом CDRL1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, CDRL2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и CDRL3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.

В конкретном варианте осуществления антитело содержит: i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR: CDRH1, CDRH2 и CDRH3, при этом CDRH1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, CDRH2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, и CDRH3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22; и

ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR: CDRL1, CDRL2 и CDRL3, при этом CDRL1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, CDRL2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, и CDRL3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25.

В конкретном варианте осуществления антитело содержит: i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR: CDRH1, CDRH2 и CDRH3, при этом CDRH1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, CDRH2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31, и CDRH3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32; и

ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR: CDRL1, CDRL2 и CDRL3, при этом CDRL1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33, CDRL2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 34, и CDRL3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 35.

В конкретном варианте осуществления антитело содержит:

- i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%; и
- ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO:14, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

В конкретном варианте осуществления антитело содержит:

- i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%; и
- ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO:27, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

В конкретном варианте осуществления антитело содержит:

- i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%; и
- ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO:43, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

Условия получения антитела изобретения и очистки указанных молекул хорошо известны в данной области. Одним из способов осуществления этого является получение клональной популяции клеток, способной экспрессировать антитело или его фрагмент по настоящему изобретению, и культивирование ее в подходящей среде для выращивания в

течение периода времени и при температуре, способствующей размножению/росту популяции клеток и экспрессии представляющего (-их) интерес белка (-ов). Если представляющий (-ие) интерес белок (-и), (например, антитело по изобретению), экспрессируется (-ются) в клетках-хозяевах, то клетки можно лизировать (например, с использованием мягкого детергента или ультразвуковой обработки) для высвобождения содержимого клеток (и, таким образом, представляющего интерес белка) в окружающую среду (которая может представлять собой культуральную среду или другую среду, в которую были введены клетки), и эту среду затем подвергают процессам очистки. Если представляющий (-ие) интерес белок (-и) (например, антитело изобретения) секретируется (-ются) в среду для выращивания, то среду подвергают процессам очистки. Очистка антител, как правило, включает выделение антитела, например из среды или из супернатанта культуры гибридной клеточной линии с использованием хорошо известных способов, обычно связанных с хроматографией (например, с использованием аффинной хроматографии, анионной и/или катионной обменной хроматографии, эксклюзионной хроматографии или других методик разделения) для отделения интересующего белка от нежелательных белков клеток-хозяев и других клеточных загрязнителей (например, нуклеиновых кислот, углеводов и т. д.). Очищенные белки также можно направлять на стадию инактивации вирусов. Наконец, очищенный представляющий интерес белок может, например, быть лиофилизирован или введен в состав, готовый для хранения, транспортировки и последующего применения. Предпочтительно представляющий интерес белок (например, цельное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению) по существу не содержит загрязняющих белков, которые первоначально присутствовали в культуральной среде после экспрессии или лизиса клеток.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения будет иметь чистоту по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%.

Белки согласно настоящему изобретению (например, цельное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению) могут быть введены в подходящую композицию.

Композиции

Хотя связывающаяся с BTLA молекула (антитело изобретения) может применяться отдельно, в определенных вариантах осуществления применение представляет собой применение фармацевтической композиции, в которой связывающаяся с BTLA молекула введена в состав по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым эксципиентом. Эксципиент может представлять собой подходящий фармацевтический раствор-носитель. Такие носители хорошо известны в данной области и включают фосфатно-солевые буферные растворы, воду, липосомы, различные типы смачивающих агентов, стерильные растворы и т. д. Композиции, содержащие такие носители, могут быть приготовлены хорошо известными традиционными способами. Эти фармацевтические композиции можно вводить субъекту в подходящей дозе. Режим дозирования определяется лечащим врачом и клиническими факторами.

В соответствии с шестым аспектом изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый эксципиент и терапевтически эффективное количество антитела по первому аспекту изобретения, либо которое продуцировано в пятом аспекте изобретения. В конкретном варианте осуществления композиция содержит фосфатно-солевой буферный раствор.

Термин «фармацевтическая композиция» относится к препарату, содержащему терапевтическое средство, которое находится в таком виде, в котором оно обеспечивает биологическую активность активного ингредиента, чтобы он проявлял эффективность, и которое не содержит каких-либо дополнительных компонентов, являющихся неприемлемо токсичными для субъекта, которому будут вводить состав. Фармацевтическая композиция будет содержать одно или более фармацевтически приемлемых эксципиентов. Термин «эксципиент» в данном контексте относится к любой добавке, такой как наполнители, солюбилизаторы, носители, несущие среды, добавки и т. п.

Фармацевтические композиции могут содержать один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов, включая, например, воду, ионообменные вещества, белки, буферные вещества и соли. Кроме того, могут присутствовать консерванты и другие добавки. Эксципиент может представлять собой растворитель или дисперсионную среду. Подходящие составы для применения в терапевтических способах, описанных в данном

документе, описаны в публикации Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

«Фармацевтически приемлемые» эксципиенты представляют собой эксципиенты, которые можно целесообразно вводить субъекту-млекопитающему для обеспечения эффективной дозы используемого активного ингредиента. Фармацевтические композиции изобретения готовят для хранения путем смешивания композиции с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) в форме лиофилизированных составов или водных растворов. Приемлемые эксципиенты являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях и включают буферные вещества, такие как фосфат, цитрат, а также другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехин; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); полипептиды низкой молекулярной массы (менее около 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; металлокомплексы (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN(TM), PLURONICS(TM), или полиэтиленгликоль (ПЭГ). Лиофилизированные составы с антителом к HER2 описаны в WO 97/04801.

Фармацевтические композиции для введения *in vivo* должны быть стерильными. Это легко осуществить путем фильтрации через стерильно-фильтрующие мембраны.

Способ введения молекулы со связывающимся с BTLA фрагментом, например антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, может быть, например, пероральным, парентеральным, ингаляционным или местным. Используемый в настоящем документе

термин «парентеральный» включает, например, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное, внутримышечное, подкожное, ректальное или вагинальное введение.

Фармацевтические композиции для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы и суспензии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, а также органические эфиры, выполненные с возможностью инъекционного введения, такие как этилолеат. Водные носители включают в себя воду, водные растворы или суспензии, включая физиологические и буферные среды. Несущие среды для парентерального введения включают в себя раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, лактат Рингера или нелетучие масла. Несущие среды для внутривенного введения включают в себя компенсаторы потери жидкости и питательных веществ, компенсаторы электролитов (например, на основе декстрозы Рингера) и т. п. Могут также присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные, антиоксидантные, хелатирующие вещества и инертные газы и т. п. Кроме того, композиция может содержать белковые носители, такие как, например, сывороточный альбумин или иммуноглобулин, в определенных вариантах осуществления – человеческого происхождения. Для внутривенной инъекции или инъекции в место поражения активный ингредиент может находиться в форме приемлемого для парентерального введения водного раствора, который не содержит пирогенов и имеет приемлемый pH, изотоничность и стабильность. Специалисты в данной области техники легко могут получить подходящие растворы, используя, например, изотонические несущие среды, такие как хлорид натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, раствор Рингера с лактатом для инъекций. При необходимости можно включить консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки. Как отмечено выше, все они в данном документе называются эксципиентами.

Композиции для инъекции можно вводить медицинскими устройствами, известными в данной области. Например, можно использовать иглу для подкожных инъекций. Можно также применять безыгольные инъекционные устройства, такие как описанные в патентах США №№ 6620135 и 5312335.

Фармацевтические композиции для перорального введения могут быть выполнены в виде таблетки, капсулы, порошка, жидкой или полутвердой формы. Таблетка может содержать

твердый носитель, такой как желатин или адъювант. Жидкие фармацевтические композиции по существу содержат жидкий носитель, такой как вода, углеводороды, животные или растительные масла, минеральное масло или синтетическое масло. Кроме того, при необходимости можно включать физиологический раствор, раствор глюкозы или другого сахара или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль.

Антитело по данному изобретению может быть приготовлено в жидких, полутвердых или твердых формах в зависимости от физико-химических свойств молекулы и способа введения. Составы могут включать эксципиенты или комбинации эксципиентов, например сахара, аминокислоты и поверхностно-активные вещества. Жидкие составы могут иметь широкий диапазон концентраций антител и pH. Твердые составы можно получать, например, путем лиофилизации, распылительной сушки или сушки с помощью технологии сверхкритической текучей среды.

Фармацевтическую композицию можно вводить в виде однократной дозы, многократных доз или в течение установленного периода времени инфузии. Схемы дозирования также можно регулировать для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического или профилактического ответа). В частности, парентеральные составы могут представлять собой однократную болюсную дозу, инфузию или нагрузочную болюсную дозу с последующим введением одной или более поддерживающих доз. Эти композиции можно вводить с определенными фиксированными или переменными интервалами, например один раз в сутки или «по мере необходимости».

Дозировки

Количество связывающейся с BTLA молекулы или фармацевтической композиции, содержащей такую молекулу, которое будет терапевтически эффективным, может быть определено стандартными клиническими методиками, такими как клинические исследования диапазона доз. Кроме того, для определения диапазона оптимальной дозы необязательно можно применять анализы *in vitro*. Точная доза, используемая в составе, также зависит от способа введения и серьезности заболевания или расстройства, и она должна быть определена на основании решения медицинского работника и обстоятельств каждого пациента. Эффективные дозы можно рассчитывать на кривых зависимости доза-

ответ, полученных из тестовых систем *in vitro* или животных моделей. Дозировка вводимых композиций может быть определена специалистом в данной области без излишних экспериментов в сочетании со стандартными исследованиями доза-ответ. Соответствующие обстоятельства, которые следует учитывать при таком определении, включают состояние или состояния, подлежащие лечению, выбранную для введения композицию, возраст, массу и реакцию индивидуального пациента и тяжесть симптомов пациента. Например, для расчета дозы подлежащих введению составов в миллилитрах (мл), можно использовать фактическую массу тела пациента. Корректировка вниз на «идеальный» вес может быть невозможна. В такой ситуации подходящая доза может быть рассчитана по следующей формуле:

Доза (мл) = [масса тела пациента (кг) x уровень дозы (мг/кг) / концентрация лекарственного средства (мг/мл)]

Терапевтически эффективные дозы фармацевтических композиций для лечения связанных с BTLA заболеваний или расстройств, как описано в данном документе, будут варьироваться в зависимости от многих различных факторов, включая способ введения, целевое место введения, физиологическое состояние пациента, масса тела пациента, пол пациента, возраст пациента, является ли пациент человеком или животным, другие вводимые лекарственные средства, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Терапевтически эффективная доза, вероятно, будет определена клиническими исследованиями, а лечащий врач может определять ее с использованием рекомендаций по лечению. Обычно пациент представляет собой человека, но млекопитающие, не являющиеся человеком, также могут получать лечение. Дозы лечения можно титровать с использованием стандартных способов, известных специалистам в данной области техники для оптимизации безопасности и эффективности.

В различных вариантах осуществления связывающуюся с BTLA молекулу вводят в концентрации около 1 мг/кг, около 2 мг/кг, около 3 мг/кг, около 4 мг/кг, около 5 мг/кг, около 6 мг/кг, около 7 мг/кг, около 8 мг/кг, около 9 мг/кг, около 10 мг/кг, около 11 мг/кг, около 12 мг/кг, около 13 мг/кг, около 14 мг/кг, около 15 мг/кг, около 16 мг/кг, около 17 мг/кг, около 18 мг/кг, около 19 мг/кг или около 20 мг/кг.

Фармацевтическая композиция изобретения может быть введена отдельно или в комбинации с другими видами лечения, одновременно или последовательно, в

зависимости от подлежащего лечению состояния. Такая комбинация, вероятно, будет содержать другие иммуносупрессоры, такие как один из следующих: кортикостероиды, циклоспорин, азатиоприн, сульфасалазин, метотрексат, микофенолат, такролимус и финголимод, либо другие биологические препараты, такие как инфликсимаб, адалимумаб, устекинумаб, тоцилизумаб и ритуксимаб.

В соответствии с седьмым аспектом изобретения предложен способ получения фармацевтической композиции, причем способ включает включение антитела в соответствии с первым аспектом изобретения или антитела, полученного в соответствии с пятым аспектом изобретения, в композицию, включающую по меньшей мере один дополнительный компонент. В конкретном варианте осуществления по меньшей мере один дополнительный компонент представляет собой фармацевтически приемлемый эксципиент.

Наборы

Кроме того, продукт (например, связывающуюся с BTLA молекулу или ее фармацевтическую композицию) можно упаковать и продавать в виде набора. Такие производственные изделия могут иметь этикетки или вкладыши в упаковку, содержащие инструкции по продукту и надлежащему применению продукта для лечения субъекта, страдающего заболеванием или расстройством или предрасположенного к нему.

Таким образом, в соответствии с восьмым аспектом изобретения предложен набор, содержащий антитело в соответствии с первым аспектом изобретения или фармацевтическую композицию в соответствии с шестым аспектом изобретения. Соответственно, такой набор включает в себя вкладыш в упаковку, содержащий инструкции по применению.

Терапевтическое/медицинское применение

Антитело изобретения или фармацевтическая композиция, содержащая указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, можно применять в терапии, как правило в виде лекарственного средства.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения или фармацевтическую композицию, содержащую указанное антитело, можно использовать для лечения или профилактики любого заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта.

BTLA участвует в подавлении иммунных ответов, и существует множество заболеваний или состояний, которые можно лечить путем подавления Т-клеток и/или В-клеток хозяина (например, см. Crawford & Wherry. Editorial: Therapeutic potential of targeting BTLA. *J Leukocyte Biol.* 86:5-8, 2009). Заболевания или состояния, при которых можно получить полезный эффект от лечения агонистом BTLA, в настоящем документе называются «связанными с BTLA заболеваниями». Связанные с BTLA заболевания включают воспалительные или аутоиммунные заболевания и нарушения избыточной пролиферации иммунных клеток.

Конкретные связанные с BTLA заболевания, которые можно лечить связывающимися с BTLA молекулами изобретения, включают: болезнь Аддисона, аллергию, очаговую алопецию, боковой амиотрофический склероз, анкилозирующий спондилит, антифосфолипидный синдром, астму (включая аллергическую астму), аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный гепатит, аутоиммунный панкреатит, аутоиммунный полиэндокринный синдром, болезнь Бехчета, буллезный пемфигоид, церебральную малярию, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию, целиакию, болезнь Крона, синдром Кушинга, дерматомиозит, сахарный диабет 1 типа, эозинофильный гранулематоз с полиангиитом, реакцию «трансплантат против хозяина», болезнь Грейвса, синдром Гийена — Барре, тиреоидит Хашимото, гнойный гидраденит, воспалительный фиброз (например, склеродермию, фиброз легких и цирроз), ювенильный артрит, болезнь Кавасаки, лейкоз, лимфому, лимфопролиферативные расстройства, рассеянный склероз, миастению гравис, миелому, нейромиелит зрительного нерва, пузырчатку, полимиозит, первичный билиарный холангит, первичный склерозирующий холангит, псориаз, псориатический артрит, ревматоидный артрит, саркоидоз, синдром Шегрена, системную красную волчанку, артерит Такаясу, височный артерит, отторжение трансплантата, поперечный миелит, язвенный колит, увеит, васкулит, витилиго и болезнь Фогта — Коянаги — Харада.

В некоторых вариантах осуществления подлежащее лечению заболевание выбрано из группы, состоящей из: болезни Крона, язвенного колита, ревматоидного артрита,

системной красной волчанки, псориаза, реакции «трансплантат против хозяина», отторжения трансплантата, рассеянного склероза, васкулита, синдрома Шегрена, болезни Бехчета, увеита, сахарного диабета 1 типа, тиреоидита Хашимото, первичного склерозирующего холангита, миастении гравис.

В конкретных вариантах осуществления расстройство, связанное с избыточной пролиферацией иммунных клеток, выбрано из лимфомы, лейкоза, системного мастоцитоза, миеломы или лимфопролиферативного расстройства.

В соответствии с девятым аспектом изобретения предложено антитело в соответствии с первым аспектом изобретения или фармацевтическая композиция в соответствии с шестым аспектом изобретения для применения в терапии.

В конкретном варианте осуществления терапия представляет собой лечение или профилактику связанного с BTLA заболевания.

В конкретном варианте осуществления связанное с BTLA заболевание вызвано снижением экспрессии и/или активности BTLA у субъекта. В частности, любое заболевание или расстройство, характеризующееся присутствием или активностью Т- или В-клеток, можно лечить агонистом BTLA по данному изобретению.

В одном варианте осуществления связанное с BTLA заболевание представляет собой воспалительное заболевание (такое как ревматоидный артрит), аутоиммунное заболевание или расстройство (например, реакцию «трансплантат против хозяина») или пролиферативное заболевание или расстройство (например, рак).

В одном конкретном варианте осуществления терапия представляет собой лечение или профилактику воспалительных или аутоиммунных заболеваний и расстройств, связанных с избыточной пролиферацией иммунных клеток.

В соответствии с вариацией девятого аспекта изобретения предложен способ лечения нуждающегося в этом пациента, включающий введение пациенту антитела (или связывающейся с BTLA молекулы) в соответствии с первым аспектом изобретения или фармацевтической композиции в соответствии с шестым аспектом изобретения. В одном конкретном варианте осуществления пациент, нуждающийся в лечении или подлежащий

лечению, имеет связанное с BTLA заболевание (или страдает от него). В одном конкретном варианте осуществления пациент, нуждающийся в лечении или подлежащий лечению, имеет воспалительное заболевание, аутоиммунное заболевание или нарушение, связанное с избыточной пролиферацией иммунных клеток (или страдает от него).

В одном конкретном варианте осуществления антитело в соответствии с первым аспектом изобретения или фармацевтическая композиция в соответствии с шестым аспектом изобретения вводят нуждающемуся в этом пациенту в фармацевтически приемлемом количестве.

В вариации этого девятого аспекта изобретения предложено антитело (или связывающаяся с BTLA молекула) в соответствии с первым аспектом изобретения или фармацевтическая композиция в соответствии с шестым аспектом изобретения для применения в способе лечения нуждающегося в этом пациента. В одном конкретном варианте осуществления способ предназначен для лечения или профилактики связанного с BTLA заболевания. В конкретных вариантах осуществления способ предназначен для лечения или профилактики воспалительных или аутоиммунных заболеваний и расстройств, связанных с избыточной пролиферацией иммунных клеток.

В дополнительном варианте этого аспекта предложено применение антитела в соответствии с первым аспектом изобретения или фармацевтической композиции в соответствии с шестым аспектом изобретения при производстве лекарственного средства для лечения нуждающегося в этом пациента.

В одном варианте осуществления терапия предназначена для лечения связанного с BTLA заболевания. Предпочтительно связанное с BTLA заболевание представляет собой воспалительное заболевание (такое как астма), аутоиммунное заболевание или расстройство (например, ревматоидный артрит) или иммунопролиферативное заболевание или расстройство (например, лимфому).

В конкретных вариантах осуществления антитело изобретения или фармацевтическую композицию, содержащую указанное антитело, применяют для подавления Т-клеток и/или В-клеток.

В конкретных вариантах осуществления антитело изобретения или фармацевтическая композиция, содержащая указанное антитело, используются для лечения или профилактики у нуждающегося в этом субъекта заболевания или состояния, выбранного из группы, состоящей из: болезни Аддисона, аллергии, очаговой алопеции, бокового амиотрофического склероза, анкилозирующего спондилита, антифосфолипидного синдрома, астмы (включая аллергическую астму), аутоиммунной гемолитической анемии, аутоиммунного гепатита, аутоиммунного панкреатита, аутоиммунного полиэндокринного синдрома, болезни Бехчета, буллезного пемфигоида, церебральной малярии, хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии, целиакии, болезни Крона, синдрома Кушинга, дерматомиозита, сахарного диабета 1 типа, эозинофильного гранулематоза с полиангиитом, реакции «трансплантат против хозяина» (GVHD), болезни Грейвса, синдрома Гийена — Барре, тиреоидита Хашимото, гнойного гидраденита, воспалительного фиброза (например, склеродермии, фиброза легких и цирроз), ювенильного артрита, болезни Кавасаки, лейкоза, лимфомы, лимфопролиферативных расстройств, рассеянного склероза (MS), миастении гравис, миеломы, нейромиелимита зрительного нерва, пузырьчатки, полимиозита, первичного билиарного холангита, первичного склерозирующего холангита, псориаза, псориатического артрита, ревматоидного артрита, саркоидоза, синдрома Шегрена, системной красной волчанки, артерита Такаясу, височного артерита, отторжения трансплантата, поперечного миелита, язвенного колита, увеита, васкулита, витилиго и болезни Фогта — Коянаги — Харада.

В конкретных вариантах осуществления антитело изобретения или фармацевтическая композиция, содержащая указанное антитело, используются для лечения или профилактики у нуждающегося в этом субъекта заболевания или состояния, выбранного из группы, состоящей из: болезни Крона, язвенного колита, ревматоидного артрита, системной красной волчанки, псориаза, реакции «трансплантат против хозяина», отторжения трансплантата, рассеянного склероза, васкулита, синдрома Шегрена, болезни Бехчета, увеита, сахарного диабета 1 типа, тиреоидита Хашимото, первичного склерозирующего холангита, миастении гравис. В одном варианте осуществления иммунопролиферативное заболевание представляет собой рак. Соответственно, рак представляет собой лейкоз или лимфому.

В другом варианте осуществления антитело изобретения или фармацевтическая композиция, содержащая указанное антитело, предназначены для применения в профилактике или лечении отторжения трансплантата.

В другом варианте осуществления изобретение относится к профилактике или лечению реакции «трансплантат против хозяина».

В другом варианте осуществления антитело изобретения или фармацевтическая композиция, содержащая указанное антитело, предназначены для применения в лечении ревматоидного артрита.

В других вариантах осуществления антитело изобретения или фармацевтическая композиция, содержащая указанное антитело, предназначены для применения при лечении диабета, такого как диабет 1 типа.

В другом варианте осуществления антитело изобретения или фармацевтическая композиция, содержащая указанное антитело, предназначены для применения при лечении псориаза.

В другом варианте осуществления антитело изобретения или фармацевтическая композиция, содержащая указанное антитело, предназначены для применения при лечении рассеянного склероза.

В другом варианте осуществления антитело изобретения или фармацевтическая композиция, содержащая указанное антитело, предназначены для применения в лечении колита.

Термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к дозировке или количеству лекарственного средства, которое является достаточным для облегчения симптомов у пациента или для достижения желаемого биологического результата, например в случае рака, повышения гибели опухолевых клеток, уменьшения размера опухоли, повышения выживаемости без прогрессирования или общей выживаемости и т. д. Как описано в других разделах настоящего документа, эффективное количество обычно оценивают посредством обширных клинических исследований на людях.

В настоящем описании и формуле изобретения в данном документе слова «содержит» и «включает» и их вариации означают «включает, без ограничений», и они не предусматривают исключения и не исключают другие фрагменты, добавки, компоненты, целые числа или стадии. В настоящем описании и формуле изобретения в данном документе формы единственного числа включают множественное число, если контекст не требует иного. В частности, если используется форма единственного числа, следует понимать, что описание предусматривает как множественное, так и единственное число, если контекст не требует иного.

Следует понимать, что элементы, целые числа, характеристики, соединения, химические фрагменты или группы, описанные в сочетании с конкретным аспектом, вариантом осуществления или примером изобретения, применимы к любому другому аспекту, варианту осуществления или примеру, описанному в настоящем документе, если только они не являются несовместимыми с ними. Все элементы, описанные в настоящем описании (включая любые пункты прилагаемой формулы изобретения, реферат и графические материалы), и/или все стадии любого описанного способа или процесса можно сочетать в любой комбинации, за исключением комбинаций, в которых по меньшей мере некоторые из таких элементов и/или стадий являются взаимоисключающими. Изобретение не ограничено деталями любых приведенных выше вариантов осуществления. Изобретение распространяется на любой новый элемент или комбинацию новых элементов, описанных в настоящем описании (включая любые пункты прилагаемой формулы изобретения, реферат и графические материалы), или на любую новую стадию или любую новую комбинацию стадий любого способа или процесса, описанных в настоящем описании.

Необходимо обратить внимание на все формы и документы, которые подаются одновременно с данным описанием или до него, которые связаны с настоящей заявкой и которые доступны для всеобщего ознакомления вместе с данным описанием; содержание всех таких форм и документов включено в настоящий документ путем ссылок.

Настоящее изобретение теперь будет дополнительно описано со ссылкой на нижеследующие примеры и прилагаемые фигуры, не имеющие ограничительного характера.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1

Связывание антител с BTLA человека и яванского макака в растворимой и экспрессируемой на клетках форме. (а) Полученные методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) кривые связывания для растворимого мономерного внеклеточного домена человеческого BTLA, подаваемого с увеличивающимися концентрациями над иммобилизованным антителом к BTLA; графики показывают сигнал SPR после вычитания эталона и пустого образца. (b) Скорости ассоциации и диссоциации для связывания с BTLA человека или яванского макака, рассчитанные путем аппроксимации кривой с использованием программного обеспечения BiaEvaluation. (c) Связывание антитела 2.8.6, по сравнению с изотипическим контрольным антителом с экспрессирующей BTLA человека или BTLA яванского макака клеточной линией Jurkat (значения означают среднее $\pm$ стд. ош. для лунок в трех повторностях при каждой концентрации антител). (d) EC50 для связывания антител с трансфицированными клеточными линиями, рассчитанные с помощью нелинейной аппроксимации кривой с использованием программного обеспечения GraphPad Prism.

Фиг. 2

(а) Блокировку связывания лиганда антителами к BTLA оценивали с помощью SPR. Внеклеточный домен BTLA человека иммобилизовали на сенсорном чипе. Впрыскивали HVEM человека для подтверждения связывания, затем обеспечивали полную диссоциацию. Затем впрыскивали насыщающую концентрацию антитела к BTLA, а затем сразу же делали второй впрыск HVEM. (b) Равновесное связывание HVEM после впрыска антитела выражали в виде процента от связывания HVEM до впрыска антитела. Насыщение BTLA клоном 11.5.1, но не клоном 2.8.6, блокировало последующее связывание лиганда.

Фиг. 3

Картирование эпитопов антител к BTLA. (а) клетки HEK293T, трансфицированные BTLA-конструктами в бицистронном векторе, также экспрессирующем GFP, окрашивали конъюгированным с Pacific Blue антителом к BTLA. Клон 11.5.1 связывается с клетками, трансфицированными рецептором дикого типа (слева), но не с клетками, трансфицированными BTLA, имеющим мутацию Y39R (справа). (b) Связывание с каждым

мутантным конструктом BTLA выражали в процентах от связывания с BTLA дикого типа для клонов 2.8.6 и 11.5.1. (с) Мутации Y39R и K41E, которые избирательно устраняли связывание клона 11.5.1, картировали на кристаллическую структуру BTLA человека (черные остатки). Остатки, критичные для связывания с лигандом HVEM, выделены серым цветом.

Фиг. 4

(а) Кристаллическая структура внеклеточного домена BTLA человека в комплексе с Fab'-фрагментом клона 2.8.6. Остатки на BTLA, которые заглублены на границе раздела, выделены черным цветом. (b) Показан эпитоп антитела 2.8.6 (черные остатки) относительно сайта связывания с HVEM (серые остатки).

Фиг. 5

(а) Стратегия создания химерного гена BTLA в мышах с гуманизированным BTLA. Участок геномной ДНК человека от начала экзона 2 до конца экзона 3 вставляли в локус мыши, заменяя последовательность мыши от начала экзона 2 до конца экзона 4. Последовательности на границе экзон-интрон в начале экзона 2 мыши и конце экзона 4 мыши оставались интактными для обеспечения надлежащего сплайсинга.

Фиг. 6

(а) Протокол анализа с переносом Т-клеток для оценки антител к BTLA *in vivo*. Мышам-реципиентам вводили смесь OVA-специфических CD4 Т-клеток, гуманизированных и дикого типа. На следующий день мышей иммунизировали овальбумином в Alum для активации перенесенных клеток и через 24 часа вводили антитело к BTLA или изотипический контроль. Через восемь дней после первоначального переноса клеток оценивали соотношение гуманизированных клеток и клеток дикого типа в перенесенной популяции в селезенке с помощью проточной цитометрии. (b) Оба клона, 11.5.1 и в меньшей степени 2.8.6, снижали размножение гуманизированных клеток относительно клеток дикого типа. График показывает объединенные данные из двух (для 11.5.1) или трех (для 2.8.6) повторов экспериментов. Каждая точка данных представляет собой индивидуальную мышь-реципиента.

Фиг. 7

Влияние клона 2.8.6 анти-BTLA на пролиферацию CD4 Т-клеток в смешанной культуре лимфоцитов *in vitro*. Т-клетки из гуманизированных мышей C57BL/6 окрашивали CellTraceViolet и добавляли к обработанным митомицином клеткам-стимуляторам Balb/c в присутствии антитела против BTLA или изотипического контроля. Через 96 часа пролиферацию гуманизированных клеток CD4 оценивали и нормализовали к пролиферации в отсутствие антитела. Клон 2.8.6 ингибировал пролиферацию гуманизированных клеток с IC50 0,029 нМ и имел максимальный эффект ингибирования пролиферации 42%. Точки данных представляют собой среднее +/- std. ош. для лунок в трех повторностях при каждой концентрации антител и являются репрезентативными для 5 независимых экспериментов.

Фиг. 8

(а) Влияние клона 2.8.6 на модель Т-клеточного колита. Мышам-реципиентам с нокаутом RAG делали инъекции Т-клеток CD45RBhiCD25-CD4+ от мышей с гуманизированным BTLA и вводили 200 мкг антитела 2.8.6 или изотипического контроля в дни 7, 21 и 35. Мыши, получавшие изотипический контроль, постепенно теряли массу, начиная с 3 недель и далее, тогда как мыши, получавшие антитело 2.8.6, сохраняли массу. (b) Через 8 недель после переноса клеток толстую кишку обрабатывали для экстракции лимфоцитов из собственной пластинки и вычисляли общее количество воспалительных клеток в расчете на толстую кишку. Мыши, получавшие изотипический контроль, имели значительно больше инфильтрирующих иммунных клеток, чем мыши, получавшие антитело 2.8.6. (с) Рассчитывали отношение массы толстой кишки к длине как маркер воспаления и утолщения. Лечение антителом 2.8.6 предотвращало увеличение отношения массы к длине, наблюдаемое у мышей, получавших лечение изотипическим контролем.

Фиг. 9

(а) Влияние антител к BTLA на модель GVHD родитель-к-F1. Спленоциты C57BL/6 и клетки костного мозга из мышей с гуманизированным BTLA вводили мышам-реципиентам CB6F1, которые затем получали антитело к BTLA или изотипический контроль. У нелеченных мышей развивалась клиническая GVHD с прогрессирующим потерей веса, дерматитом и диареей, и их отбраковывали, когда они достигали предварительно заданных по человеку конечных критериев. Мыши, получавшие антитело

2.8.6 и 11.5.1, были относительно защищены, при этом выживаемость была сопоставима с контрольными мышами, получавшими сингенные клетки. (b) Через 5 недель после переноса клеток мышей отбраковывали и вычисляли отношение массы толстой кишки к длине в качестве маркера воспаления кишечника. Лечение с помощью 2.8.6 и 11.5.1 предотвращало увеличение толщины толстой кишки, наблюдаемое у нелеченных мышей.

Фиг. 10

(a) Влияние клона 11.5.1 с мутацией D265A в анализе с переносом Т-клеток *in vivo*. Это мутированное антитело, которое не связывается с Fc-рецепторами, более не ингибировало пролиферацию клеток с гуманизированным BTLA, а вместо этого приводило к повышенной пролиферации из-за блокады рецептора. (b) Антитело 11.5.1 с мутацией D265A более не ингибировало пролиферацию Т-клеток в смешанной культуре лимфоцитов.

Фиг. 11

Антитела к BTLA не фиксируют комплемент. Спленоциты из мышей с гуманизированным BTLA инкубировали с 10% комплементом кролика в течение 1 часа при 37 °C в присутствии 20 мкг/мл антитела к BTLA, изотипического контроля или положительного контроля (истощающего антитела к CD20). Антитело к CD20 истощало большинство В-клеток, подтверждая активность комплемента кролика, но антитела к BTLA не истощали ни В-клетки, ни Т-клетки, хотя обе эти популяции окрашивались положительно на BTLA.

Фиг. 12

Антитела к BTLA не вызывают антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности. Спленоциты из мышей с гуманизированным BTLA инкубировали в течение 24 часов при 37 °C в присутствии 20 мкг/мл антитела к BTLA, изотипического контроля или положительного контроля (истощающего антитела к CD20). Антитело к CD20 истощало большинство В-клеток путем индукции ADCC в эффекторных клетках в смеси, но антитела к BTLA не истощали ни В-клетки, ни Т-клетки, хотя обе эти популяции окрашивались положительно на BTLA.

Фиг. 13

Антитела против BTLA не истощают В-клетки или Т-клетки *in vivo*. Мышам с гуманизированным BTLA вводили 200 мкг антитела 2.8.6. Через 24 часа собирали

селезенку и костный мозг и клеточные популяции оценивали с помощью проточной цитометрии. Антитела 2.8.6 не истощали В- или Т-клетки в селезенке и не влияли на частоту различных популяций предшественников В-клеток в костном мозге ($n = 3$ мыши на группу).

Фиг. 14

Уровни экспрессии BTLA на В-клетках или CD4⁺ Т-клетках от гуманизированных мышей после 6 дней инкубации *in vivo* с антителами 2.8.6 или 11.5.1 по сравнению с экспрессией BTLA на клетках от мышей, получивших инъекции изотипического контрольного антитела ($n = 5$ мышей на группу).

Фиг. 15

Агонистический эффект антител к BTLA в репортерном анализе зависит от связывания с Fc-рецептором, и изотипы с большим связыванием с FcγR2B являются более эффективными агонистами. Линию Т-клеток Jurkat, экспрессирующую GFP под контролем отвечающих на NFκB транскрипционных элементов, трансфицировали BTLA человека и стимулировали путем совместного культивирования с клеточной линией BW5147, экспрессирующей конструкт анти-CD3 ScFv на своей поверхности. Сигнализацию NFκB обнаруживали путем измерения геометрического среднего по GFP с помощью проточной цитометрии через 24 часа культивирования. Ингибирующий эффект добавления агонистических антител к BTLA различных изотипов к культуре оценивали в условиях, когда клеточную линию BW5147 также трансфицировали для экспрессии hFcγR2B (a) или в условиях отсутствия Fc-рецепторов (b). Точки данных представляют собой среднее $\pm$ стандарт. ош. для лунок в трех повторностях при каждой концентрации антител и являются репрезентативными для 3 независимых экспериментов.

Фиг. 16

Гуманизированные агонистические антитела против BTLA 2.8.6, 6.2_varC и 3E8, экспрессированные на изотипе P238D, обладают большей эффективностью и активностью в репортерном анализе по сравнению со слитым белком Fc и BTLA-лиганда HVEM или агониста BTLA предшествующего уровня техники 22B3. Линию Т-клеток Jurkat, экспрессирующую GFP под контролем отвечающих на NFκB транскрипционных элементов, трансфицировали BTLA человека и стимулировали путем совместного

культивирования с клеточной линией BW5147, экспрессирующей конструктор анти-CD3 ScFv и hFcγR2B на своей поверхности. Сигнализацию NFκB обнаруживали путем измерения геометрического среднего по GFP с помощью проточной цитометрии через 24 часа культивирования. Оценивали ингибирующий эффект агонистических антител к BTLA, добавляемых к совместной культуре. Точки данных представляют собой среднее $\pm$ стд. ош. для лунок в трех повторностях при каждой концентрации антител и являются репрезентативными для 3 независимых экспериментов.

Фиг. 17

Гуманизированное антитело к BTLA 2.8.6 ингибирует пролиферацию CD4 Т-клеток в реакции смешанной культуры лейкоцитов. Очищенные первичные Т-клетки человека из донорского банка крови окрашивали красителем на пролиферацию клеток и совместно культивировали в течение 5 дней с аллогенными дендритными клетками моноцитарного происхождения от другого донора в соотношении 4 : 1 в присутствии агонистических антител к BTLA или изотипического контроля hIgG1 P238D. Популяции клеток идентифицировали с помощью проточной цитометрии и пролиферации по разбавлению отслеживающего красителя. Пролиферацию клеток CD4 в присутствии антитела к BTLA нормализовали к пролиферации в присутствии эквивалентной концентрации изотипического контроля. Данные были собраны из 6 независимых экспериментов с различными парами доноров. Антитело 2.8.6 значительно ингибировало пролиферацию CD4 Т-клеток в виде изотипа P238D, но не в других изотипических форматах. Молекула предшествующего уровня техники 22B3 не оказывала существенного влияния на пролиферацию CD4.

Фиг. 18

Гуманизированные агонистические антитела против BTLA 2.8.6, 6.2_varC и 3E8, экспрессируемые на изотипе P238D, ингибируют активацию первичных В-клеток в ответ на агонист TLR9 ODN2006. Первичные человеческие В-клетки выделяли из PBMC здоровых доноров и стимулировали 0,01 мкМ ODN2006 в присутствии или в отсутствие различных доз контрольного антитела изотипа P238D или выбранных агонистических антител к BTLA. Через 5 дней концентрацию IL-10 в супернатанте оценивали с помощью ИФА. Столбики представляют собой среднее $\pm$ стд. ош. для лунок в трех повторностях

при каждой концентрации антител и являются репрезентативными для 3 независимых экспериментов.

Фиг. 19

Гуманизированные агонистические антитела против BTLA 2.8.6, 6.2_varC и 3E8, экспрессируемые на изотипе P238D, значительно снижают потерю массы в модели реакции «ксеногенный трансплантат против хозяина». Облученным мышам NSG вводили в/в 10 миллионов РВМС человека на 0 день и затем вводили в/б на 1 день 10 мг/кг антитела к BTLA или изотипического контроля P238D. Мышей регулярно взвешивали и строили график зависимости массы относительно исходной массы ($n = 9$ мышей на группу, точки данных обозначают среднее $\pm$ стд. ош.).

ПРИМЕРЫ

В приведенных ниже примерах показано, что антитела 11.5.1 и 2.8.6. связываются с BTLA человека с высокой аффинностью. С использованием трансгенных мышей, экспрессирующих человеческий рецептор, показано, что после связывания с BTLA эти антитела ингибируют ответы Т-клеток *in vitro* и *in vivo* и способны облегчать заболевание на мышинных моделях воспалительного заболевания кишечника и реакции «трансплантат против хозяина». Хотя эти агонистические эффекты зависят от связывания с Fc-рецептором, антитела не вызывают истощения экспрессирующих BTLA клеток путем цитотоксичности и не индуцируют подавления экспрессии рецептора. Введение модификации P238D в тяжелую цепь значительно повышает агонистическую сигнализацию через Fc γ R2B и увеличивает соотношение сигнализации Fc γ R2B относительно Fc γ R2A. Ожидается, что такие двойные агонистические антитела к BTLA и Fc γ R2B будут иметь терапевтическую ценность, особенно при аутоиммунных и воспалительных заболеваниях.

Пример 1. Генерация и секвенирование антител к BTLA

Антитела, распознающие рецептор иммунных клеток человека BTLA, были получены компанией BioGenes GmbH посредством иммунизации мышей внеклеточной областью BTLA человека (BTLA^{K31-R151}). Спленоциты из иммунизированных мышей сливали с клетками миеломы Sp2/0-Ag14 и полученные гибридомы отбирали по реактивности с BTLA человека с помощью ИФА в супернатантах в сочетании с клонированием методом разведений. Антитела изотипировали из супернатанта гибридомы с использованием

набора Rapid Mouse Isotyping Kit (RayBiotech). Оба антитела, продуцируемых клонами 2.8.6 и 11.5.1, были определены как IgG1k.

Для секвенирования переменных доменов иммуноглобулина РНК экстрагировали из гибридом с использованием реагента TRIzol (ThermoFisher) согласно инструкциям производителя. РНК подвергали обратной транскрипции для получения кДНК с использованием праймеров, специфичных для первого константного домена тяжелой цепи или для константного домена легкой цепи, и обратной транскриптазы Super Script II (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя.

Затем проводили ПЦР с использованием праймеров, нацеленных на консервативные области локуса иммуноглобулина, как описано ранее (Tiller et al., J Immunol Methods. 350:183-193, 2009), и продукты ПЦР секвенировали. В некоторых случаях идентификация функциональной легкой цепи осложняется избытком кДНК нефункциональной легкой каппа-цепи из клеточной линии слитой миеломы, и для решения этой проблемы применяют ранее описанную методику с добавлением избытка праймера, специфичного для CDR3 нефункциональной цепи, для принудительного отсечения продукта aberrантной цепи (Yuan et al. J Immunol Methods. 294:39553-61, 2005).

Последовательности переменных доменов оценивали с использованием инструмента NCBI IgBlast для определения местоположения CDR.

Пример 2. Связывание с растворимым BTLA человека и яванского макака

Аффинность связывания и кинетику агонистических антител к BTLA по данному изобретению (2.8.6 и 11.5.1) к BTLA человека или яванского макака определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием прибора Biacore T200 (GE Healthcare). Использовали набор для захвата антител мыши (GE Healthcare) для покрытия сенсорного чипа Series S CM5 Sensor Chip (GE Healthcare) поликлональным антителом к мышиному IgG. Затем антитело к BTLA захватывали на поверхность биосенсора, а в референсном канале захватывали антитело отрицательного контроля (клон Морс21; Biolegend). Различные концентрации мономерного растворимого внеклеточного домена BTLA человека (BTLA^{K31-R151}) (из SEQ ID NO: 225) или растворимого внеклеточного домена BTLA яванского макака (BTLA^{K31-R151}) (из SEQ ID NO: 226) далее вводили поверх иммобилизованных антител в буфере 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,005%

об./об. поверхностно-активного вещества P20, pH 7,4 (HBS-P) при 37 °C с проведением одноциклового анализа кинетики (**Фиг. 1a**). Скорости ассоциации и диссоциации аппроксимировали с использованием программного обеспечения BiaEvaluation (GE Healthcare) после вычитания эталона и пустого образца и вычисляли константы диссоциации (**Фиг. 1b**). Клон 2.8.6 связывался с человеческим BTLA с KD 0,65 нМ и с BTLA яванского макака с KD 7,89 нМ. Клон 11.5.1 связывался с человеческим BTLA с KD 0,75 нМ и с BTLA яванского макака с KD 0,99 нМ. В отдельном эксперименте, проводимом только с BTLA человека, клон 2.8.6 связывался с человеческим BTLA с KD 0,37 нМ, а клон 11.5.1 связывался с BTLA человека с KD 0,53 нМ.

Пример 3. Связывание с BTLA на клетках

Способность агонистических антител к BTLA по данному изобретению (2.8.6 и 11.5.1) связываться с BTLA человека или яванского макака, экспрессируемым на клеточной поверхности, оценивали с помощью проточной цитометрии. Лентивирусную систему трансфекции использовали для экспрессии полноразмерного BTLA человека или яванского макака в линии Т-клеток Jurkat. 1×10^5 клеток на лунку высевали в 96-луночные планшеты с U-образным дном. Оценивали связывание антител с BTLA по сравнению с изотипическим контролем mIgG1 (клон MOPC-21, Biolegend № 400165) при двенадцати концентрациях с разведением 1 к 3 в буфере для FACS (PBS, 2% FCS, 0,05% азида натрия), начиная с концентрации 90 мкг/мл. Неспецифическое связывание антител предотвращали добавлением Fc-блока (Biolegend № 101319). Антитела инкубировали с клетками в течение 30 минут на льду, затем клетки дважды промывали буфером для FACS, а затем окрашивали конъюгированным с AF647 антителом к mIgG1 (Biolegend № 406618). Вторичное антитело инкубировали в течение 30 минут на льду, затем клетки промывали и ресуспендировали в буфере для FACS для анализа на проточном цитометре. Строили график геометрического среднего интенсивности флуоресценции вторичного антитела для каждой концентрации и вычисляли EC50 для связывания рецептора с помощью нелинейной аппроксимации кривой с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Клон 11.5.1 связывался с клетками, экспрессирующими BTLA человека, с EC50 0,016 нМ и клетками, экспрессирующими BTLA яванского макака, с EC50 0,0057 нМ. Клон 2.8.6 связывался с клетками, экспрессирующими человеческий BTLA, с EC50

0,085 нМ и с клетками, экспрессирующими BTLA яванского макака, с EC₅₀ 0,16 нМ (Фиг. 1c-d).

Пример 4. Конкуренция с натуральным лигандом HVEM при связывании с BTLA

Способность агонистических антител к BTLA по данному изобретению (2.8.6 и 11.5.1) блокировать связывание натурального лиганда с BTLA оценивали с помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием прибора Biacore T200 (GE Healthcare). Внеклеточный домен BTLA человека (BTLA^{31K-151R}) ковалентно связывали с сенсорным чипом CM5 с использованием иммобилизации по аминной группе. Затем внеклеточный домен HVEM человека, слитый с областью Fc IgG1 мыши, вводили по иммобилизованному hBTLA в буфере HBS-P при 37 °C и оставляли для полной диссоциации. Затем впрыскивали насыщающее количество антитела к BTLA (2.8.6 или 11.5.1), а после этого сразу проводили второе введение человеческого HVEM-mFc при той же концентрации, что и при первоначальном впрыске (Фиг. 2A). Равновесное связывание с HVEM (в единицах резонанса) после насыщения BTLA антителом выражали в виде процента от связывания до введения антитела (Фиг. 2B). Если связывание с HVEM после насыщения антителом составляло > 90% от связывания перед введением антитела, то антитело считали неблокирующим.

Пример 5. Связывающий эпитоп антитела 11.5.1 на BTLA человека

Функциональный эпитоп антитела 11.5.1 на BTLA человека определяли путем оценки методом проточной цитометрии связывания с панелью одноточечных мутантов рецептора, экспрессируемых на клеточной поверхности. Конструкты, кодирующие внеклеточную область BTLA человека с трансмембранной и внутриклеточной областью мышиного CD28, клонировали в бидирекционный экспрессионный вектор млекопитающего pGFP2-n2 (BioSignal Packard Ltd), который также кодирует GFP. Мутантные конструкты, отличающиеся одной аминокислотой, получали с использованием подхода с «резким» мутагенезом (Davis et al. Proc Natl Acad Sci USA. 95, 5490-4 (1998)). Плазмиды (2 мкг/лунка) трансфицировали в клетки HEK-293T в 6-луночных планшетах с использованием реагента для трансфекции Genejuice (Novagen; 6 мкл/лунка). В каждый эксперимент были включены контроли с суррогатной трансфекцией и без трансфекции. Клетки собирали через 48 часов и окрашивали с помощью антитела к BTLA, конъюгированного с флуорохромом, при 10 мкг/мл, вместе с маркером живых/мертвых

клеток, в буфере PBS, 0,05% азида, 2% FCS (буфер FACS) в течение 1 ч при 4 °C. Клетки промывали, осаждали и ресуспендировали в 200 мкл буфера FACS, а затем анализировали на проточном цитометре BD FACSCanto. GFP-положительные (трансфицированные) жизнеспособные клетки гейтировали и анализировали на связывание с антителами к BTLA (пример анализа связывания для клона 11.5.1 показан на **Фиг. 3а**). Для каждого мутанта геометрическое среднее значение связывания антитела против BTLA с трансфицированными клетками выражали в виде процента от связывания с рецептором дикого типа (**Фиг. 3б**). Оценивали панель антител к BTLA и любую мутацию, которая исключала связывание всех антител, исключали из анализа, предполагая, что такие мутации приводят к радикальным изменениям в фолдинге или экспрессии, а не указывают на эпитоп антитела. Мутации Y39R и K41E полностью устраняют связывание антитела 11.5.1, оставляя при этом связывание с 2.8.6 без изменений. Эти мутации картировали на кристаллическую структуру BTLA человека (Compaan et al., J Biol Chem. 280:39553-61, 2005) на **Фиг. 3с** (черные остатки), и это указывает на эпитоп связывания с 11.5.1. Остатки, необходимые для связывания с HVEM (Gln37, Arg42, Pro59, His127; из опубликованного патента WO2017004213) также картировали на структуру, обозначив серым цветом, это показывает, что антитело 11.5.1 связывается с эпитопом, очень близким к сайту связывания с HVEM.

Пример 6. Кристаллическая структура Fab' фрагмента 2.8.6 в комплексе с BTLA человека

Структурный эпитоп антитела 2.8.6 на BTLA человека определяли путем решения кристаллической структуры Fab антитела в комплексе с внеклеточным доменом BTLA человека. Вариабельные домены тяжелой и легкой цепи антитела 2.8.6 клонировали в экспрессионные векторы pOPIN^{VH} и pOPIN^{VL} (Addgene), которые кодировали первый константный домен тяжелой цепи IgG1 мыши (с 6х-гистидиновой меткой) и константный домен каппа-цепи Ig мыши соответственно. Эти векторы временно совместно трансфицировали в клетки HEK293T для получения Fab'-фрагмента антитела к BTLA 2.8.6, который очищали методом очистки Ni-NTA. Сборный домен BTLA человека Ig-V (BTLA^{S33-D135}) клонировали в вектор pGMT7 и экспрессировали в клетках BL21(DE3)pLysS *E. coli* (Novagen) для получения телец включения. Тельца включения выделяли из клеточного осадка путем обработки ультразвуком и повторно промывали промывочным раствором, содержащим 0,5% Triton X-100. Очищенные тельца включения

ВТЛА солюбилизировали в денатурирующем растворе, содержащем 6 М гуанидин гидрохлорид. Раствор солюбилизированного белка медленно разбавляли в буфере для повторного сворачивания [0,1 М Tris–HCl (pH 8,0), 0,6 М L-аргинин, 2 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты, 3,73 мМ цистамина и 6,73 мМ цистеамина] до конечной концентрации белка 1–2 мкМ, а затем перемешивали в течение 48 ч при 4 °С. Затем повторно свернутую смесь ВТЛА концентрировали с помощью системы VIVA FLOW50 (Sartorius). ВТЛА очищали с помощью гель-фильтрации на колонке Superdex 75 (GE Healthcare).

Очищенный ВТЛА и Fab' смешивали и очищали в виде комплекса путем эксклюзионной хроматографии размеров. Кристалл, подходящий для сбора данных, был получен в 0,2 М ацетате кальция, 0,1 М имидазола pH 8,0, 10% (масс./об.) ПЭГ 8000 при 293 °К с помощью метода паровой диффузии с висящей каплей. Конечный набор данных собирали на Photon Factory и структуру определяли путем молекулярной замены с использованием структуры ВТЛА (PDB ID: 2AW2 цепь А) и анти-PD1-Fab (PDB ID: 5GGS цепь С, D) в качестве поисковых зондов.

Остатки на ВТЛА на границе с антителом 2.8.6 являются следующими: A50, G51, D52, P53, E83, D84, R85, Q86, E103, P104, V105, L106, P107, N108, D135.

Пример 7. Создание мышей с гуманизированным ВТЛА

Чтобы обеспечить платформу для оценки антител к ВТЛА человека на мышиных моделях, была создана нокин-линия мышей C57Bl/6, экспрессирующих химерную форму ВТЛА с человеческой внеклеточной областью и мышинными трансмембранной и сигнальной областями. Участок геномной ДНК человека от начала экзона 2 до конца экзона 3 вставляли в локус мыши, заменяя последовательность мыши от начала экзона 2 до конца экзона 4. Последовательности на границе экзон-интрон в начале экзона 2 мыши и конце экзона 4 мыши оставались интактными для обеспечения надлежащего сплайсинга (Фиг. 5).

Пример 8. Ингибирование антигенспецифической пролиферации Т-клеток *in vivo*

Способность агонистических антител к ВТЛА по данному изобретению (2.8.6 и 11.5.1) ингибировать антиген-специфическую пролиферацию Т-клеток *in vivo* оценивали с использованием чувствительного анализа с переносом Т-клеток (Фиг. 6а). В этом анализе

5×10^5 Т-клеток, содержащих смесь очищенных специфичных к овальбумину (OVA) CD4⁺ Т-клеток от мышей ОТП (трансгенный TCR), экспрессирующих гомозиготный BTLA человека (hBTLA), и от мышей ОТ-II, экспрессирующих мышинный рецептор BTLA дикого типа (The Jackson Laboratory), переносили нетрансгенным реципиентам C57BL/6. Переносимые клетки отличали от клеток-хозяев с использованием аллотипического маркера CD45.2 (против CD45.1). Донорские клетки дикого типа также экспрессировали зеленый флуоресцентный белок под контролем промотора убиквитина С человека, чтобы их можно было отличить от гуманизированных донорских клеток с помощью проточной цитометрии. Через день после переноса Т-клеток мышей-реципиентов иммунизировали 100 мкг овальбумина (Sigma-Aldrich) в 100 мкл PBS, смешанного с 100 мкл Imject Alum (ThermoFisher), для индукции размножения Т-клеток. На второй день мышам вводили 200 мкг антитела внутривбрюшинно. Через восемь дней после первоначального переноса Т-клеток долю гуманизированных BTLA-экспрессирующих OVA-специфических Т-клеток дикого типа в селезенке определяли с помощью проточной цитометрии. Таким образом, можно было отслеживать размножение или сокращение числа гуманизированных клеток, которые связываются с антителами к BTLA человека, по сравнению с контролями дикого типа, которые с ними не связываются. Оба антитела 2.8.6 и 11.5.1 привели к уменьшению размножения клеток с гуманизированным BTLA относительно контролей дикого типа, и это указывает на то, что они индуцируют передачу сигналов через ингибирующий рецептор BTLA, что приводит к снижению пролиферации Т-клеток (**Фиг. 6b**).

Пример 9. Ингибирование пролиферации Т-клеток в реакции смешанной культуры лимфоцитов

Способность агонистических антител к BTLA по данному изобретению (2.8.6 и 11.5.1) ингибировать пролиферацию первичных Т-клеток из гуманизированных мышей *in vitro* оценивали с использованием реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR).

Спленоциты мышей Balb/c обрабатывали митомицином С в течение 30 мин при 37 °С, затем промывали и использовали в качестве клеток-стимуляторов. Т-клетки очищали из селезенки мышей с гуманизированным BTLA с помощью отрицательной селекции с использованием сортировки клеток с магнитной активацией (набор MojoSort Mouse CD3 T cell isolation kit, Biolegend № 480023) и окрашивали с помощью набора CellTrace Violet Cell Proliferation Kit (ThermoFisher) для использования в качестве отвечающих клеток. Смешивали 4×10^5 клеток-стимуляторов и 2×10^5 отвечающих клеток на лунку в 96-

луночных планшетах с U-образным дном с различными концентрациями антитела к BTLA или изотипического контрольного антитела (клон MOPC-21, Biolegend № 400165).

Оценивали последовательные разведения 1 к 3, начиная с концентрации 1 мкг/мл, в общей сложности 10 концентраций. Во все лунки также добавляли поликлональное антитело к mHVEM (R&D systems № AF2516) 401 мкг/мл для блокирования любой фоновой сигнализации через путь BTLA и подчеркивания эффектов агонистических антител. Через 96 часов оценивали разбавление CellTrace Violet в отвечающих клетках с помощью проточной цитометрии в качестве маркера пролиферации. Пролиферацию в присутствии антитела против BTLA или изотипического контроля сравнивали с пролиферацией в отсутствие антитела. Популяции CD4⁺ и CD8⁺ гейтировали и анализировали отдельно. Оба антитела 2.8.6 и 11.5.1 снижали пролиферацию экспрессирующих человеческий BTLA Т-клеток, что указывает на то, что они индуцируют ингибирующую сигнализацию через рецептор BTLA человека. Клон 2.8.6 ингибировал CD4 Т-клетки с IC₅₀ 0,029 нМ и имел максимальный эффект 42% ингибирования пролиферации (Фиг. 7). Клон 11.5.1 ингибировал CD4 Т-клетки с IC₅₀ 0,016 нМ и имел максимальный эффект 33% ингибирования пролиферации.

Пример 10. Ингибирование сигнализации NFκB в трансфицированных BTLA человека или BTLA яванского макака Т-клеточных линий Jurkat

Способность агонистических антител к BTLA по данному изобретению (2.8.6 и 11.5.1) ингибировать сигнализацию NFκB оценивали с использованием трансфицированной BTLA репортерной Т-клеточной линии. В качестве репортерной клеточной линии для сигнализации NFκB использовали линию Т-клеток Jurkat, стабильно трансфицированную экспрессионной кассетой, которая включает в себя отвечающие на NF-κB транскрипционные элементы перед кассетой минимальный промотор CMV (mCMV)-GFP (Source BioSciences № TR850A-1). В этой репортерной клеточной линии использовали лентивирусную систему трансфекции для экспрессии полноразмерного BTLA человека или яванского макака. Эти клетки смешивали с линией клеток-стимуляторов, состоящей из клеток bw5147, экспрессирующих на своей поверхности конструкцию ScFv против CD3, как описано в публикации Leitner et al. J Immunol Methods. 2010 Oct 31;362(1-2):131-41. Линию клеток-стимуляторов также трансфицировали мышинным FcγR2B для получения Fc-рецепторов для представления агонистических антител к BTLA. 5 x 10⁴ репортерных клеток на лунку смешивали в 96-луночных планшетах с U-образным дном с

5 x 10⁴ клетками-стимуляторами в присутствии различных концентраций антитела к BTLA или изотипического контроля (клон MOPC-21, Biolegend № 400165). Через 24 часа инкубации при 37 °C клетки осаждали и окрашивали для проточной цитометрии с помощью красителя на жизнеспособность (Zombie Aqua, Biolegend № 423101) и антитела к CD45 мыши (конъюгированного с Рe-Су7 клона 104, Biolegend № 109830) для отделения клеток-стимуляторов (мышинных) от отвечающих клеток (человеческих). Геометрическое среднее экспрессии GFP оценивали для каждой концентрации антител и нормировали к экспрессии GFP в отсутствие антитела. Клон 2.8.6 ингибировал трансфицированные BTLA человека клетки с IC50 0,06 нМ и трансфицированные BTLA яванского макака клетки с IC50 0,22 нМ. Клон 11.5.1 ингибировал трансфицированные BTLA человека клетки с IC50 0,033 нМ и трансфицированные BTLA яванского макака клетки с IC50 0,14 нМ.

Пример 11. Лечение обусловленной Т-клетками мышинной модели колита помощью антитела 2.8.6

Способность агонистического антитела к BTLA 2.8.6 облегчать симптомы обусловленной Т-клетками модели колита с оценивали с использованием гуманизированных мышей. Данная модель с переносом Т-клеток ранее была описана как мышинная модель воспалительного заболевания кишечника (Ostanin et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 296:G135-46, 2009). Т-клетки CD45RB^{hi}CD25-CD4⁺, отсортированные из селезенки и лимфатических узлов мышей с гуманизированным BTLA, вводили внутрибрюшинно мышам-реципиентам с нокаутом Rag1 (Rag1^{tm1Mom}, The Jackson Laboratory), в дозе 5 x 10⁵ клеток на мышь. Перенесенные Т-клетки вызывают воспалительный колит, который развивается приблизительно через 3 недели и приводит к диарее и потере массы. Содержащиеся в тех же клетках нокаутные по Rag1 мыши, которые не получали переносимых Т-клеток, служили в качестве не имеющих заболевания контролей. В дни 7, 21 и 35 после переноса Т-клеток мышам-реципиентам внутрибрюшинно вводили 200 мкг антитела 2.8.6 или изотипического контрольного антитела. Всех мышей регулярно взвешивали, а через 8 недель взвешивали и измеряли толстую кишку, оценивали воспалительную инфильтрацию гистологическими методами, а также путем подсчета клеток и проточной цитометрии экстракта лейкоцитов из собственной пластинки. Антитело 2.8.6 предотвращало потерю массы (**Фиг. 8a**) и значительно снижало воспалительную инфильтрацию толстой кишки (**Фиг. 8b**).

Воспаление толстой кишки у больных мышей привело к увеличению отношения масса : длина толстой кишки, которое не наблюдалось у получавших 2.8.6 мышей (Фиг. 8с).

Пример 12. Лечение на мышинной модели реакции «трансплантат против хозяина» (GVHD)

Эффекты агонистических антител к BTLA оценивали на нелетальной модели GVHD, родитель-в-F1. Клетки костного мозга (ВМС) и спленоциты собирали у мышей-доноров с гуманизированным BTLA (на основе C57BL/6; H2B). 2×10^7 ВМС и 107 спленоцитов вводили внутривенно реципиентам CB6F1 (H2B^d), которых подвергли летальному облучению всего тела в дозе 9 Гр. Облученные мыши C6F1, которым были введены сингенные ВМС и спленоциты, служили в качестве контролей без заболевания. В день переноса иммунных клеток мышам внутрибрюшинно вводили 200 мкг антитела к BTLA или изотипического контроля. Мышей регулярно взвешивали и отслеживали GVHD путем вычисления относительной потери массы тела и клинического наблюдения. Мышей забивали через 5 недель после переноса иммунных клеток или достижения человеческих конечных критериев (включая > 20% потерю массы относительно исходной массы за первые 14 дней или > 15% потерю массы в любое другое время). Во время гибели взвешивали и измеряли отношение масса : длина толстой кишки в качестве маркера воспаления толстой кишки, которое является характерным клиническим признаком GVHD. Оба антитела 2.8.6 и 11.5.1 значительно снижали потерю массы, приводя к увеличению выживаемости (Фиг. 9а) и предотвращали воспаление толстой кишки (Фиг. 9b).

Пример 13. Агонистическая активность антитела 11.5.1 зависит от связывания с Fc-рецептором

Антитело 11.5.1 рекомбинантно экспрессировали в виде mIgG1k, содержащего мутацию D265A, которая, как ранее описано, значительно снижает связывание с Fc-рецептором (Clynes et al., Nat Med. 6:443-446, 2000). Это мутированное антитело оценивали в анализе с переносом Т-клеток, описанном в примере 8. Исходное антитело 11.5.1 ингибировало пролиферацию гуманизированных Т-клеток, поскольку его чистый эффект представляет собой агонизм к рецептору BTLA. Однако аннулирующая связывание с FcR мутация D265A приводила к повышенной пролиферации гуманизированных Т-клеток, что позволяет предположить, что аннулирующая связывание с FcR мутация устраняет

агонистический эффект антитела, оставляя только эффект блокирования рецептора (**Фиг. 10a**).

Кроме того, антитело 11.5.1 с мутацией D265A оценивали в анализе MLR *in vitro*, описанном в примере 9. Исходное антитело 11.5.1 также ингибировало пролиферацию гуманизированных Т-клеток, поскольку его чистый эффект представляет собой агонизм к рецептору BTLA. Аннулирующая связывание с FcR мутация D265A устраняла агонистический эффект антитела, так что антитело не проявляло эффекта в этом анализе (**Фиг. 10b**). Антитело 11.5.1 с аннулированным связыванием с FcR не усиливало пролиферацию гуманизированных клеток в этом анализе, поскольку HVEM блокировали (путем добавления поликлонального антитела к HVEM), и не было исходной сигнализации через путь, которую можно было бы блокировать блокирующим антителом к BTLA.

Пример 14. Антитела 2.8.6 и 11.5.1 не фиксируют комплемент *in vitro*

Спленоциты из гуманизированных мышей инкубировали с 10% комплемента из крольчат (BioRad) и антителами к BTLA (или изотипическим контролем, или положительным контролем — истощающим антителом к CD20; клон SA271G2 от Biolegend) в концентрации 20 мкг/мл в течение 15 мин при 37 °C. Хотя антитело к CD20 истощало большую часть В-клеток B220⁺, антитела к BTLA не истощали ни клетки B220⁺, ни клетки CD4⁺ (**Фиг. 11**), хотя обе эти популяции положительно окрашиваются на BTLA.

Пример 15. Антитела 2.8.6 и 11.5.1 не индуцируют ADCC *in vitro*

Цельные спленоциты (включая миелоидные эффекторские клетки) из гуманизированных мышей инкубировали с антителами к BTLA (или изотипическим контролем, или истощающим антителом к CD20 SA271G2) в концентрации 20 мкг/мл в течение 24 часов при 37 °C. Хотя антитело к CD20 истощало большую часть клеток B220⁺, антитела к BTLA не истощали ни клетки B220⁺, ни клетки CD4⁺ (**Фиг. 12**), хотя обе эти популяции положительно окрашиваются на BTLA.

Пример 16. Антитела 2.8.6 и 11.5.1 не истощают экспрессирующие BTLA клетки *in vivo*

Мышам с гуманизированным BTLA внутрибрюшинно вводили 200 мкг антитела к BTLA или изотипического контроля. Через 24 часа собирали селезенки и частоту различных

популяций клеток идентифицировали с помощью проточной цитометрии. Антитело к BTLA не оказывало влияния на частоту или абсолютное количество В- или Т-клеток в селезенке или на число предшественников В-клеток в костном мозге (**Фиг. 13**).

Пример 17. Антитела 2.8.6 и 11.5.1 стабилизируют экспрессию BTLA на иммунных клетках *in vivo*

Гуманизированным мышам вводили внутривенно 10 мг/кг антитела 2.8.6 или 11.5.1. Через шесть дней после инъекции мышам гуманным способом умерщвляли и селезенки собирали и перерабатывали в суспензию одиночных клеток для оценки с помощью проточной цитометрии. Клетки окрашивали коктейлем антител для идентификации субпопуляций иммунных клеток и флуоресцентно-конъюгированным антителом к BTLA, которое имело неконкурирующий эпитоп с вводимым антителом. Среднее геометрическое значение окрашивания на BTLA после инкубации *in vivo* с антителом к BTLA нормализовали по геометрическому целому значению окрашивания на BTLA (с использованием того же окрашивающего антитела) после инкубации с изотипическим контролем. Экспрессия BTLA была значительно выше на В-клетках и CD4 Т-клетках у мышам, которым вводили либо клон 2.8.6, либо клон 11.5.1, по сравнению с мышами, которым вводили изотипический контроль (**Фиг. 14**). Это позволяет предположить, что клоны 2.8.6 и 11.5.1 стабилизируют экспрессию BTLA на поверхности клетки *in vivo*, а не индуцируют подавление экспрессии рецептора, как было отмечено относительно других антител BTLA предшествующего уровня техники (M.-L. del Rio et al. / Immunobiology 215 (2010) 570–578). Для целей иммуносупрессии агонистическое антитело, которое стабилизирует экспрессию рецептора, обеспечивает преимущество длительного высокого уровня ингибирующей сигнализации через путь, по сравнению с подавляющим экспрессию антителом.

Пример 18. Переносимость и побочные эффекты на животных моделях

Ни в одном исследовании антител 2.8.6 или 11.5.1 на животных не было отмечено проблем с переносимостью или побочных эффектов.

Пример 19. Определение характеристик примеров антител к BTLA

В данном примере представлена характеристика примера антител к BTLA mIgG1, предложенных в данном документе, в дополнение к 2.8.6 и 11.5.1. Различные клоны,

перечисленные в **таблицах 1 и 2**, оценивали на аффинность связывания с BTLA и эффективность ингибирования лимфоцитов (**таблица 3**).

Таблица 1. Примеры агонистических антител к BTLA

Клон	Библиотеки	SEQ ID NO							
		CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3	VH	VL
10B1	Kabat	45	46	47	33	34	35	51	52
12F11	Kabat	53	54	55	56	57	58	59	60
14D4	Kabat	61	62	63	64	65	66	67	68
15B6	Kabat	61	69	70	71	72	73	74	75
15C6	Kabat	76	77	78	79	80	81	82	83
16E1	Kabat	45	46	84	33	34	85	86	87
16F10	Kabat	88	89	90	91	65	92	93	94
16H2	Kabat	95	96	97	98	99	100	101	102
1H6	Kabat	103	104	105	106	107	108	109	110
21C7	Kabat	76	111	112	113	114	115	116	117
24H7	Kabat	118	119	120	121	122	123	124	125
26B1	Kabat	126	127	128	79	129	130	131	132
26F3	Kabat	133	134	135	106	107	136	137	138
27G9	Kabat	103	134	139	106	107	136	141	138
3A9	Kabat	143	144	145	146	147	148	149	142
4B1	Kabat	151	152	153	154	155	156	157	158
4D3	Kabat	159	160	161	4	12	164	165	166
4D5	Kabat	167	168	169	170	171	172	173	174
4E8	Kabat	45	46	47	170	171	172	175	174
4H4	Kabat	45	46	177	154	155	178	179	180
6G8	Kabat	181	182	183	184	185	186	187	188
7A1	Kabat	76	77	78	79	80	189	82	190
8B4	Kabat	45	191	192	154	155	193	194	195
8C4	Kabat	196	197	198	199	200	201	202	203
11.5.1	Kabat	204	205	206	207	208	209	210	211
831	Kabat	212	213	214	215	34	216	217	218
6,2	Kabat	1	2	3	4	5	6	219	220
2.8.6	Kabat	20	163	22	23	176	25	221	222
3E8	Kabat	30	48	32	33	34	35	223	150

Таблица 2. Гуманизированные и сконструированные антитела

Клон	SEQ ID No.									
	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3	VH	VL	Тяжелая цепь	Легкая цепь
гуманизированное 6.2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Сконструированное гуманизированное 6.2 (вариант А)	1	11	3	4	12	6	13	14	15	16
Сконструированное гуманизированное 6.2 (вариант В)	1	11	3	4	5	6	13	8	15	10
Сконструированное гуманизированное 6.2 (вариант С)	1	17	3	4	12	6	18	14	19	16
Гуманизированное 2.8.6	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
Гуманизированное 3Е8	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
Сконструированное гуманизированное 3Е8 (вариант А)	30	40	32	33	34	35	41	37	42	39
Сконструированное гуманизированное 3Е8 (вариант В)	30	31	32	33	34	35	36	43	38	44

Для каждого антитела скорость ассоциации (on rate) и скорость диссоциации (off rate) для связывания с ВТЛА человека и КD для связывания с ВТЛА человека или яванского макака измеряли в соответствии со способом, описанным в примере 2, с аппроксимацией кривых для введения внеклеточного домена ВТЛА в одной концентрации. Эффективность ингибирования для индивидуальных антител на Т-клетках также оценивали в одной концентрации 10 мкг/мл. Анализ MLR проводили для каждого отдельного антитела в соответствии со способом, описанным в примере 9 (два биологических повтора, как показано в **таблице 4**); анализ с антителами к CD3 проводили в соответствии с описанным ниже способом (две биологических повтора, **таблица 4**); и ингибирование сигнализации NFkB в трансфицированной человеческим ВТЛА Т-клеточной линии Jurkat каждым антителом определяли в соответствии со способом, описанным в примере 10 (**таблица 4**). Среднее ингибирование Т-клеток относительно изотипического контроля в различных анализах со стимуляцией *in vitro* для каждого примера антитела рассчитывали как среднее процентное ингибирование для всех результатов анализа (**таблица 3** и **таблица 4**).

Таблица 3. Определение характеристик аффинности связывания и ингибирующего эффекта примеров антител

Клон	Блокирование лиганда	Скорость ассоциации с BTLA человека (1/Мс)	Скорость диссоциации от BTLA человека (1/с)	KD с BTLA человека (нМ)	KD с яванского макака (нМ)	Средний ингибирующий эффект <i>in vitro</i>	Эпитоп
2.8.6	Нет	6,46E+05	4,23E-04	0,65	7,89	39%	1
24H7	Нет	2,43E+05	1,60E-04	0,66	-	30%	4
11.5.1	Да	6,03E+05	4,49E-04	0,75	0,99	30%	2
14D4	Да	2,54E+05	3,77E-04	1,49	1,83	33%	2
6,2	Нет	6,30E+05	1,07E-03	1,70	9,71	35%	1
4B1	Нет	5,77E+05	1,85E-03	3,21	-	29%	4
8B4	Нет	5,38E+05	4,40E-03	8,17	-	29%	4
16H2	Нет	3,97E+05	3,27E-03	8,25	160,1	34%	1
1H6	Да	7,72E+05	6,90E-03	8,94	6,08	31%	2
8C4	Да	3,63E+05	5,76E-03	15,89	161,48	19%	2
26B1	Да	3,23E+05	9,70E-03	30,03	167,66	21%	3
7A1	Нет	4,13E+05	1,66E-02	40,17	-	24%	1
21C7	Нет	9,30E+05	4,06E-02	43,65	-	18%	5
16F10	Нет	5,81E+05	2,83E-02	48,78	-	-	1
6G8	Нет	3,18E+05	1,67E-02	52,42	-	-	1
3E8	Нет	5,43E+05	6,08E-02	111,98	607,46	41%	1
4E8	Нет	1,75E+05	3,14E-02	180,00	-	-	1
27G9	Да	1,92E+05	8,38E-02	436,86	653,63	16%	2
15C6	Нет	1,93E+05	1,38E-01	718,44	-	-	1
12F11	Нет	2,15E+05	1,55E-01	722,33	-	24%	1
10B1	Нет	4,22E+05	5,21E-01	1233,36	-	21%	1
15B6	Нет	4,47E+05	5,76E-01	1287,18	-	14%	1
4D3	Нет	1,52E+05	2,51E-01	1651,32	-	-	1
4H4	Нет	2,03E+05	3,47E-01	1708,23	-	26%	4
26F3	Да	9,21E+05	2,02E+00	2195,81	809,75	9%	2
16E1	Нет	7,30E+05	2,13E+00	2923,69	-	15%	1
4D5	Нет	2,70E+05	7,90E-01	2929,18	-	-	1
3A9	Нет	4,06E+05	1,63E+00	4006,90	-	19%	1

Таблица 4. Результаты анализа ингибирующего эффекта для примеров антител

Клон	MLR (пролиферация CD4 T-клеток)		Антитело к CD3/CD28 (пролиферация CD4 T-клеток)		Антитело к CD3/CD28 (CD69+ CD4 T- клетки)		Т-клеточный репортер (сигнализация NFκB)	Среднее значение
	повтор 1	повтор 2	повтор 1	повтор 2	повтор 1	повтор 2		
2.8.6	30%	36%	23%	35%	58%	67%	22%	39%
24H7	23%	31%	13%	23%	52%	44%	22%	30%
6,2	31%	35%	19%	21%	53%	61%	26%	35%
11.5.1	23%	18%	21%	28%	50%	47%	19%	30%
11.5.1 D265A	-3%	1%	-3%	-9%	-47%	-26%	-13%	-14%
4B1	33%	30%	14%	18%	47%	41%	23%	29%
14D4	39%	26%	24%	29%	43%	52%	16%	33%
831	25%	34%	10%	8%	50%	53%	24%	29%
16H2	40%	26%	11%	23%	51%	60%	29%	34%
1H6	31%	16%	26%	19%	47%	53%	26%	31%
8B4	33%	23%	20%	4%	51%	47%	24%	29%
21C7	8%	17%	10%	-4%	39%	35%	23%	18%
3E8	43%	35%	27%	35%	52%	64%	30%	41%
7A1	23%	29%	14%	17%	28%	38%	20%	24%
26B1	12%	10%	11%	19%	35%	30%	29%	21%
8C4	42%	-2%	12%	4%	29%	29%	21%	19%
27G9	9%	8%	10%	13%	24%	22%	24%	16%
12F11	28%	23%	5%	9%	30%	40%	30%	24%
15C6	19%	8%	2%	-2%	12%	19%	9%	10%
26F3	9%	-5%	4%	0%	19%	17%	20%	9%
4D3	12%	9%	-4%	-2%	6%	2%	26%	7%
10B1	16%	25%	8%	14%	24%	36%	27%	21%
16E1	33%	8%	4%	8%	9%	23%	22%	15%
15B6	7%	13%	9%	16%	13%	20%	21%	14%
3A9	7%	24%	9%	9%	22%	34%	27%	19%
4H4	10%	17%	14%	22%	43%	52%	25%	26%
Без антитела	3%	-3%	1%	-6%	2%	-9%	2%	-1%

Способность агонистических антител к BTLA ингибировать индуцированную антителами к CD3 и антителами к CD28 активацию Т-клеток оценивали следующим образом.

Спленоциты из гуманизированных мышей BTLA превращали в суспензию одиночных клеток и обрабатывали буфером АСК для лизиса эритроцитов. Клетки окрашивали CFSE (Biolegend № 423801) для отслеживания пролиферации клеток. Сеяли по 2×10^5 клеток на лунку в 96-луночные планшеты с U-образным дном с растворимым антителом к CD3 (клон 145.2C11; Biolegend № 100339) и антителом к CD28 (клон 37.51; Biolegend № 102115), каждое в концентрации 50 нг/мл, и с растворимым антителом к BTLA или изотипическим контролем в концентрации 10 мкг/мл. Через 72 часа клетки анализировали с помощью проточной цитометрии для оценки пролиферации («антитело к CD3/CD28 (пролиферация CD4 Т-клеток)») и активации Т-клеток путем окрашивания поверхностных маркеров активации («антитело к CD3/CD28 (CD69+ CD4 Т-клетки)»). Для каждого антитела BTLA рассчитывали процент ингибирования по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

Кроме того, для каждого антитела к BTLA оценивали способность блокировать лиганд, например, конкуренцию с HVEM за связывание с BTLA оценивали в соответствии со способом, описанным в примере 4, и результаты представлены как «Да» для более 90% ингибирования связывания HVEM-BTLA и «Нет» для менее 10% ингибирования связывания HVEM-BTLA. Функциональный эпитоп каждого антитела к BTLA также определяли в соответствии со способом, описанным в примере 5. В колонку «эпитоп» в **таблице 3** сведены данные о эпитопной группе, с которой связывается каждое отдельное антитело к BTLA. Антитела 2.8.6, 6.2, 831, 16H2, 7A1, 16F10, 6G8, 3E8, 4E8, 15C6, 12F11, 10B1, 15B6, 4D3, 16E1, 4D5 и 3A9 все связываются с первым эпитопом (обозначен как «эпитоп 1» в таблице), содержащим по меньшей мере один критический остаток, выбранный из D52, P53, E55, E57, E83, Q86, E103, L106 и E92 (положение в соответствии с SEQ ID NO:225). Антитела, связывающиеся с эпитопом 1, не конкурируют с лигандом HVEM при связывании с BTLA. Антитела 11.5.1, 14D4, 1H6, 8C4, 27G9, 26F3 все связываются с другим вторым эпитопом («эпитоп 2»), содержащим по меньшей мере один критический остаток, выбранный из Y39, K41, R42, Q43, E45 и S47. Антитела, связывающиеся с эпитопом 2, конкурируют с лигандом HVEM при связывании с BTLA.

Антитело 26В1 связывается с третьим эпитопом («эпитоп 3»), содержащим по меньшей мере один критический остаток, выбранный из D35, T78, K81, S121 и L123. Антитела, связывающиеся с эпитопом 3, конкурируют с лигандом HVEM при связывании с BTLA. Антитела 24Н7, 4В1, 8В4, 4Н4 все связываются с другим четвертым эпитопом («эпитоп 4»), содержащим критический остаток Н68. Антитела, связывающиеся с эпитопом 4, не конкурируют с лигандом HVEM при связывании с BTLA. Антитело 21С7 связывается с другим пятым эпитопом («эпитоп 5»), содержащим по меньшей мере один критический остаток, выбранный из N65 и A64. Антитела, связывающиеся с эпитопом 5, не конкурируют с лигандом HVEM при связывании с BTLA.

Пример 20. Гуманизация и разработка CDR для антител к BTLA 6.2, 2.8.2 и 3Е8

Антитело 2.8.6 гуманизировали путем посадки CDR на гомологичные каркасные области зародышевой линии человека (см. SEQ ID NO: 26, 27). IGHV2-5*08 использовали для тяжелой цепи, а IGKV3-11*01 использовали для легкой цепи. После гуманизации связывание с BTLA оценивали с помощью SPR. Гуманизированное антитело 2.8.6 связывалось с мономерным BTLA с K_D 0,73 нМ.

Вариабельные домены антител 6.2 и 3Е8 гуманизировали до гомологичных каркасных областей зародышевой линии человека (Seq ID No. 7, 8 и 36, 37). В случае 3Е8 выбранные каркасы-акцепторы были VH1-1-08 и JH6 для тяжелой цепи и VK3-L6 и JK2 для легкой цепи. В случае 6.2 выбранные каркасы-акцепторы были VH3-3-21 и JH6 для тяжелой цепи и VK2-A19 и JK4 для легкой цепи.

Иногда можно заменить определенные остатки в CDR или каркасных областях переменного домена антитела для устранения нежелательных характеристик без значительного влияния на связывание с мишенью. CDRH2 гуманизированного антитела 6.2 модифицировали с помощью одной замены N56Q (SEQ ID NO: 17) или замен N56Q и D54E (SEQ ID NO: 11) для устранения потенциала дезамидирования и потенциала изомеризации соответственно. CDRL2 гуманизированного антитела 6.2 модифицировали с помощью замены D61E для снижения прогнозируемой иммуногенности, определяемой с помощью анализа Lonza Epibase (Seq ID NO: 12). В каркасную область переменного домена тяжелой цепи гуманизированного антитела 6.2 за пределами CDR была введена замена S77T для снижения прогнозируемой иммуногенности, а в каркасную область переменного домена легкой цепи была введена замена Q51K для снижения

иммуногенности. Были созданы три сконструированных варианта гуманизированного антитела 6.2, содержащие различные комбинации этих замен («вариант А», «вариант В» и «вариант С» сконструированного гуманизированного антитела 6.2). В таблице 2 описаны входящие в антитело CDR и переменные домены для каждого из этих вариантов.

Модифицированный вариант антитела 6.2, содержащий в CDRH2 только замену N56Q, но не замену D54E (например, вариант С сконструированного гуманизированного антитела 6.2), не описан в публикации PCT/GB2019/053569.

Аналогичным образом CDRH2 гуманизированного антитела 3Е8 модифицировали с помощью замены N57Q для устранения потенциала дезамидирования и с помощью замены K63S для снижения прогнозируемой иммуногенности (Seq ID No. 40). За пределами CDR вводили замены G42D и A61S в каркасную область переменного домена легкой цепи 3Е8 для снижения прогнозируемой иммуногенности. Кроме того, в каркасную область переменного домена легкой цепи вводили замены P15L и P81A для возврата этих положений к мышинной последовательности вместо введения пролинов, которые могут влиять на локальную конформацию. Последовательность сконструированного переменного домена легкой цепи 3Е8 содержит все четыре эти замены в Seq ID No. 43. В таблице 2 описаны используемые CDR-области и переменные домены для сконструированных вариантов гуманизированного антитела 3Е8.

Пример 21. Связывание гуманизированных антител к BTLA с растворимым BTLA человека и яванского макака

Аффинность связывания и кинетику гуманизированных агонистических антител к BTLA человека или яванского макака определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием прибора Biacore 8K (GE Healthcare). Для покрытия сенсорного чипа Series S CM5 Sensor Chip (GE Healthcare) поликлональным антителом к человеческому IgG использовали набор для захвата антител человека (GE Healthcare, кат. № 29234600). Затем антитело к BTLA захватывали на поверхность биосенсора, а в референсном канале захватывали антитело отрицательного контроля (изотипический контроль — человеческий IgG1k; Sino Biological кат. № HG1K). Различные концентрации мономерного растворимого внеклеточного домена BTLA человека (BTLA^{K31-R151}, получен самостоятельно рекомбинантным способом) или растворимый внеклеточный домен BTLA яванского макака (BTLA^{K31-R151}, получен самостоятельно рекомбинантным способом) затем вводили по иммобилизованным антителам в буфере HBS-EP (GE Healthcare, кат. №

BR100669), pH 7,4 (HBS-P) при 37 °C, анализ кинетики с одним циклом. Для BTLA человека использовали концентрации от 673 нМ до 164 пМ в последовательных четырехкратных разведениях. Для BTLA яванского макака использовали концентрации от 1351 нМ–330 пМ в последовательных четырехкратных разведениях. Скорости ассоциации и диссоциации аппроксимировали с использованием программного обеспечения BiaEvaluation (GE Healthcare) после вычитания эталона и пустого образца и вычисляли константы диссоциации (таблица 5). Гуманизированное антитело 2.8.6 связывалось с человеческим BTLA с KD 2,33 нМ и с BTLA яванского макака с KD 147 нМ. Вариант В гуманизированного антитела 3E8 (3E8_var_B) связывается с BTLA человека с KD 141 нМ и BTLA яванского макака с KD 1520 нМ. Вариант А гуманизированного антитела 6.2, который содержит обе замены D54E и N56Q в области CDRH2 для устранения потенциала изомеризации и дезамидирования соответственно, связывается с BTLA человека с KD 10,9 нМ и BTLA яванского макака с KD 695 нМ. Это связывание отражает значительное снижение аффинности относительно исходного антитела клона 6.2, которое связывается с BTLA человека с KD 1,7 нМ и BTLA яванского макака с KD 9,71 нМ (таблица 5). Гуманизированный вариант антитела 6.2, который содержит только замену N56Q, но не замену D54E в CDRH2, названный вариантом С гуманизированного антитела 6.2 (или 6.2_var_C), связывается с BTLA человека с KD 1,25 нМ и BTLA яванского макака с KD 15,4 нМ с сохранением таким образом аффинности, намного более близкой к исходному клону.

Антитело	BTLA человека			BTLA яванского макака		
	Ka (1/Mc)	Kd (1/c)	KD (M)	Ka (1/Mc)	Kd (1/c)	KD (M)
Гуманизированное антитело 2.8.6	6,73 x 10 ⁵	1,57 x 10 ⁻³	2,33 x 10 ⁻⁹	1,7 x 10 ⁵	2,5 x 10 ⁻²	1,47 x 10 ⁻⁷
Гуманизированное антитело 6.2_var_A	6,94 x 10 ⁵	7,56 x 10 ⁻³	1,09 x 10 ⁻⁸	7,29 x 10 ⁴	5,07 x 10 ⁻²	6,95 x 10 ⁻⁷
Гуманизированное антитело 6.2_var_C	1,06 x 10 ⁶	1,33 x 10 ⁻³	1,25 x 10 ⁻⁹	2,29 x 10 ⁵	3,52 x 10 ⁻³	1,54 x 10 ⁻⁸
Гуманизированное антитело 3E8_var_B	8,65 x 10 ⁵	1,22 x 10 ⁻¹	1,41 x 10 ⁻⁷	2,87 x 10 ⁵	4,31 x 10 ⁻¹	1,52 x 10 ⁻⁶

Таблица 5. Кинетика связывания и аффинность, с которыми антитела связываются с растворимым BTLA человека или яванского макака, определенные с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37 °C

Пример 22. Связывание гуманизированных антител к BTLA с BTLA на клетках

Способность агонистических антител к BTLA по данному изобретению связываться с BTLA человека или яванского макака, экспрессируемым на клеточной поверхности, оценивали с помощью проточной цитометрии. Лентивирусную систему трансфекции использовали для экспрессии полноразмерного BTLA человека или яванского макака в линии Т-клеток Jurkat. 1×10^5 клеток на лунку высевали в 96-луночные планшеты с U-образным дном. Связывание антитела к BTLA по сравнению с изотипическим контролем hIgG1k P238D (клон MOPC-21, полученный рекомбинантным способом в компании Absolute Antibody; тяжелая цепь SEQ ID NO: 230, легкая цепь SEQ ID NO: 231) оценивали при двенадцати концентрациях при последовательных разведениях 1 к 3 в буфере для FACS (PBS, 2% FCS, 0,05% азида натрия), начиная с концентрации 30 мкг/мл. Неспецифическое связывание антител предотвращали добавлением Fc-блока (Biolegend № 101319). Антитела инкубировали с клетками в течение 60 минут на льду, затем клетки дважды промывали буфером для FACS, а затем окрашивали конъюгированным с AF647 антителом к hIgG (клон HP6017; BioLegend кат. № 409320). Вторичное антитело инкубировали в течение 30 минут на льду, затем клетки промывали и ресуспендировали в буфере для FACS для анализа на проточном цитометре. Строили график геометрического среднего интенсивности флуоресценции вторичного антитела для каждой концентрации и вычисляли EC50 для связывания рецептора с помощью нелинейной аппроксимации кривой с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Гуманизированное антитело 2.8.6 связывается с клетками, экспрессирующими BTLA человека, с EC50 0,066 нМ (Фиг. 15a) и клетками, экспрессирующими яванского макака, с EC50 0,854 нМ (Фиг. 15b). Гуманизированное антитело 6.2_var_C связывается с клетками, экспрессирующими BTLA человека, с EC50 0,062 нМ и клетками, экспрессирующими

BTLA яванского макака, с EC50 0,148 нМ. Гуманизированное антитело 3E8_var_B связывается с клетками, экспрессирующими BTLA человека, с EC50 0,177 нМ и клетками, экспрессирующими BTLA яванского макака, с EC50 15,6 нМ.

Пример 23. Аффинности связывания Fc-вариантов антител с Fc-рецепторами человека

В примере 13 неожиданно было обнаружено, что агонистическая функция антител к BTLA может зависеть от взаимодействия Fc-рецептора с областью Fc антитела. У людей имеется один ингибирующий рецептор Fc-гамма (FcγR2B), тогда как другие Fc-гамма-рецепторы все обеспечивают активирующие иммунитет сигналы (FcγR1A, FcγR2A, FcγR3A и FcγR3B). Авторы изобретения предполагают, что для эффективности агонистического антитела к BTLA при подавлении иммунных ответов без индукции воспалительной сигнализации FcR антитело может нуждаться в избирательном связывании Fc с FcγR2B. Более того, избирательное связывание с FcγR2B будет способствовать двусторонней ингибирующей сигнализации через BTLA на экспрессирующей BTLA клетке и через FcγR2B на экспрессирующей FcγR2B клетке, что будет способствовать иммуносупрессивному действию антитела. Это было бы желательно для терапевтического антитела, предназначенного для лечения заболеваний, связанных с гиперактивацией иммунитета. И наоборот, очень высокая аффинность к FcγR2B может отрицательно влиять на период полужизни антител из-за оборота рецептора в синусоидальных эпителиальных клетках печени (Ganesan et al. The Journal of Immunology 189(10): 4981–88, 2012), что продемонстрировано на имеющем усиленное связывание с FcγR2B антителе IgG1 XmAb7195, что связывается с FcγR2B с KD 7,74 нМ (Chu et al. Journal of Allergy and Clinical Immunology 129(4): 1102–15, 2012; <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674911018343> (May 13, 2020) и, по сообщению Xencor, имеет средний период полужизни *in vivo* 3,9 дня в исследовании фазы 1a (American Thoracic Society (ATS) 2016 International Conference in San Francisco, CA - A6476: Poster Board Number 407), по сравнению со средним периодом полужизни около 21 дня для IgG1 дикого типа (Morell, Terry, and Waldmann. Journal of Clinical Investigation 49(4): 673–80, 1970; <http://www.jci.org/articles/view/106279> (May 16, 2020)). Таким образом, хотя избирательность для FcγR2B и достаточное связывание для обеспечения агонистичности могут быть желательными для агонистического антитела к BTLA,

чрезмерно высокая аффинность к FcγR2B может быть нежелательной для терапевтического применения, поскольку возникающий в результате укороченный период полужизни будет требовать более частого введения доз.

Рекомбинантным способом были получены различные варианты антител с мутированной областью Fc (содержащие вариабельные домены гуманизированного антитела 2.8.6), и их связывание с различными Fc-гамма-рецепторами человека оценивали с помощью поверхностного плазмонного резонанса (при 37 °C в буфере HBS-EP при pH 7,4). Fc-варианты были получены рекомбинантным способом либо на каркасе hIgG1, либо на каркасе hIgG4 с заменами, для которых известно влияние или которые могут влиять на связывание с FcR на основании их положения на границе контакта Fc-FcR (hIgG1 G236D, hIgG1 G237D, hIgG1 P238D, hIgG1 D265A, hIgG1 S267E, hIgG1 P271G, hIgG1 A330R, hIgG1 K322A, hIgG1 N297A, hIgG4 P238D, hIgG4 G237D, hIgG4 P271G, hIgG4 S330R, hIgG4 F234A, hIgG4 L235A). Эти мутации оценивали как одиночные замены или в комбинации. Кроме того, оценивали варианты, содержащие участки последовательности, переключенные с hIgG2, как описано в публикации Armour et al. (*Molecular Immunology* 40(9): 585–93, 2003) (называемые дельта b, дельта c, дельта ab и дельта ac). Кроме того, оценивали связывание mIgG1 и mIgG1 D265A с FcR человека.

В случае низкоаффинных FcγR (FcγR2A, FcγR2B, FcγR3A и FcγR3B) взаимодействия оценивали с помощью поверхностного плазмонного резонанса с рекомбинантно экспрессированными FcR (только внеклеточные домены) в качестве аналита. Вкратце, рекомбинантный внеклеточный домен BTLA человека (BTLA^{K31-R151}) ковалентно иммобилизовали в обеих проточных кюветах на всех каналах сенсорного чипа CM5 Series S с использованием набора GE Healthcare Amine coupling kit. Затем в проточной кювете 2 каждого канала выполняли захват анализируемого Fc-варианта антитела 2.8.6 (приблизительно 500–1000 отвечающих единиц). Затем проводили анализ аффинности в стабильном состоянии путем введения различных концентраций FcR в нескольких циклах и измерения равновесного связывания. Использовали двойное референсирование (вычитание сигнала референса Fc1 и также вычитание сигнала впрыска пустой нулевой концентрации). KD вычисляли по кривым Ленгмюра (график равновесного связывания относительно концентрации аналита для определения необходимой концентрации для полумаксимального связывания).

Для высокоаффинных взаимодействий с FcR (FcγR1A и также оценка FcRn при pH6,0) связывание оценивали в кинетическом анализе с антителом в качестве аналита. Вкратце, биотинилированный FcR (Sino Biological, кат. № 10256-H08S-B для FcγR1A или кат. № CT009-H08H-B для FcRn) захватывали в проточной кювете 2 на стрептавидиновом чипе (Series S Sensor Chip SA - BR-1005-31) согласно прилагаемому протоколу. Референсную проточную кювету 1 оставляли пустой во всех каналах. Затем очищенное антитело вводили в одной концентрации и рассчитывали скорости ассоциации/диссоциации с помощью аппроксимации кривой в программном обеспечении BiaEvaluation.

Взаимодействие с FcRn при pH6,0 не вызывает воспалительной сигнализации, но является необходимым для поддержания периода полужизни антитела *in vivo*, и поэтому это взаимодействие желательно для терапевтического антитела. Область Fc IgG имеет два сайта связывания с FcRn, поэтому данная оценка, выполненная с иммобилизованным с высокой плотностью FcRn, обеспечивает оценку авидности взаимодействия, а не истинную KD.

Значения KD связывания каждого из Fc-вариантов с каждым из Fc-рецепторов человека, где проводили оценку, представлены в **таблице 6**. Присутствие мутации P238D значительно усиливало избирательность к FcγR2B (путем некоторого увеличения аффинности к FcγR2B при резком снижении аффинности к другим FcγR). Ранее описанная комбинация мутаций, включающая P238D (P238D G237D P271G A330R), названная V9 (Mimoto et al. Protein Engineering, Design and Selection 26(10): 589–98, 2013), значительно увеличивала аффинность связывания с FcγR2B, но также сохраняла значительное связывание с 131R, полиморфным вариантом FcγR2A. Тот же эффект повышения избирательности к FcγR2B наблюдался при внедрении P238D, отдельно или в комбинации, в каркас hIgG4.

	KD (мкМ)							FcRn pH6 (авид- ность в нМ)
	FcγR1 A	FcγR2 A 131R	FcγR2 A 131H	FcγR2 B	FcγR3 A 158F	FcγR3 A 158V	FcγR3 B	
hIgG1	0,00375	1,57	1,98	8,65	9,37	2,78	22,9	4,58
hIgG4	0,026	4,08	8,89	6,39	228	89,3	1100	13
hIgG1 P238D	0,465	28,9	76,5	4,78	2480	7010	1580	1,43
hIgG1 P238D G237D P271G A330R (V9)	0,697	1,84	26,2	0,173	216	321	6090	1,98
hIgG4PAA	1,34	21,4	39,1	41	NB	15	NB	н/о
hIgG4 P238D	н/о	47,9	312	17,5	NB	NB	NB	н/о
hIgG4 P238D G237D P271G S330R	н/о	2,01	30,5	0,574	933	NB	NB	н/о
hIgG1 D265A	0,497	48,3	40,1	193	1490	NB	5200	12
hIgG1 D265A G236D	NB	91,4	NB	748	NB	NB	NB	14
hIgG1 D265A A330R	н/о	67	39,4	347	NB	NB	9100	н/о
hIgG1 D265A S267E	0,415	26,7	173	157	NB	NB	NB	11,9
hIgG1 D265A G236D S267E	NB	61,8	NB	113	NB	1650	NB	18,7
hIgG1 D265A G236D A330R	NB	91,8	91,3	398	NB	NB	NB	14
hIgG1 D265A S267E A330R	н/о	22	113	80,1	NB	NB	NB	н/о
hIgG1 D265A G236D S267E A330R	NB	54,4	NB	104	NB	NB	NB	н/о
hIgG1 D265A P238D	н/о	348	4590	684	NB	NB	NB	н/о
hIgG4 D265A	н/о	191	280	1000	NB	NB	NB	н/о
hIgG4 D265A P238D	н/о	680	NB	NB	NB	NB	NB	н/о
hIgG4 D265A G236D S267E A330R	н/о	167	2430	114	NB	NB	NB	н/о
hIgG1 дельта ab	NB	9,56	4,86	82,5	722	494	2820	14,8
hIgG1 дельта ab P238D	NB	-	771	876	NB	NB	NB	н/о
hIgG1 дельта ac	2,85	79,3	82,2	131	344	96,4	NB	11,9
hIgG1 дельта ac P238D	NB	399	NB	1170	NB	1410	NB	14,2
hIgG4 дельта b	н/о	6,2	5,67	46,2	1860	350	3240	12,1
hIgG4 дельта b P238D	н/о	994	NB	NB	NB	NB	NB	17,3
hIgG4 дельта c	NB	53,5	73,7	64,4	697	127	2290	14,5
hIgG4 дельта c P238D	NB	502	NB	826	NB	4460	NB	18,7
hIgG1 K322A	0,0052	н/о	4,6	11	5,75	2,18	11,9	н/о
hIgG1 N297A	8,7	447	2150	1080	NB	NB	NB	9,41
мышинный IgG1 D265A	NB	35,1	648	2510	NB	NB	NB	18,1
мышинный IgG1	NB	0,127	2,3	5,77	273	1860	NB	н/о

Таблица 6. Аффинности связывания (KD) Fc-вариантов с FcR человека, оцениваемые с помощью SPR при 37°C. н/о = не оценивали, NB = связывание не обнаружено.

Пример 24. Ингибирование активации Т-клеток гуманизированными агонистами BTLA в репортерном анализе NFκB зависит от связывания с Fc-рецептором

BTLA представляет собой ингибирующий рецептор, экспрессируемый на Т-клетках, и поэтому можно ожидать, что агонистические антитела против BTLA будут ингибировать активацию Т-клеток путем индукции ингибиторной сигнализации через рецептор. Способность выбранных гуманизированных агонистических антител к BTLA ингибировать активацию Т-клеток оценивали с использованием трансфицированной BTLA репортерной Т-клеточной линии. В качестве репортерной клеточной линии для сигнализации NFκB использовали линию Т-клеток Jurkat, стабильно трансфицированную экспрессионной кассетой, которая включает в себя отвечающие на NF-κB транскрипционные элементы перед кассетой минимальный промотор CMV (mCMV)-GFP (Source BioSciences № TR850A-1). В этой репортерной клеточной линии использовали лентивирусную систему трансфекции для экспрессии полноразмерного BTLA человека. Эти клетки смешивали с линией клеток-стимуляторов, состоящей из клеток bw5147, экспрессирующих на своей поверхности конструкцию ScFv против CD3, как описано в публикации Leitner et al. J Immunol Methods. 362(1-2):131-41, 2010). Линию клеток-стимуляторов также трансфицировали человеческим FcγR2B с получением Fc-рецепторов для представления агонистических антител к BTLA. 5 × 10⁴ репортерных клеток на лунку смешивали в 96-луночных планшетах с U-образным дном с 5 × 10⁴ клетками-стимуляторами в присутствии различных концентраций антитела к BTLA или hIgG1k изотипического контрольного антитела (Sino Biologicals кат. №HG1K). Через 24 часа инкубации при 37 °C клетки осаждали и окрашивали для проточной цитометрии с помощью красителя на жизнеспособность (Zombie Aqua, Biolegend № 423101) и антитела к CD45 мыши (конъюгированного с Pe-Cy7 клона 104, Biolegend № 109830) для отделения клеток-стимуляторов (мышинных) от отвечающих клеток (человеческих). Геометрическое среднее экспрессии GFP оценивали для каждой концентрации антител и нормировали к экспрессии GFP в отсутствие антитела.

Гуманизированное антитело 2.8.6 протестировали на изотипе hIgG4, а также на изотипе hIgG1 P238D и изотипе hIgG1 V9 (P238D G237D P271G A330R). Антитело 2.8.6 hIgG1

P238D приводило к более эффективному ингибированию сигнала NFkB, чем антитело 2.8.6 hIgG4, а антитело 2.8.6 hIgG1 V9 приводило к еще более эффективному ингибированию (Фиг. 15a). Таким образом, в условиях, в которых FcγR2B является единственным присутствующим Fc-рецептором, повышение аффинности к FcγR2B придает превосходную агонистическую активность агонистическим антителам BTLA. При тестировании тех же антител в модифицированном варианте анализа, в котором клетки-стимуляторы не экспрессировали FcγR2B, не наблюдалось ингибирующего эффекта какого-либо антитела, что подтверждает, что агонизм антитела к BTLA зависит от взаимодействия антител с FcR (Фиг. 15b). Мышиные исходные антитела IgG1, исходные для 2.8.6, 6.2 и 3E8, также способны ингибировать активацию Т-клеток в репортерном анализе, когда человеческий FcγR2B экспрессировался на клетках-стимуляторах, что соответствует перекрестной реактивности между mIgG1 и hFcγR2B, наблюдаемой в примере 23.

Гуманизированные антитела 2.8.6, 6,2_var_C и 3E8_var_B были получены на изоците hIgG1 P238D и сравнивались в описанном выше репортерном анализе Т-клеток. Они также сравнивались с агонистом BTLA предшествующего уровня техники 22B3 (экспрессированном на изоците hIgG4PAA), описанным в публикации WO 2018/213113, и со слитым белком, естественным лигандом BTLA HVEM, который слит с областью Fc mIgG1 (hHVEM-mFc, самостоятельное получение рекомбинантным способом); слитый белок hHVEM-mFc, содержащий сигнальный пептид и С-концевую His-метку, имеет последовательность, описанную в SEQ ID NO: 229). Все три гуманизированных P238D-варианта антитела продемонстрировали значительно большее ингибирование сигнала NFkB по сравнению с 22B3 или hHVEM-mFc (Фиг. 16a). 3E8_var_B ингибировал сигнал NFkB на величину до 54%, с IC50 65 пМ. 6.2_var_C ингибировал сигнал NFkB на величину до 47%, с IC50 28 пМ. 2.8.6 ингибировал сигнал на величину до 42%, с IC50 59 пМ. 22B3 ингибировал сигнал NFkB на величину до 18% с IC50 3,8 нМ. hHVEM-mFc ингибировал сигнал NFkB на величину до 27% с IC50 9,6 нМ. Таким образом, в условиях, когда FcγR2B является единственным присутствующим Fc-рецептором, гуманизированные антитела 2.8.6 hIgG1 P238D, 6.2_var_C hIgG1 P238 и 3E8 hIgG1 P238D являются значительно более действенными и эффективными агонистами BTLA, чем антитело предшествующего уровня 22B3 hIgG4PAA, с обеспечением более сильного сигнала, чем слитый белок, из эндогенного лиганда HVEM с Fc.

Пример 25. Ингибирование пролиферации первичных Т-клеток человека в реакции смешанной культуры лимфоцитов гуманизированными агонистами BTLA

Способность выбранных агонистических антител к BTLA ингибировать пролиферацию Т-клеток человека оценивали в контексте реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR). Вкратце, первичные Т-клетки человека выделяли из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) здоровых доноров с использованием набора human Pan T cell isolation kit (Miltenyi Biotec кат. № 130-096-535) и окрашивали красителем на пролиферацию клеток, Tag-it Violet (Biolegend кат. № 425101). Дендритные клетки (DC) из аллогенных моноцитов получали путем культивирования моноцитов CD14+, выделенных из PBMC, с использованием набора для выделения CD14+ (Miltenyi Biotec, кат. № 130-050-201). Моноциты CD14+ обрабатывали рекомбинантным IL-4 человека (Peprotech кат. № 200-04) и GM-CSF (Biolegend кат. № 572904) в течение 7 дней. Затем созревание DC индуцировали путем добавления рекомбинантного TNF-а человека (Biolegend № 717904) в течение еще 2 дней. Зрелые дендритные клетки экспрессируют как активирующие, так и ингибирующие FcγR (Guilliams et al. Nature Reviews Immunology 14(2): 94–108, 2014. <http://www.nature.com/articles/nri3582> (May 18, 2020)).

Затем выполняли MLR путем совместного культивирования 1×10^5 общих Т-клеток с аллогенными зрелыми DC в соотношении 4 : 1 (Т : DC) в 96-луночных планшетах с плоским дном. Т-клетки и DC инкубировали в течение 5 дней без антитела или в присутствии различных доз агонистического антитела к BTLA (2.8.6 hIgG1 P238D, 2.8.6 hIgG1 V9, 2.8.6 IgG4), изотипического контрольного антитела hIgG1k (Sino Biologicals кат. № HG1K) или агониста BTLA предшествующего уровня техники 22B3 hIgG4PAA. Через 5 дней пролиферацию Т-клеток оценивали с помощью проточной цитометрии. Т-клетки собирали и окрашивали антителом к CD3 (конъюгированный с PerCP/Cy5.5 клон OKT3, Biolegend кат. № 317336), антителом к CD4 (конъюгированный с BB515 клон RPA-T4, BD Horizon кат. № 564419), антителом к CD8 (конъюгированный с BV510 клон SK1, BD Horizon кат. № 563919) и красителем жизнеспособности (Zombie NIR, Biolegend кат. № 423105) и получали данные на приборе BD FACSCelesta. Пролиферацию CD4 (измеренную как процент клеток с низкой экспрессией CTV) в присутствии антитела нормализовали к средней пролиферации в отсутствие антитела. На Фиг. 17 представлены объединенные данные по 6 отдельным MLR с различными донорами PBMC. Антитело 2.8.6 на изотипе hIgG1 P238D значительно ингибировало пролиферацию CD4 Т-клеток со

средним ингибирующим эффектом 51% при 10 мкг/мл. Антитело 2.8.6 на изоците hIgG1 V9 либо на изоците hIgG4 не оказывало ингибирующего эффекта. Следовательно, неожиданно было обнаружено, что в условиях, в которых присутствует множество Fc-рецепторов, изоцит hIgG1 P238D, который избирательно связывается с FcγR2B, обеспечивает превосходную агонистическую активность в отношении BTLA, чем другие исследованные изоциты. Неэффективность в этих условиях изоцита hIgG1 V9, которая связывается с FcγR2B с ~30-кратно более высокой аффинностью, чем изоцит P238D, может быть обусловлена активирующей сигнализацией через FcγR2A(131R), с которым он также сохраняет значительное связывание. Альтернативно неэффективность изоцита V9 hIgG1 может быть обусловлена стабильным формированием цис-взаимодействий между антителом, BTLA и FcγR2B на одной и той же поверхности клетки (например, на дендритных клетках, которые экспрессируют оба рецептора), что может не вызывать передачу сигналов, но блокировать образование продуктивных транс-взаимодействий между антителом, BTLA и FcγR2B на разных клетках. Более низкая аффинность изоцита P238D в отношении FcγR2B может означать, что в случае, если эти цис-взаимодействия и образуются, они являются более короткоживущими и не полностью блокируют транс-взаимодействия.

Антитело 22B3 hIgG4PAA также не оказывало ингибирующего эффекта в реакции смешанной культуры лимфоцитов, и по существу наблюдалась тенденция к увеличению пролиферации CD4 Т-клеток, которую можно объяснить блокированием со стороны антител в естественной ингибирующей сигнализации через BTLA посредством препятствования его взаимодействия с лигандом HVEM. Антитела 6.2, 3E8 и 286 связываются с эпитопом на BTLA, который не перекрывается с участком связывания с HVEM, и поэтому эти антитела не блокируют взаимодействие BTLA-HVEM (пример 19).

Пример 26. Ингибирование активации первичных В-клеток человека агонистами BTLA

Оценивали способность агонистических антител к BTLA ингибировать активацию первичных В-клеток человека. В-клетки экспрессируют высокие уровни как BTLA, так и FcγR2B.

Первичные В-клетки человека выделяли из мононуклеарных клеток периферической крови здоровых доноров с использованием набора human B cell isolation kit (Miltenyi Biotec

кат. № 130-050-301) и окрашивали красителем на пролиферацию клеток, Tag-it Violet™ (Biolegend кат. № 425101).

Затем 1×10^5 В-клеток на лунку 96-луночного планшета с плоским дном стимулировали 0,01 мкМ агониста TLR9 ODN2006 (InvivoGen кат. № trl-2006-1) в присутствии или в отсутствие различных доз изотипического контрольного антитела или выбранных агонистических антител к BTLA. Были протестированы агонисты BTLA 2.8.6, 6.2_var_C и 3E8_var_B (все изотипы hIgG1 P238D), и их сравнивали с агонистом BTLA предшествующего уровня техники 22B3 hIgG4PAA. В качестве положительного контроля использовали рекомбинантный слитый белок HVEM (hHVEM-mFc, полученный самостоятельно). После 5 дней инкубации при 37 °C В-клетки собирали и окрашивали антителом к CD20 (конъюгированный с PE-CF594 клон 2H7, BD Horizon № 562295) вместе с красителем жизнеспособности (Zombie NIR, Biolegend № 423105) для оценки их пролиферации с помощью проточной цитометрии. Кроме того, собирали супернатант культуры для оценки методом ИФА продукции IL-6 (rndsystems кат. № DY206) и IL-10 (rndsystems кат. № DY217B).

При использовании по существу тех же методик, которые описаны выше, агонистические антитела BTLA способны ингибировать пролиферацию В-клеток столь же эффективно, что и положительный контроль hHVEM-mFc. Кроме того, все три варианта антитела продемонстрировали значительно большее ингибирование пролиферации В-клеток, чем 22B3. Кроме того, агонисты BTLA P238D нарушали продукцию IL-10 (Фиг. 18) и IL-6 активированными В-клетками. В соответствии с данными по пролиферации способность P238D-антител к BTLA ингибировать продукцию IL-10 и IL-6 была выше по сравнению с антителом 22B3.

Пример 27. Лечение ксеногенной модели реакции «трансплантат против хозяина» (GVHD)

Профилактику вызванной человеческими PBMC реакции трансплантат против хозяина исследовали *in vivo*. Вкратце, использовали самок мышей NSG (JAX Labs, линия № 05557), возраст приблизительно 8–10 недель, ($n = 10$ мышей на экспериментальную группу) облучали путем облучения всего тела в дозе 2,4 Гр. Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) выделяли из продукта leukopak (продукт NemaCare, заказан через Tissue Solutions) и ресуспендировали в количестве 50×10^6 клеток

на мл PBS. Мышам вводили 200 мкл клеточной суспензии (10×10^6 PBMCs) внутривенно (в/в) путем инъекции в хвост через 1 день после облучения. На следующий день мышам вводили 10 мг/кг тестируемого антитела путем внутрибрюшинной инъекции. Мышей регулярно взвешивали и умерщвляли при потере 15% массы тела или через 28 дней. По завершению исследования инфильтрацию человеческих PBMC в легкие, печень и селезенку количественно оценивали с помощью проточной цитометрии с использованием маркеров hCD45, hCD4, hCD8, hCD20, hCD25 и FOXP3.

В условиях описанных выше процедур все гуманизированные антитела 2.8.6 hIgG1 P238D, 6.2_var_C hIgG1 P238D и 3E8_var_B hIgG1 P238D значительно снижали потерю массы по сравнению с изотипическим контролем hIgG1 P238D (Фиг. 19) и приводили к значительному снижению инфильтрации иммунных клеток человека в легкие, печень и селезенку. Наблюдалась также тенденция к повышению встречаемости регуляторных Т-клеток для всех трех агонистов BTLA.

Пример 28. Период полужизни *in vivo* мутированного P238D антитела hIgG1 у яванского макака и прогнозирование периода полужизни у человека

Период полужизни *in vivo* антитела 6.2_var_C на изотипе hIgG1 P238D оценивали у яванского макака. 2 самкам макак вводили в/в 3 мг/кг антитела и 2 самкам макак вводили 10 мг/кг антитела. У макак брали кровь до инъекции антитела и через 1 час, 6 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 168 часов, 240 часов, 336 часов, 432 часа и 504 часа после инъекции антитела. Концентрацию 6.2_var_C в сыворотке в каждый из этих моментов времени оценивали с помощью ИФА с иммобилизацией мишени. 96-луночный микропланшет (Thermoscientific № 439454) покрывали в течение ночи при 4 °C 100 мкл внеклеточного домена BTLA человека с концентрацией 1 мкг/мл в PBS. Затем планшет промывали 3 раза промывочным буфером (PBS с 0,05% Tween 20 (ThermoScientific кат. № 28320)) и лунки блокировали в течение 1 часа при комнатной температуре 300 мкл буфера SuperBlock (Thermoscientific кат. № 37515) с последующим повторным промыванием 3 раза промывочным буфером. Затем добавляли 100 мкл образцов сыворотки, разбавленных в буфере для ИФА (PBS, 1% бычьего сывороточного альбумина, 0,05% Tween 20) и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Построение 11-точечной калибровочной кривой для 6.2_var_C в известных концентрациях в буфере для ИФА

выполняли в двух повторах и в качестве пустых образцов использовали лунки, содержащие только буфер для ИФА, в двух повторах. После инкубации лунки 3 раза промывали промывочным буфером, затем добавляли конъюгированное с HRP детекторное антитело к человеческим антителам (Abcam кат. № ab98624), разбавленное 1 к 20 000 в буфере для ИФА и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Лунки снова промывали 3 раза промывочным буфером, затем добавляли 100 мкл раствора субстрата Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (ThermoScientific кат. № 34028) на лунку. Инкубировали в течение 90 секунд с покрытием фольгой, чтобы планшет не находился на прямом свете, затем добавляли по 50 мкл стоп-раствора (ThermoScientific кат. № SS04) на лунку. Поглощение при 450 нм считывали на сканере Thermo MultiSkan FC. Концентрации интерполировали по калибровочной кривой с использованием программного обеспечения GraphPad Prism.

Используя концентрации антител в сыворотке в каждый момент времени, фармакокинетику у каждой обезьяны аппроксимировали 2-компарментной моделью (Dirks et al. Clin. Pharmacokinet 49(10):633-659, 2010). Средний конечный период полувыведения у макак составил 5,4 дня (130 часов). Параметры модели (объемы распределения V1 и V2, клиренс Cl и коэффициент обмена между компарментами Q) масштабировали на человека, используя аллометрическое масштабирование. При аллометрическом масштабировании параметр₁ для видов с массой тела BW₁ оценивается согласно параметр₂ от других видов с массой тела BW₂ с помощью уравнения:

$$\text{параметр}_1 = \text{параметр}_2 \cdot \left(\frac{BW_1}{BW_2} \right)^\beta$$

где β – коэффициент масштабирования для данного параметра. Этот подход хорошо задокументирован, и было продемонстрировано, что он обеспечивает адекватное прогнозирование для человека по данным на видах, используемых в доклинических исследованиях (Dong et al Clin Pharmacokinet, 50(2):131-142, 2011) и (Wang et al. Biopharmaceutics & drug disposition, 31:253-263, 2010).

Предполагалось, что масса тела человека составляла 70 кг. У яванских макак использовали эталонную массу тела 3 кг. Применяли теоретические масштабирующие экспоненты для крупных молекул: $\beta = 1$ для V1 и V2, $\beta = 0,75$ для Cl (как описано в Kleiber et al. Hilgardia 6(11): 315–333. 1932) и $\beta = 2/3$ для Q. Для масштабирования коэффициента обмена между

компартаментами Q предполагается, что скорость обмена соединением зависит от площади поверхности сосудистого эндотелия. Это предположение было основано на реализации обмена между компартаментами, которую записывали следующим образом:

$$Q \cdot (c_p - c_t) = P \cdot S \cdot (c_p - c_t)$$

где $c_p - c_t$ представляет собой разность концентраций в сосудистой границе, P представляет собой коэффициент проницаемости сосудов в единицах (м/с), а S представляет собой площадь поверхности в единицах (м²) для сосудов, которые участвуют в обмене. Предполагается, что проницаемость сосудов P является свойством молекулы и что она не зависит от биологического вида. Единственным различием между видами является поверхность сосудов, которая масштабируется с коэффициентом $2/3$ от массы тела. На основе этих аргументов предполагаемый коэффициент масштабирования для Q составляет $2/3$.

Затем вычисляли прогнозируемый конечный период полувыведения у человека, исходя из масштабированных параметров с использованием 2-компарментной модели. Средний прогнозируемый период полувыведения у людей составил 12,5 дня (300 часов).

Некоторые варианты осуществления изобретения

1. Выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, причем указанное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом указанная тяжелая цепь содержит область Fc, которая содержит замену, которая приводит к повышению связывания с FcγR2B по сравнению с исходной молекулой, которая не содержит замены.
2. Антитело по варианту 1 осуществления, которое имеет избирательность связывания с FcγR2B относительно FcγR2A по сравнению с исходной молекулой, которая не содержит замены.
3. Антитело по варианту 1 или 2 осуществления, которое имеет:
 - (i) повышенную активность связывания с FcγR2B и сохраненную или сниженную активность связывания с FcγR2A (тип R) и/или FcγR2A (тип H) по сравнению с исходным полипептидом; и/или
 - (ii) величину [KD полипептидного варианта к FcγR2A (тип R)] / [KD полипептидного варианта к FcγR2B], которая составляет 2 или более, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более; и/или
 - (iii) величину [KD полипептидного варианта к FcγR2A (тип H)] / [KD полипептидного варианта к FcγR2B], которая составляет 2 или более, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более; и/или
 - (iv) повышенную активность связывания с FcγR2B и сохраненную или сниженную активность связывания с FcγR1A по сравнению с исходным полипептидом; и/или
 - (v) величину [KD полипептидного варианта к FcγR1A] / [KD полипептидного варианта к FcγR2B], которая составляет 2 или более, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более.
4. Антитело по любому из вариантов 1–3 осуществления, которое связывается с остатком BTLA человека, выбранным из:
 - (i) D52, P53, E55, E57, E83, Q86, E103, L106 и E92 (положение в соответствии с SEQ ID NO:225); или

- (ii) Y39, K41, R42, Q43, E45 и S47; или
- (iii) D35, T78, K81, S121 и L123; или
- (iv) H68; или
- (v) N65 и A64;

при этом каждое положение относится к аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO:225.

5. Антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, причем указанное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом указанная тяжелая цепь содержит область Fc, которая содержит одну или более из следующих аминокислот: аланин (A) в положении 234, аланин (A) в положении 235, аспарагиновую кислоту (D) в положении 236, аспарагиновую кислоту (D) в положении 237, аспарагиновую кислоту (D) в положении 238, аланин (A) в положении 265, глутаминовую кислоту (E) в положении 267, глицин (G) в положении 271, аргинин (R) в положении 330, аланин (A) в положении 332 или аланин (A) в положении 297 (нумерация в соответствии с индексом ЕС).

6. Антитело по варианту 5 осуществления, в котором указанная тяжелая цепь содержит область Fc, которая содержит аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс ЕС).

7. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, которое представляет собой агонистическое антитело.

8. Антитело по варианту 6 осуществления, которое связывается с FcγR2B с более высокой аффинностью относительно сопоставимого контрольного антитела, которое содержит область Fc, имеющую пролин в положении 238 (индекс ЕС).

9. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, которое связывается с FcγR2B с аффинностью от около 5 мкМ до 0,1 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

10. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, которое связывается с FcγR2B с аффинностью не более 5 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

11. Антитело по любому из вариантов 6–10 осуществления, которое связывается с Fc γ R2A (аллотип 131R) с более низкой или равной аффинностью относительно сопоставимого контрольного антитела, которое содержит область Fc, имеющую пролин в положении 238 (индекс EC).
12. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, которое связывается с Fc γ R2A (аллотип 131R) с KD по меньшей мере 20 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR).
13. Антитело по любому из вариантов 6–12 осуществления, которое связывается с Fc γ R2A (аллотип 131H) с более низкой или равной аффинностью относительно сопоставимого контрольного антитела, которое содержит область Fc, имеющую пролин в положении 238 (индекс EC).
14. Антитело по любому предшествующему варианту осуществления, которое связывается с Fc γ R2A (аллотип 131H) с KD по меньшей мере 50 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR).
15. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, которое проявляет повышенный агонизм к BTLA человека, экспрессируемому на поверхности иммунной клетки человека, что измерено с помощью анализа на агонист к BTLA, выбранного из анализа активации Т-клеток, такого как описанный в примере 24, реакции смешанной культуры лимфоцитов, такой как описанная в примере 25, или анализа активации В-клеток, такого как описанный в примере 26.
16. Выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, которое содержит тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит область Fc и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три определяющие комплементарность области (CDR): CDRH1, CDRH2 и CDRH3, а легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR: CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем (1) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 3 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 6 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или (2) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20,

SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или (3) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 32 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 35 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и при этом область Fc содержит аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс EC).

17. Выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем (1) тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, и область Fc, содержащую аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс EC), а легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%; или (2) тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, и область Fc, содержащую аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс EC), а легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%; или (3) тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, и область Fc, содержащую аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс EC), а легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

18. Выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем (1) тяжелая цепь содержит аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, или последовательность, которая идентична ей на по меньшей мере 90%, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%; (2) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28, или последовательность, которая идентична ей на по меньшей мере 90%, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%; или (3) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38, или последовательность, которая идентична ей на по меньшей мере 90%, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 44, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%; и при этом для каждого из 1) (2) и (3) тяжелая цепь содержит аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс EC).

19. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, которое представляет собой антитело IgG1, IgG2 или IgG4.

20. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, которое выбрано из группы, состоящей из человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела и мультиспецифического антитела (такого как биспецифическое антитело).

21. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, которое является моноклональным.

22. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, которое является агонистом BTLA человека, экспрессируемого на поверхности иммунной клетки, причем указанная иммунная клетка необязательно представляет собой Т-клетку.

23. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем связывание указанного антитела с BTLA человека, экспрессируемым на поверхности иммунной клетки, снижает пролиферацию указанной клетки по сравнению с сопоставимой иммунной клеткой, не связанной с указанным антителом, и при этом указанная клетка необязательно представляет собой Т-клетку.

24. Антитело по варианту 23 осуществления, причем указанное снижение пролиферации клеток составляет по меньшей мере около 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40% или 50%.
25. Антитело по варианту 23 осуществления, причем указанное снижение пролиферации клеток составляет от около 10% до 50%, от 10% до 40%, от 10% до 30%, от 10% до 20%, от 10% до 15%, от 20% до 50%, от 20% до 40% или от 20% до 30%.
26. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, которое содержит домен, который связывается с Fc-рецептором.
27. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, в котором указанный Fc-рецептор экспрессируется на поверхности иммунной клетки.
28. Антитело по варианту 27 осуществления, причем указанная иммунная клетка представляет собой антигенпрезентирующую клетку.
29. Антитело по варианту 28 осуществления, причем указанная антигенпрезентирующая клетка представляет собой дендритную клетку, макрофаг, моноцит или нейтрофил.
30. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, которое связывается с BTLA человека, экспрессируемым на поверхности Т-клетки.
31. Способ по любому из вариантов 26–30 осуществления, в котором указанный Fc-рецептор представляет собой FcγR2B.
32. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем связывание указанного антитела с BTLA человека, экспрессируемым на поверхности иммунной клетки, снижает сигнализацию NFκB в указанной иммунной клетке по сравнению с сопоставимой иммунной клеткой, не связанной с указанным антителом, и при этом указанная иммунная клетка необязательно представляет собой Т-клетку.
33. Антитело по варианту 32 осуществления, причем указанное снижение сигнализации NFκB указанной иммунной клетки измеряют с помощью анализа, описанного в примере 10.

33. Антитело по варианту 32 или 33 осуществления, причем указанное снижение сигнализации NFκB в указанной иммунной клетке составляет по меньшей мере около 10%, 15%, 20%, 25%, 30% или 40%.
34. Антитело по варианту 32 или 33 осуществления, причем указанное снижение сигнализации NFκB в указанной иммунной клетке составляет от около 10% до 40%, от 10% до 30%, от 10% до 20%, от 20% до 40% или от 20% до 30%.
35. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем связывание указанного антитела с BTLA человека, экспрессируемым на поверхности иммунной клетки, снижает дефосфорилирование цитоплазматического домена указанного BTLA человека.
36. Антитело по варианту 35 осуществления, причем указанное дефосфорилирование опосредовано CD45, экспрессируемым на поверхности указанной иммунной клетки.
37. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, которое специфически связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов человека (BTLA) с KD менее 10 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С, и при этом указанное антитело связывается с BTLA яванского макака с KD менее 20 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С; не ингибирует связывание BTLA с медиатором входа вируса герпеса (HVEM); и ингибирует пролиферацию Т-клеток *in vitro*, что определено в анализе реакции смешанной культуры лимфоцитов.
38. Антитело по варианту 37 осуществления, которое связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов (BTLA) человека со скоростью ассоциации по меньшей мере $5,0 \times 10^5$ (1/Мс) при 37 °С.
39. Антитело по варианту 37 или 38 осуществления, которое связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов (BTLA) человека со скоростью диссоциации менее $3,0 \times 10^{-4}$ (1/с) при 37 °С.

40. Антитело по любому из вариантов 37–39 осуществления, которое связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов (BTLA) человека со скоростью диссоциации от $3,0 \times 10^{-4}$ (1/с) до $1,0 \times 10^{-3}$ (1/с).
41. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, которое специфически связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов (BTLA) человека со скоростью ассоциации по меньшей мере $5,0 \times 10^5$ (1/Мс), что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С, причем указанное антитело не ингибирует связывание BTLA с медиатором входа вируса герпеса (HVEM); и при этом указанное антитело ингибирует пролиферацию Т-клеток *in vitro*, что определено в анализе реакции смешанной культуры лимфоцитов.
42. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, которое связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов (BTLA) человека с KD менее 10 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С.
43. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, которое связывается с BTLA яванского макака с KD менее 20 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С.
44. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, которое специфически связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов (BTLA) человека со скоростью диссоциации от $3,0 \times 10^{-4}$ (1/Мс) до $1,0 \times 10^{-3}$ (1/Мс), что измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С, причем указанное антитело не ингибирует связывание BTLA с медиатором входа вируса герпеса (HVEM); и при этом указанное антитело ингибирует пролиферацию Т-клеток *in vitro*, что определено в анализе реакции смешанной культуры лимфоцитов.
45. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, которое специфически связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов (BTLA) человека со скоростью диссоциации менее $1,0 \times 10^{-3}$ (1/Мс) и скоростью ассоциации по меньшей мере $5,0 \times 10^5$ (1/Мс), причем каждый из параметров измерен с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С, причем указанное антитело не ингибирует связывание BTLA с медиатором входа вируса герпеса (HVEM); и при этом указанное

антитело ингибирует пролиферацию Т-клеток *in vitro*, что определено в анализе реакции смешанной культуры лимфоцитов.

46. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, которое специфически связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов (ВТЛА) человека с КД менее 2 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С, причем указанное антитело ингибирует связывание ВТЛА с медиатором входа вируса герпеса (HVEM); и ингибирует пролиферацию Т-клеток *in vitro*, что определено в анализе реакции смешанной культуры лимфоцитов.

47. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, которое специфически связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов человека (ВТЛА), причем указанное антитело связывается с ВТЛА яванского макака с КД по меньшей мере 5 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С; и при этом указанное антитело ингибирует связывание ВТЛА с медиатором входа вируса герпеса (HVEM); и ингибирует пролиферацию Т-клеток *in vitro*, что определено в анализе реакции смешанной культуры лимфоцитов.

48. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, которое специфически связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов человека (ВТЛА), причем указанное антитело связывается с ВТЛА яванского макака с КД по меньшей мере 50 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С; и при этом указанное антитело не ингибирует связывание ВТЛА с медиатором входа вируса герпеса (HVEM); и ингибирует пролиферацию Т-клеток *in vitro*, что определено в анализе реакции смешанной культуры лимфоцитов.

49. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, которое имеет период полужизни *in vivo* в организме человека по меньшей мере 7 дней.

50. Нуклеиновая кислота, которая содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих полипептиды, способные образовывать антитело по любому из вариантов 1–49 осуществления.

51. Экспрессионный вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по варианту 50 осуществления.

52. Клетка-хозяин, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты варианта 50 или 51 осуществления.
53. Способ получения антитела (или связывающейся с BTLA молекулы), которое связывается с BTLA, включающий стадию культивирования клетки-хозяина по варианту 52 осуществления в условиях, подходящих для получения указанного антитела, необязательно дополнительно включающий выделение и/или очистку указанного антитела.
54. Способ получения человеческого антитела (или связывающейся с BTLA молекулы), которая специфически связывается с BTLA, включающий следующие стадии:
- (i) обеспечение клетки-хозяина, содержащей одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность тяжелой цепи и легкой цепи, которые при экспрессии способны комбинироваться с образованием антитела по любому из вариантов 1–49 осуществления;
 - (ii) культивирование клетки-хозяина, экспрессирующей закодированную аминокислотную последовательность; и
 - (iii) выделение антитела.
55. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество антитела по любому из вариантов 1–49 осуществления и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент.
56. Антитело по любому из вариантов 1–49 осуществления или фармацевтическая композиция по варианту 55 осуществления для применения в терапии.
57. Антитело по любому из вариантов 1–49 осуществления или фармацевтическая композиция по варианту 55 осуществления для применения в лечении или профилактике воспалительных или аутоиммунных заболеваний и расстройств, связанных с избыточной пролиферацией иммунных клеток.
58. Антитело для применения по варианту 56 осуществления, причем воспалительное или аутоиммунное заболевание выбрано из болезни Аддисона, аллергии, очаговой алопеции, бокового амиотрофического склероза, анкилозирующего спондилита,

антифосфолипидного синдрома, астмы (включая аллергическую астму), аутоиммунной гемолитической анемии, аутоиммунного гепатита, аутоиммунного панкреатита, аутоиммунного полиэндокринного синдрома, болезни Бехчета, буллезного пемфигоида, церебральной малярии, хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии, целиакии, болезни Крона, синдрома Кушинга, дерматомиозита, сахарного диабета 1 типа, эозинофильного гранулематоза с полиангиитом, реакции «трансплантат против хозяина», болезни Грейвса, синдрома Гийена — Барре, тиреоидита Хашимото, гнойного гидраденита, воспалительного фиброза (например, склеродермии, фиброза легких и цирроза), ювенильного артрита, болезни Кавасаки, лейкоза, лимфомы, лимфопролиферативных расстройств, рассеянного склероза, миастении гравис, миеломы, нейромиелита зрительного нерва, пузырчатки, полимиозита, первичного билиарного холангита, первичного склерозирующего холангита, псориаза, псориатического артрита, ревматоидного артрита, саркоидоза, синдрома Шегрена, системной красной волчанки, артерита Такаясу, височного артерита, отторжения трансплантата, поперечного миелита, язвенного колита, увеита, васкулита, витилиго и болезни Фогта — Коянаги — Харада.

59. Антитело для применения по варианту 57 осуществления, причем расстройство, связанное с избыточной пролиферацией иммунных клеток, выбрано из лимфомы, лейкоза, системного мастоцитоза, миеломы или лимфопролиферативного расстройства.

60. Выделенное антитело, которое специфически связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов (BTLA), содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR: CDRH1, CDRH2 и CDRH3, при этом (i) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 3 соответственно, и при этом легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR: CDRL1, CDRL2 и CDRL3, при этом CDRL1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, CDRL2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и CDRL3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6; и при этом указанная тяжелая цепь содержит аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс ЕС).

61. Выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит вариабельную область

тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, и при этом тяжелая цепь содержит аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс EC).

62. Выделенное антитело по варианту 61 осуществления, в котором легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

63. Выделенное антитело по любому из вариантов 60–62 осуществления, в котором тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16.

64. Выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR: CDRH1, CDRH2 и CDRH3, при этом CDRH1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, CDRH2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, и CDRH3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, и легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR: CDRL1, CDRL2 и CDRL3, при этом CDRL1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, CDRL2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, и CDRL3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25; и при этом указанная тяжелая цепь содержит аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс EC).

65. Выделенное антитело по варианту 64 осуществления, в котором тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29.

66. Выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR: CDRH1, CDRH2 и CDRH3, при этом

CDRH1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, CDRH2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31, и CDRH3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, и легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR: CDRL1, CDRL2 и CDRL3, при этом CDRL1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33, CDRL2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 34, и CDRL3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 35; и при этом указанная тяжелая цепь содержит аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс EC).

67. Выделенное антитело по варианту 66 осуществления, в котором тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39.

68. Антитело по любому из вариантов 60–67 или 82–84 осуществления, которое представляет собой антитело IgG1, IgG2 или IgG4.

69. Антитело по любому из вариантов 60–68 или 82–84 осуществления, которое выбрано из группы, состоящей из человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела и мультиспецифического антитела (такого как биспецифическое антитело).

70. Антитело по любому из вариантов 60–69 или 82–84 осуществления, которое представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, выбранный из группы, состоящей из scFv, sc(Fv)₂, dsFv, Fab, Fab', (Fab')₂ и диатела.

71. Антитело по любому из вариантов 60–70 или 82–84 осуществления, которое является моноклональным.

72. Антитело по любому из вариантов 60–71 или 82–84 осуществления, которое является агонистом BTLA человека, экспрессируемого на поверхности иммунной клетки, причем указанная иммунная клетка необязательно представляет собой Т-клетку.

73. Антитело по любому из вариантов 60–72 или 82–84 осуществления, причем связывание указанного антитела с BTLA человека, экспрессируемым на поверхности

иммунной клетки, снижает пролиферацию указанной клетки по сравнению с сопоставимой иммунной клеткой, не связанной с указанным антителом, и при этом указанная клетка необязательно представляет собой Т-клетку.

74. Выделенная нуклеиновая кислота, которая содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих полипептиды, способные образовывать антитело по любому из вариантов 60–73 или 82–84 осуществления.

75. Клетка-хозяин, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты по варианту 74 осуществления.

76. Способ получения антитела, которое связывается с BTLA, включающий стадию культивирования клетки-хозяина по варианту 75 осуществления в условиях, подходящих для получения указанного антитела, необязательно дополнительно включающий выделение и/или очистку указанного антитела.

77. Способ получения человеческого антитела, которое специфически связывается с BTLA, включающий следующие стадии:

- i) обеспечение клетки-хозяина, содержащей одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность тяжелой цепи и легкой цепи, которые при экспрессии способны комбинироваться с образованием антитела по любому из вариантов 60–73 или 82–84 осуществления;
- ii) культивирование клетки-хозяина, экспрессирующей закодированную аминокислотную последовательность; и
- iii) выделение антитела.

78. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество антитела по любому из вариантов 60–73 или 82–84 осуществления и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент.

79. Антитело по любому из вариантов 60–73 или 82–84 осуществления или фармацевтическая композиция по варианту 78 осуществления для применения в терапии.

80. Антитело по любому из вариантов 60–73 или 82–84 осуществления или фармацевтическая композиция по вариантом 78 осуществления для применения в лечении

или профилактике воспалительных или аутоиммунных заболеваний и расстройств, связанных с избыточной пролиферацией иммунных клеток.

81. Антитело для применения по п. 80, причем воспалительное или аутоиммунное заболевание выбрано из болезни Аддисона, аллергии, очаговой алопеции, бокового амиотрофического склероза, анкилозирующего спондилита, антифосфолипидного синдрома, астмы (включая аллергическую астму), аутоиммунной гемолитической анемии, аутоиммунного гепатита, аутоиммунного панкреатита, аутоиммунного полиэндокринного синдрома, болезни Бехчета, буллезного пемфигоида, церебральной малярии, хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии, целиакии, болезни Крона, синдрома Кушинга, дерматомиозита, сахарного диабета 1 типа, эозинофильного грануломатоза с полиангиитом, реакции «трансплантат против хозяина», болезни Грейвса, синдрома Гийена — Барре, тиреоидита Хашимото, гнойного гидраденита, воспалительного фиброза (например, склеродермии, фиброза легких и цирроза), ювенильного артрита, болезни Кавасаки, лейкоза, лимфомы, лимфопролиферативных расстройств, рассеянного склероза, миастении гравис, миеломы, нейромиелита зрительного нерва, пузырьчатки, полимиозита, первичного билиарного холангита, первичного склерозирующего холангита, псориаза, псориатического артрита, ревматоидного артрита, саркоидоза, синдрома Шегрена, системной красной волчанки, артерита Такаясу, височного артерита, отторжения трансплантата, поперечного миелита, язвенного колита, увеита, васкулита, витилиго и болезни Фогта — Коянаги — Харада.

82. Выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем (1) тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательность, которая идентична ей на по меньшей мере 90%, и легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

83. Выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем (1) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, или последовательность, которая идентична ей на по меньшей мере 90%, и легкая цепь содержит аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

84. Выделенное человеческое антитело, которое специфически связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов (BTLA), содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем

(а) тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR: CDRH1, CDRH2 и CDRH3, причем CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 3 соответственно, и при этом легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR: CDRL1, CDRL2 и CDRL3, при этом CDRL1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, CDRL2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и CDRL3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6; и/или

(b) тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18; или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%; и/или

(с) легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%;

при этом необязательно антитело представляет собой антитело IgG1, IgG2 или IgG4.

Последовательности:

Таблица 7. Примеры последовательностей CDR

SEQ ID NO	Аминокислотные последовательности	SEQ ID NO	Аминокислотные последовательности
45	SYGIS	136	WQGFHFPQT
46	EIYPRSGNTYYNEKFKG	139	TYYGSSQYYFDY
47	NYGSSYPFAY	143	DYYIN
33	SASSSVSSSYLH	144	RIYPGSGNTYYNEKFKG
34	RTSNLAS	145	GYGNSDY
35	QQWSGYPFT	146	RASQSIGTRIH

SEQ ID NO	Аминокислотные последовательности	SEQ ID NO	Аминокислотные последовательности
53	DYYMN	147	YASESIS
54	DINPNNGGTSYNQKFKG	148	QQSNSWPYT
55	WRQLRSDY	30	SYAIR
56	LASQTIGTWLA	48	EIYPRSGNTYYNENFKG
57	AATSLAD	32	SGGASYTMDY
58	QQLYSTPLT	151	SYGLI
61	SYWMH	152	EIYPRSGSTYYNEWFKG
62	MIHPNNGIPNYNEKFKS	153	RRGTGDGFDY
63	EGYYGSEGYFDV	154	SASQGISNYLN
64	SASSSISYIH	155	YTSSLHS
65	DTSKLAS	156	QQYIELPFT
66	HQRSTYPYT	159	DYYMH
69	MIHPNSGSTNYNEKFKS	160	YIYPNNGGNGYNQKFKG
70	KRGGLGDY	161	GDYYGSLRLTFAY
71	RASKSVSTSGYSYMH	4	KSSQSLLYSSNQKNYLA
72	LASNLES	12	WASTRES
73	QHSRELPYT	164	QQYYSYPLT
76	SSWMN	167	TYGVS
77	RIYPGDGDNTYNGKFKG	168	WINTYSGVPTYADDFKG
78	RGYGYLAY	169	VTILHWYFDV
79	KASQDVSTAVA	170	RASQEISGYLS
80	SASYRYT	171	AASTLDS
81	QQHYSTPYT	172	LQYASYPFT
84	GYGSSYGFAY	177	RRGAGDGFDY
85	QQWSGYPWT	178	QQYSKLPFT
88	SGYYWN	181	DHTIH
89	YISYDGSNNYNPSLKN	182	YIYPRDGSTKYNEKFKG
90	IYGNYYAMDY	183	SNWNFDY
91	SASSSVSYMH	184	KASQDVGTAVA
92	QQWSSNPPT	185	WASTRRT
95	DYYMI	186	QQYSSYPLT
96	NINPNNGGTTYNQKFKG	189	QQHYSTPWT
97	GGLRPLYFDY	191	EIYPRSGTYYNEKFKG
98	KASENVDITYVS	192	RISSGSGVDY
99	GASNRYT	193	QQYSELPWT
100	GQSYSYPLT	196	SGYDWH
103	NTYMH	197	YISYSGSTNYNPSLKS
104	RIDPANGNTKYDPKFQG	198	GTPVVAEDYFDY
105	TYYGSSQHYFDY	199	RSSTGAVTTSNYAN
106	KSSQSLLDSDGKTYLN	200	ATNNRAP
107	LVS KLDS	201	ALWYSNHLV
108	WQDTHFPQT	20	TYGVH
111	RIYPGDGDANYNGKFKG	21	VMWPGGRTSYNPSLKS

SEQ ID NO	Аминокислотные последовательности	SEQ ID NO	Аминокислотные последовательности
112	EGHYYGSGYRWYLDV	22	GDYEYDYYAMDY
113	RASENIYSNLA	23	RASSSVSYM
114	AATNLAD	24	ATSNRAT
115	QHFRGAPFT	25	HQWSSNPYT
118	DYEIH	204	SAYWN
119	PIDPDTGNTAYNQNLKG	205	YISYSGSTYFNPSLKS
120	GGYDSDWGFAY	206	SHYYGYFDY
121	RSSKSLLSNGNTFLF	207	RASETIDSYGDSLMLH
163	VMWPGGRTSYNPAPMS	208	RASNLES
176	ATSNLAS	209	QQTDEDPYT
122	RMSDLAS	1	SYGMS
123	MQHLEYPFT	2	SIRSDGNTYYPDSVKG
126	DYYLN	3	GGYYGSSPY
127	LIDPYNGGSSCNQKFKG	5	WASTRDS
128	GNAMDY	6	QQYNYLT
129	WASTRHT	212	SGYSWH
130	QQHYIIPYM	213	YIHYSGSTNYNPSLKS
133	NTYMY	214	GPHRYDGVWFAY
134	RIDPANGNTKYAPKFQG	215	SASSISSNYLH
135	LYYGSSYDYFDY	216	QQGTNIPLT
31	EIYPRSGNTYYAQKFQG	40	EIYPRSGQTYAQSFG
11	SIRSEGQTYYPDSVKG	17	SIRSDGQTYYPDSVKG

Таблица 8. Примеры последовательностей VH и VL

SEQ ID NO	Аминокислотные последовательности
51	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSYGISWVKQRTGQGLEWIGEI YPRSGNTYYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCARNYGS SYPFAYWGQGTTLTVSA
59	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYMNWVKQSHGKSLEWIGDI NPNNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARWRQ LRSDYWGQGTTLTVSS
67	QVQLQQPGAELVKPRASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPQGQGLEWIG MIHPNNGIPNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYHCAREG YYGSEGYFDVWGTGTTTVSS
74	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPQGQGLEWIG MIHPNSGSTNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARKR GGLGDYWGQGTSTTVSS
82	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKQRPKGQGLEWIGRI YPGDGDTNYNGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARRGY GYLAYWGQGTTLTVSA

SEQ ID NO	Аминокислотные последовательности
86	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSYGISWVKQRTGQGLEWIGEI YPRSGNTYYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCARGYGS SYGFAYWGQGTTLTVSA
93	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGNKLEWMGY ISYDGSNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYYCASIYGNYY AMDYWGQGTSTVTVSS
101	EVQLQQSGPELVQPGASVKISCKASGYTFTDYMIWVKQSHGKSLEWIGNI NPNNGGTTYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMGLPSLTSEDSAVYYCARGGL RPLYFDYWGQGTTLTVSS
109	EVQLQQSVAELVRPGASVKLSCTASGFNIKNTYMHWVKQRPEQGLEWIGRI DPANGNTKYDPKFQKGKATITADTSSNTAYVQLSSLTSEDTAIYYCALTYYGS SQHYFDYWGQGTTLTVSS
116	QIQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKKRPGKGLEWIGRI YPGDGDANYNGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAGEGH YYGSGYRWYLDVWGTGTTVTVSS
124	QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCASGYTFTDYEIHVKQTLVHGLEWIGPI DPDTGNTAYNQNLKGKAILTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTRGGYD SDWGFAYWGQGTTLTVSA
131	EVQLQQSGPVLVPGASVKMSCKASGYTFTDYILNWVKQSHGKSLEWIGL IDPYNGGSSCNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMDLNSLTSEDSAVYYCARGNA MDYWGQGTSTVTVSS
137	EVQLQQSVAELVRPGASVKLSCTASGFNIKNTYMYWVKQRPEQGLEWIGRI DPANGNTKYAPKFQKGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAIYYCALLYYGS SYDYFDYWGQGTTLTVSS
141	EVQLQQSVAELVRPGASVKLSCTASGFNIKNTYMHWVKQRPEQGLEWIGRI DPANGNTKYAPKFQKGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAIYYCALTYYGS SQYYFDYWGQGTTLTVSS
149	QVQLKQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTDYINWVKQRPGQGLEWIARI YPGSGNTYYNEKFKGKATLTAEKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGYGN SDYWGQGTTLTVSS
223	QVQLQQSGAELARPGASVRLSCKASGYTFTSYAIRWVKQRTGQGLEWIGEI YPRSGNTYYNENFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCARSGGA SYTMDYWGQGTSTVTVSS
157	QVQLQQSGAELARPGASVRLSCKASGYTFTSYGLIWVKQRTGQGLEWIGEI YPRSGSTYYNEWFKGKATLTADKSSNTAFMELRSLTSEDSAVYFCARRRGT GDGFDYWGQGTILTVSS
165	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYMHWVKQSHGKSLEWIG YIYPNNGGNGYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAIGD YYGSLRLTFAYWGQGTTLTVSA
173	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTTYGVSWVKQAPGKVLKWMGW INTYSGVPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQISNLKNEDTATYFCAPVTIL HWYFDVWGTGTTVTVSS
175	QVQLQQSGAELARPGASVRLSCKASGYTFTSYGISWVKQRTGQGLEWIGEI YPRSGNTYYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCARNYGS SYPFAYWGQGTTLTVSA

SEQ ID NO	Аминокислотные последовательности
179	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSYGISWVKQRTGQGLEWIGEI YPRSGNTYYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCARRRGA GDGFDYWGGQTTLTVSS
187	QDQLQQSDAELVKPGASVKISCKVSGYTFTDHTIHWMKQRPEQGLEWIGYI YPRDGSTKYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCASSNWN FDYWGGQTTLTVSS
194	QVQLQQSGAELARPGASVKLPCKASGYTFTSYGISWVKQRTGQGLEWIGEI YPRSGTTYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCARRISSG SGVDYWGGQTTLTVSS
202	DVQLQESGPGMVKPSQSLTCTVTGYSITSGYDWHWIRHFPGNKLEWMG YISYSGSTNYPNPSLKSRIITHDTSKNHFFLKLNSVTTEDTATYYCARGTPVV AEDYFDYWGGQTTLTVSS
219	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSYGMSWVRQIPEKRLEWVASI RSDGNTYYPDSVKGRFIISRDNARNILYLQMSSLRSEDAMYYCTRGGYYG SSPYWGGQTTLTVSS
217	DVQLQESGPDLVKPSQSLSVTCTVTGYSITSGYSWHWIRQFPGNKLEWMGY IHYSGSTNYPNPSLKSRIITRDTSKNQFFLQLSSVTTEDTATYYCASGPHRYD GVWFAYWGGQTLTVTVSS
52	ENVLTQSPAIMAASLGQKVTMTCSASSSVSSSYLHWYQQKSGASPKPLIHRT SNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSVEAEDDATYYCQQWSGYPFTFGGGTK LEIK
60	DIQMTQSPASQSASLGESVTITCLASQTIGTWLAWYQQKPGKSPQLLIYAAT SLADGVPSRFSGSGSGTKFSFKISSLQAEDFVSYCQQLYSTPLTFGAGTKLE LK
68	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSISYIHWYQQKPGTSPKRWIYDTSKL ASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQRSTYPYTFGGGKLEI K
75	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHYQQKPGQPPKLLI YLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPYTFGG GTKLEIK
83	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSA SYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSTPYTFGGGK LEIK
87	ENVLTQSPAIMAASLGQKVTMTCSASSSVSSSYLHWYQQKSGASPKPLIHRT SNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSVEAEDDATYYCQQWSGYPWTFGGGT KLEIK
94	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSGTSPKRWIYDTS KLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPPTFGSGTKL EIK
102	NIVMTQSPKSMMSVGERVTLSCKASENVDITYVSWYQQKPEQSPKLLIYGA SNRYTGVPDRFTGSGSATDFTLTISSVQAEDLADYHCGQSYSYPLTFGAGTK LELI
110	DVVMQTQPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNLWLLQRPGQSPKRLI YLVSKLD SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQDTHFPQTFG GGTKLEIK

SEQ ID NO	Аминокислотные последовательности
117	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSNLAWYQQKQKSPQLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGSYYCQHFRGAPFTFGSGTKLEIK
125	DIVMTQATPSVPVTPGESVSISCRSSKSLLHSNGNTFLFWFLQRPQGQSPQLLIYRMSDLASGVDPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGIYYCMQHLEYPFTFGSGTKLEIK
132	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQEKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDYILNISSVQAEDLALYYCQQHYIIPYMFGGGTLKLEIK
138	DVVMQTQPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNLWLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPQTFGGTKLEIK
142	DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQSIGTRIHWWYQQRNGSPRLLIKYASEISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQSNSWPYTFGGGTLKLEIK
150	ENVLTQSPAIMAASLGQKVTMTCSASSSVSSSYLHWYQQKSGASPKPLIHRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSVEAEDDATYYCQQWSGYPTFGSGTKLEIK
158	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQYIELPFTFGSGTKLEIK
166	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYYSYPLTFGAGTKLELK
174	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQEISGYLSWLQKPDGTIKRLIYAASLDSGVPKRFRGSRSGSDYSLTISSLESEDFADYYCLQYASYPFTFGSGTKLEIK
180	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQYSKLPFTFGSGTKLEIK
188	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRRTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYPLTFGAGTKLELK
190	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSA SYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSTPWTFGGGTLKLEIK
195	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQYSELPWTFGGGTLKLEIK
203	QAVVTQESALSTSPGETVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGATNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHLVFGGGTKLTVLG
220	DIVMSQSPSSLPVSVGEKISMTCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRDSGVDPDRFIGSGSGTDFTLTINSVKAEDLAVYYCQQYYNYLTFGAGTKLELK
218	EIVLTQSPTTMAASPGEKITITCSASSSISSNYLHWYQQKPGFSPKLLIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTIGTMEAEADVATYYCQQGTNIPLTFGAGTKLEIK

SEQ ID NO	Аминокислотные последовательности
36	QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCASGYTFTSYAIRWVRQATGQGLEWMGEIYPRSGNTYYAQKFQGRATLTADKSISTAYMELSSLRSEDNAVYFCARSGGASYTMDYWGQGTTVTVSS
37	ENVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSSSYLHWYQQKPGQSPRPLIHRTSNLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSGYPFTFGSGTKLEIK
7	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTLSSYGMSWVRQAPGKGLEWVASIRSDGNTYYPDsvkGRFTISRDNakNSLYLQMSSLRAEDNAVYYCTRGGYYGSSPYWYGQGTTVTVSS
8	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPQLLIYWASTRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQYYNYLTFGGGTKVEIK
13	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTLSSYGMSWVRQAPGKGLEWVASIRSEGQTYYPDsvkGRFTISRDNakNTLYLQMSSLRAEDNAVYYCTRGGYYGSSPYWYGQGTTVTVSS
14	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQYYNYLTFGGGTKVEIK
18	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTLSSYGMSWVRQAPGKGLEWVASIRSDGQTYYPDsvkGRFTISRDNakNTLYLQMSSLRAEDNAVYYCTRGGYYGSSPYWYGQGTTVTVSS
26	QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTVSGFSLTTYGVHWIRQPPGKALEWLGVMWPGGRTSYNPSLKSRLTITKDNSKSQVVLMTNMDPVDTATYYCVRGDYEDYYAMDYWGQGTLTVSS
27	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMHYQQKPGQAPRPLIYATSNRATGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCHQWSSNPYTFGQGTKLEIK
41	QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCASGYTFTSYAIRWVRQATGQGLEWMGEIYPRSGQTYAQSFQGRATLTADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYFCARSGGASYTMDYWGQGTTVTVSS
43	ENVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSSSYLHWYQQKPDQSPRPLIHRTSNLASGIPSRFSGSGSGTDYTLTISSLEAEDFAVYYCQQWSGYPFTFGSGTKLEIK
210	EVQLQESGPSLVKPSQTLSTCSVTGDSITSAYWNWIRKFPGNKLEYMGYISYSGSTYFNPSLKSRLISITRNTSKNQYYLQLNSVTTEDTATYYCARSHYYGYFDYWGHTTLTVSS
211	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASETIDSYGDSLHWYQQKAGQPPKLLIYRASNLGIPARFSGSGSRDFTLTINPVEADDVATYYCQQTDEDPTYTFGGGTKLEIK
221	QVQLKESGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSLTTYGVHWVRQSPGKGLEWLGVMWPGGRTSYNPAPMSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDETAMYYCVRGDYEDYYAMDYWGQGTSTVTVSS
222	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMHYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSSYSLTISRMEAEDAATYYCHQWSSNPYTFGGGTKLEIK

Таблица 9. Примеры последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи

SEQ ID NO	Аминокислотные последовательности
9	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTLSSYGMSWVRQAPGKGLEWVASI RSDGNTYYPDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMSSLRAEDTAVYYCTRGGYY GSSPYWVGQGTITVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
10	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPQL LIYWASTRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQYYNYLTF GGGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFN RGEC
15	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTLSSYGMSWVRQAPGKGLEWVASI RSEGQTYYPDSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCTRGGYYG SSPYWVGQGTITVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
16	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKL LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQYYNYLTFG GGGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFN RGEC
19	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTLSSYGMSWVRQAPGKGLEWVASI RSDGQTYYPDSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCTRGGYY GSSPYWVGQGTITVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK

SEQ ID NO	Аминокислотные последовательности
	VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
28	QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTVSGFSLTTYGVHWIRQPPGKALEWLGVM WPGGRTSYNPSLKSRLTITKDNSKSQVVLMTNMDPVDATYYCVRGDYE YDYYAMDYWG QGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
29	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMHWYQQKPGQAPRPLIYATSN RATGIPARFSGSGSGTDYTLTISLEPEDFAVYYCHQWSSNPYTFGQGTKLEI K RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
38	QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAIRWVRQATGQGLEWMGE IYPRSGNTYYAQKFQGRATLTADKSISTAYMELSSLRSEDATVYFCARSGGA SYTMDYWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
39	ENVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSSSYLHWYQQKPGQSPRPLIHRTS NLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISLEPEDFAVYYCQQWSGYPFTFGSGTKLE IK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
42	QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAIRWVRQATGQGLEWMGE IYPRSGQTYAQSFGGRATLTADKSTSTAYMELSSLRSEDATVYFCARSGGA SYTMDYWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS

SEQ ID NO	Аминокислотные последовательности
	DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
44	ENVLTQSPATLSLISGERATLSCASASSVSSSYLHWYQQKPDQSPRLIHRTSNLASGIPSRFSGSGSGTDYTLTISSLEAEDFAVYYCQQWSGYPFTFGSGTKLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 225 полипептид BTLA человека (*Homo sapiens*). Позиции 1–30 представляют собой сигнальную последовательность, 31–151 представляют собой внеклеточную область, 152–178 представляют собой трансмембранную область, а от 179 до конца представляют собой внутриклеточную область

MKTLPAMLGTGKLFWVFFLIPYLDIWNHIGKESCDVQLYIKRQSEHSILAGDPFELEC
PVKYCANRPHVTWCKLNGTTCVKLEDRQTSWKEEKNISFFILHFEPVLPNDNGSYRC
SANFQSNLIESHSTTLVYTDVKSASERPSKDEMASRPWLLYRLLPLGGLPLLITTCFCL
FCCLRRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPD
LCFRMQEGS EVYSNPCLEENKPGIVYASLNHNSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS

SEQ ID NO: 226 полипептид BTLA яванского макака (*Macaca fascicularis*).
MKTLPAMLGSGRFLWVFLIPYLDIWNHIGKESCDVQLYIKRQSYHSIFAGDPFKLECPV
KYCAHRPQVTWCKLNGTTCVKLEGRHTSWKQEKNSFFILHFEPVLPDNGSYRCSANF
LSAIIESHSTTLVYTDVKSASERPSKDEMASRPWLLYSLPLGGLPLLITTCFCLFCFLRR
HQGKQNELSDTTGREITLVDPFKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNEPDFCFRMOEGS
EVYSNPCLEENKPGIYASLNHNSIIGLNSRQARNVKEAPTEYASICVRS

SEQ ID NO: 227 конст. область hIgG1 с 238D
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
DSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 228 конст. область h-каппа-цепи

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 229 слитый белок hHVEM-mFc (включая сигнальный пептид и C-
концевую His-метку)

MEPPGDWGPPPWRSTPRTDVLRLVLYLTFLGAPCYAPALPSCKEDEYPVGSECCPKCSP
GYRVKEACGELTGTVCEPCPPGTIAHLNGLSKCLQCQMCDPAMGLRASRNCSRTEA
VCGCSPGHFCIVQDGDHCAACRAYATSSPGQRVQKGGTESQDTLCQNCPPGTFSPNGTL
EECQHQTCSWLVTAGAGTSSSHLVPRGSGSKPSISTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTP
KVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNG
KEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDI
TVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHN
HHTKSLSHSPGKHHHHHH

SEQ ID NO: 230 тяжелая цепь изотипического контроля Морс21 hIgG1 P238D

DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPEKGLEWVAYISSGSSTLH
YADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCARWGNYPYYAMDYWGQGTSV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 231 легкая цепь изотипического контроля Морс21 hIgG1 P238D

NIVMTQSPKSMMSVGERVTLTCKASENVVTYVSWYQQKPEQSPKLLIYGASNRYTGV
PDRFTGSGSATDFTLTISSVQAEDLADYHCGQGYSYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 232

GGGGS

SEQ ID NO: 233

KESGSVSSEQLAQFRSLD

SEQ ID NO: 234

EGKSSGSGSESKST

SEQ ID NO: 235 – Эталонная константная последовательность IgG4, содержащая P238D, а также замену S228P.

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGDSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW
QEG NVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLGLGK

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело, которое специфически связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов (ВТЛА) человека, причем указанное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом указанная тяжелая цепь содержит область Fc, которая содержит замену, которая приводит к повышению связывания с FcγR2B по сравнению с исходной молекулой, которая не содержит замены.
2. Антитело по п. 1, в котором указанная тяжелая цепь содержит область Fc, которая содержит одну или более из следующих аминокислот: аланин (A) в положении 234, аланин (A) в положении 235, аспарагиновую кислоту (D) в положении 236, аспарагиновую кислоту (D) в положении 237, аспарагиновую кислоту (D) в положении 238, аланин (A) в положении 265, глутаминовую кислоту (E) в положении 267, глицин (G) в положении 271, аргинин (R) в положении 330, аланин (A) в положении 332 или аланин (A) в положении 297 (нумерация в соответствии с индексом EC).
3. Антитело по п. 1, в котором указанная тяжелая цепь содержит область Fc, которая содержит аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс EC).
4. Антитело по п. 3, в котором (i) указанная область Fc связывается с FcγR2B с более высокой аффинностью относительно сопоставимого контрольного антитела, которое содержит область Fc с пролином в положении 238 (индекс EC); или (ii) указанное антитело связывается с FcγR2B с аффинностью от около 5 мкМ до 0,1 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR); или (iii) указанная область Fc связывается с FcγR2A (аллотип 131R) с более низкой или равной аффинностью относительно сопоставимого контрольного антитела, которое содержит область Fc с пролином в положении 238 (индекс EC); или (iv) указанное антитело связывается с FcγR2A (аллотип 131R) с константой диссоциации (KD) по меньшей мере 20 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR); или (v) указанное антитело связывается с FcγR2A (аллотип 131H) с более низкой или равной аффинностью относительно сопоставимого контрольного антитела, которое содержит область Fc, содержащую пролин в положении 238 (индекс EC); или (vi) указанное антитело связывается с FcγR2A (аллотип 131H) с KD по меньшей мере 50 мкМ, что определено с

помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR); или (vii) причем указанное антитело демонстрирует период полужизни *in vivo* по меньшей мере 10 дней.

5. Антитело по любому из пп. 1–4, которое связывается с эпитопом BTLA человека, выбранным из группы, состоящей из:

- (i) D52, P53, E55, E57, E83, Q86, E103, L106 и E92; или
- (ii) Y39, K41, R42, Q43, E45 и S47; или
- (iii) D35, T78, K81, S121 и L123; или
- (iv) H68; или
- (v) N65 и A64;

причем каждое положение относится к аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO:225.

6. Антитело по любому из пп. 1–5, которое проявляет повышенный агонизм к BTLA человека, экспрессируемому на поверхности иммунной клетки человека, что измерено с помощью анализа на агонист к BTLA, выбранного из анализа активации Т-клеток или анализа активации В-клеток.

7. Антитело по любому из пп. 1–6, в котором тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую три определяющие комплементарность области (CDR): CDRH1, CDRH2 и CDRH3, а легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, содержащую три CDR: CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем

(i) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 17 и 3 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, 12 и 6 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(ii) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, 21 и 22 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO: 23, 24 и 25 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(iii) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, 31 и 32 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33, 34 и 35 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(iv) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45, 46 и 47 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33, 34 и 35 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(v) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 53, 54 и 55 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 56, 57 и 58 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(vi) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 61, 62 и 63 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, 65 и 66 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(vii) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 61, 69 и 70 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 71, 72 и 73 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(viii) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 76, 77 и 78 соответственно, с 0–3 аминокислотными

модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 79, 80 и 81 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(ix) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45, 46 и 84 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33, 34 и 85 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(x) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 88, 89 и 90 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 91, 65 и 92 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(xi) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 95, 96 и 97 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 98, 99 и 100 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(xii) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 103, 104 и 105 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 106, 107 и 108 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(xiii) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 76, 111 и 112 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 113, 114 и 115 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(xiv) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 118, 119 и 120 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 121, 122 и 123 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(xv) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 126, 127 и 128 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 79, 129 и 130 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(xvi) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 133, 134 и 135 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 106, 107 и 136 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(xvii) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 103, 134 и 139 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 106, 107 и 136 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(xviii) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 143, 144 и 145 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 146, 147 и 148 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(xix) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 151, 152 и 153 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 154, 155 и 156 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(xx) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 159, 160 и 161 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, 12 и 164 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(xx1) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 167, 168 и 169 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 170, 171 и 172 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(xxii) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45, 46 и 47 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 170, 171 и 172 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(xxiii) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45, 46 и 177 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 154, 155 и 178 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(xxiv) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 181, 182 и 183 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 184, 185 и 186 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(xxv) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 76, 77 и 78 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 79, 80 и 189 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(xxvi) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45, 191 и 192 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 154, 155 и 193 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(xxvii) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 196, 197 и 198 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 199, 200 и 201 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(xxviii) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 204, 205 и 206 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 207, 208 и 209 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(xxix) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 212, 213 и 214 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 215, 34 и 216 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(xxx) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 2 и 3 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(xxxi) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, 163 и 22 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, 176 и 25 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(xxxii) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, 48 и 32 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33, 34 и 35 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(xxxiii) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 11 и 3 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, 12 и 6 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(xxxiv) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 11 и 3 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(xxxv) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 17 и 3 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, 12 и 6 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(xxxvi) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, 21 и 22 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, 24 и 25 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(xxxvii) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, 31 и 32 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33, 34 и 35 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями; или

(xxxviii) CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, 40 и 32 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33, 34 и 35 соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями;

при этом необязательно область Fc содержит аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс EC).

8. Выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем (1) тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, и область Fc, содержащую аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс EC), а легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%; или (2) тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, и область Fc, содержащую аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс EC), а легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%; или (3) тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, и область Fc, содержащую аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс EC), а легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

9. Выделенное антитело, которое специфически связывается с BTLA, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем (1) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, или последовательность, которая

идентична ей на по меньшей мере 90%, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%; (2) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28, или последовательность, которая идентична ей на по меньшей мере 90%, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%; или (3) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38, или последовательность, которая идентична ей на по меньшей мере 90%, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 44, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%; при этом тяжелая цепь содержит область Fc, содержащую аспарагиновую кислоту в положении 238 (индекс EC).

10. Антитело по любому из предшествующих пунктов, которое представляет собой антитело IgG1, IgG2 или IgG4.

11. Антитело по любому из предшествующих пунктов, которое выбрано из группы, состоящей из: человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела и мультиспецифического антитела (такого как биспецифическое антитело).

12. Антитело по любому из предшествующих пунктов, которое является моноклональным.

13. Антитело по любому из предшествующих пунктов, которое является агонистом BTLA человека, экспрессируемого на поверхности иммунной клетки, причем указанная иммунная клетка необязательно представляет собой Т-клетку.

14. Антитело по любому из предшествующих пунктов, причем связывание указанного антитела с BTLA человека, экспрессируемым на поверхности иммунной клетки, приводит к уменьшению пролиферации указанной клетки относительно сопоставимой иммунной клетки, не связанной с указанным антителом, при этом необязательно указанная клетка представляет собой Т-клетку, причем необязательно указанное снижение пролиферации клеток составляет по меньшей мере около 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40% или 50%.

15. Антитело по любому из предшествующих пунктов, причем (i) указанное антитело специфически связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов (BTLA) человека с KD менее 10 нМ; и/или при этом (ii) указанное антитело связывается с BTLA яванского макака с KD менее 20 нМ; и/или (iii) указанное антитело не ингибирует связывание BTLA с медиатором входа вируса герпеса (HVEM); и/или (iv) указанное антитело ингибирует пролиферацию Т-клеток *in vitro*, что определено в анализе реакции смешанной культуры лимфоцитов.

16. Антитело по п. 15, которое связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов (BTLA) человека со скоростью ассоциации по меньшей мере $5,0 \times 10^5$ (1/Мс) при 37 °С, и/или со скоростью диссоциации менее $3,0 \times 10^{-4}$ (1/с) при 37 °С, и/или с KD менее 10 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С.

17. Выделенное человеческое антитело, которое специфически связывается с аттенуатором В- и Т-лимфоцитов (BTLA), содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем

(a) тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR: CDRH1, CDRH2 и CDRH3, при этом CDRH1, CDRH2, CDRH3 имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 3 соответственно, и при этом легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR: CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем CDRL1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, CDRL2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и CDRL3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6; и/или

(b) тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18; или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%; и/или

(c) легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%;

при этом тяжелая цепь содержит область Fc, которая содержит аспарагиновую действие в положении 238 (индекс ЕС);

причем необязательно антитело представляет собой антитело IgG1, IgG2 или IgG4.

18. Нуклеиновая кислота, которая содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих полипептиды, способные образовывать антитело по любому из пп. 1–17.

19. Экспрессионный вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 18.

20. Клетка-хозяин, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты по п. 18 или 19.

21. Способ получения антитела, которое связывается с BTLA, включающий стадию культивирования клетки-хозяина по п. 20 в условиях, подходящих для получения указанного антитела, необязательно дополнительно включающий выделение и/или очистку указанного антитела.

22. Способ получения антитела, которое специфически связывается с BTLA, включающий следующие стадии:

- (i) обеспечение клетки-хозяина, содержащей одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность тяжелой цепи и легкой цепи, которые при экспрессии способны комбинироваться с образованием молекулы антитела по любому из пп. 1–17;
- (ii) культивирование клетки-хозяина, экспрессирующей закодированную аминокислотную последовательность; и
- (iii) выделение антитела.

23. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество антитела по любому из пп. 1–17 и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент.

24. Антитело по любому из пп. 1–17 или фармацевтическая композиция по п. 23 для применения в терапии.

25. Антитело по любому из пп. 1–17 или фармацевтическая композиция по п. 23 для применения в лечении или профилактике воспалительных или аутоиммунных заболеваний и расстройств, связанных с избыточной пролиферацией иммунных клеток.

26. Антитело для применения по п. 25, причем воспалительное или аутоиммунное заболевание выбрано из болезни Аддисона, аллергии, очаговой алопеции, бокового амиотрофического склероза, анкилозирующего спондилита, антифосфолипидного синдрома, астмы (включая аллергическую астму), аутоиммунной гемолитической анемии, аутоиммунного гепатита, аутоиммунного панкреатита, аутоиммунного полиэндокринного синдрома, болезни Бехчета, буллезного пемфигоида, церебральной малярии, хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии, целиакии, болезни Крона, синдрома Кушинга, дерматомиозита, сахарного диабета 1 типа, эозинофильного гранулематоза с полиангиитом, реакции «трансплантат против хозяина», болезни Грейвса, синдрома Гийена — Барре, тиреоидита Хашимото, гнойного гидраденита, воспалительного фиброза (например, склеродермии, фиброза легких и цирроза), ювенильного артрита, болезни Кавасаки, лейкоза, лимфомы, лимфопролиферативных расстройств, рассеянного склероза, миастении гравис, миеломы, нейромиелиита зрительного нерва, пузырчатки, полимиозита, первичного билиарного холангита, первичного склерозирующего холангита, псориаза, псориатического артрита, ревматоидного артрита, саркоидоза, синдрома Шегрена, системной красной волчанки, артерита Такаясу, височного артерита, отторжения трансплантата, поперечного миелита, язвенного колита, увеита, васкулита, витилиго и болезни Фогта — Коянаги — Харада.

27. Антитело для применения по п. 25, причем расстройство, связанное с избыточной пролиферацией иммунных клеток, выбрано из лимфомы, лейкоза, системного мастоцитоза, миеломы или лимфопролиферативного расстройства.

28. Способ лечения связанного с ВТЛА заболевания у пациента, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела по любому из пп. 1–17 или фармацевтической композиции по п. 23.

29. Способ по п. 28, в котором связанное с ВТЛА заболевание представляет собой воспалительное или аутоиммунное заболевание, или иммунопролиферативное заболевание или расстройство.

30. Способ по п. 29, в котором воспалительное или аутоиммунное заболевание выбрано из болезни Аддисона, аллергии, очаговой алопеции, бокового амиотрофического склероза, анкилозирующего спондилита, антифосфолипидного синдрома, астмы (включая аллергическую астму), аутоиммунной гемолитической анемии, аутоиммунного гепатита, аутоиммунного панкреатита, аутоиммунного полиэндокринного синдрома, болезни Бехчета, буллезного пемфигоида, церебральной малярии, хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии, целиакии, болезни Крона, синдрома Кушинга, дерматомиозита, сахарного диабета 1 типа, эозинофильного грануломатоза с полиангиитом, реакции «трансплантат против хозяина», болезни Грейвса, синдрома Гийена — Барре, тиреоидита Хашимото, гнойного гидраденита, воспалительного фиброза (например, склеродермии, фиброза легких и цирроза), ювенильного артрита, болезни Кавасаки, лейкоза, лимфомы, лимфопролиферативных расстройств, рассеянного склероза, миастении гравис, миеломы, нейромиеелита зрительного нерва, пузырьчатки, полимиозита, первичного билиарного холангита, первичного склерозирующего холангита, псориаза, псориатического артрита, ревматоидного артрита, саркоидоза, синдрома Шегрена, системной красной волчанки, артерита Такаясу, височного артерита, отторжения трансплантата, поперечного миелита, язвенного колита, увеита, васкулита, витилиго и болезни Фогта — Коянаги — Харада.

31. Способ по п. 29, причем иммунопролиферативное заболевание или расстройство выбрано из лимфомы, лейкоза, системного мастоцитоза, миеломы или лимфопролиферативного расстройства.

Фиг. 1

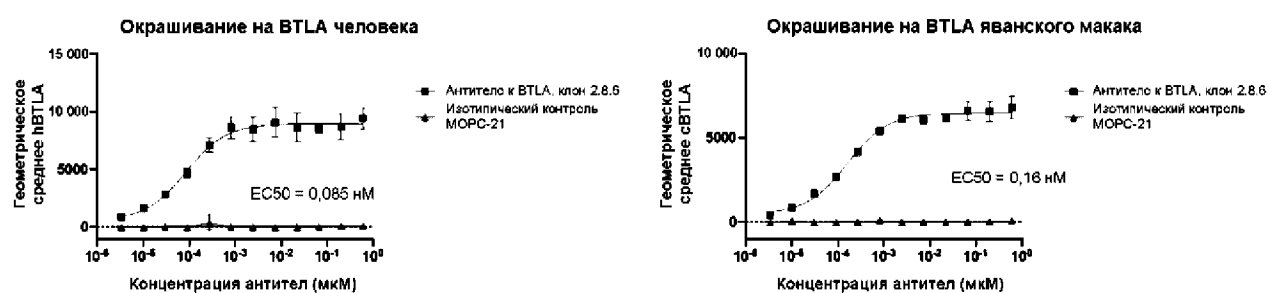
а



b

Клон	Мишень	Kon (1/Мс)	Koff (1/с)	KD (М)
2.8.6	ВТЛА человека	6,46E+05	4,23E-04	6,55E-10
	ВТЛА яванского макака	7,95E+05	6,27E-03	7,89E-09
11.5.1	ВТЛА человека	6,03E+05	4,49E-04	7,45E-10
	ВТЛА яванского макака	9,57E+05	9,52E-04	9,95E-10

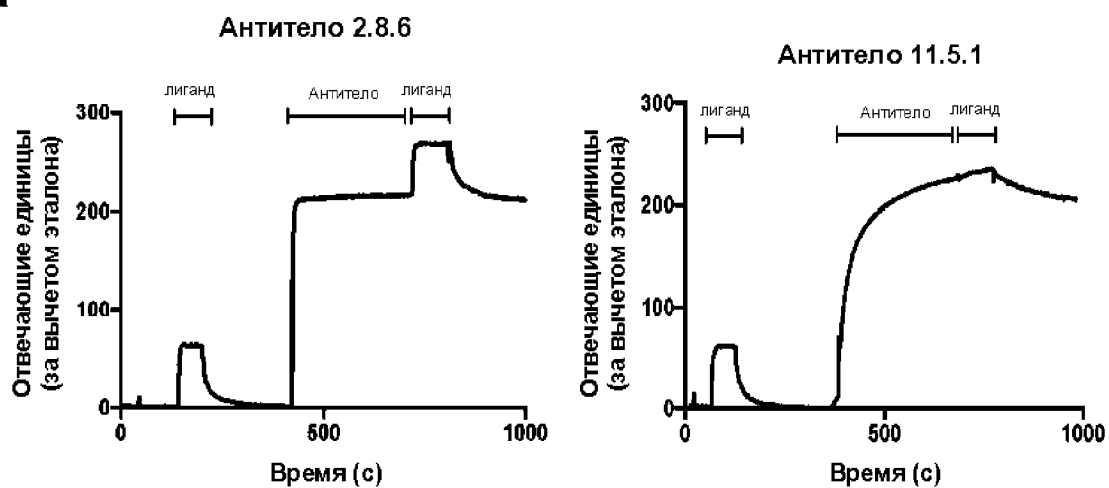
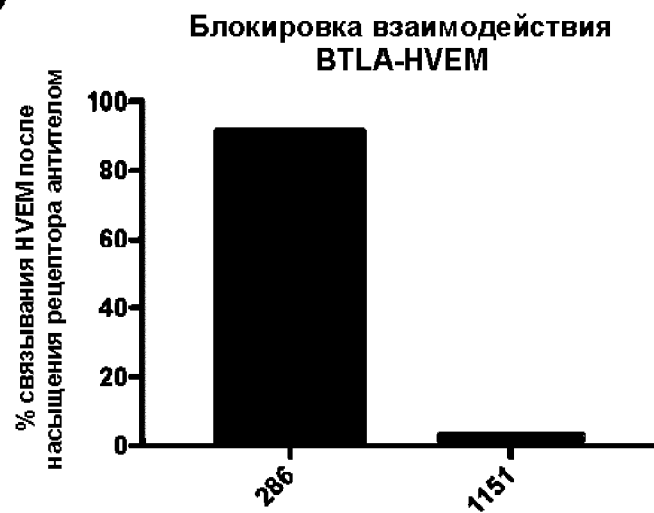
с



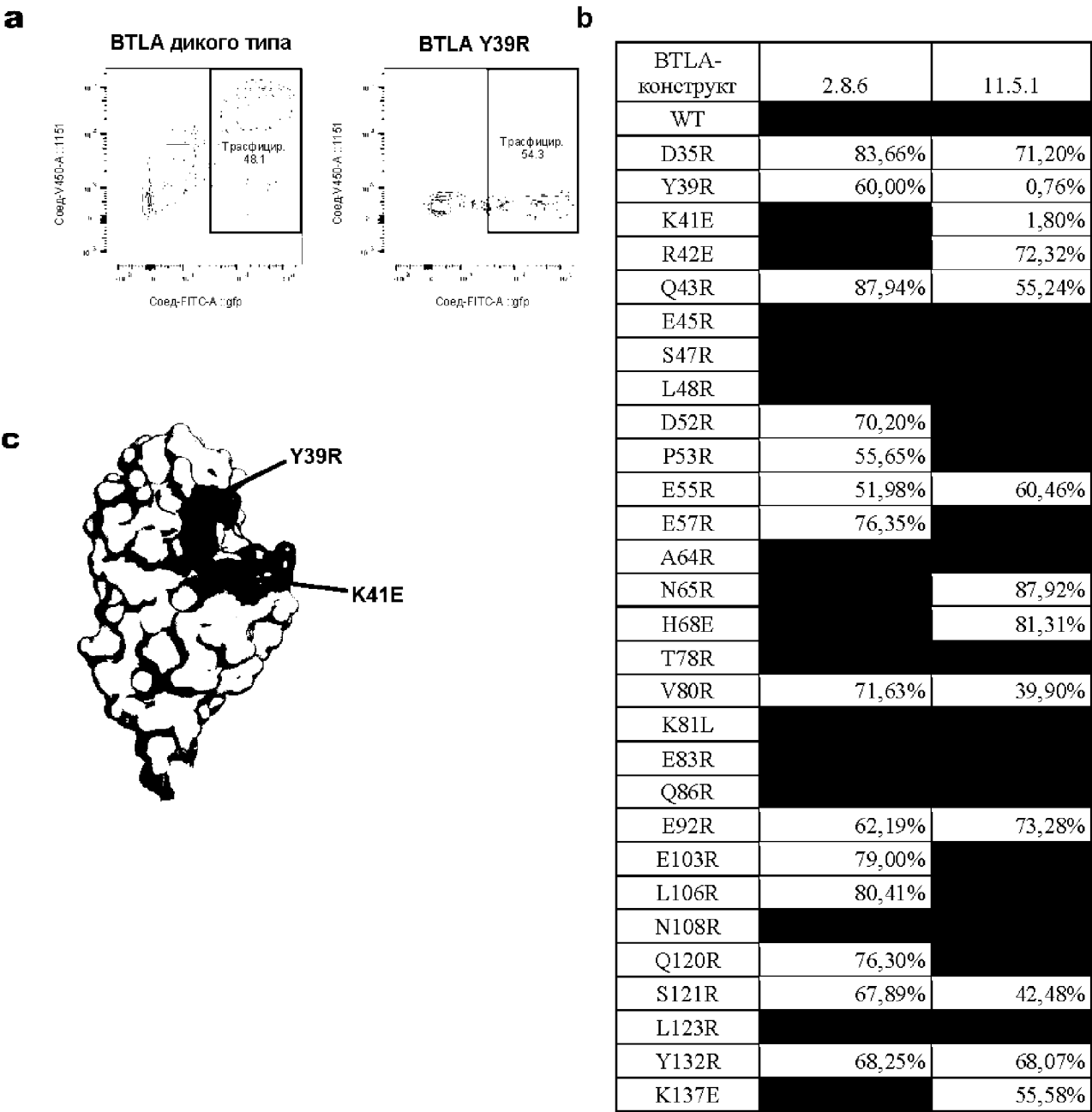
d

EC50 (нМ) для связывания антител с трансфицированными клеточными линиями		
Клон	ВТЛА человека	ВТЛА яванского макака
2.8.6	0,085	0,16
11.5.1	0,016	0,0057

Фиг. 2

a**b**

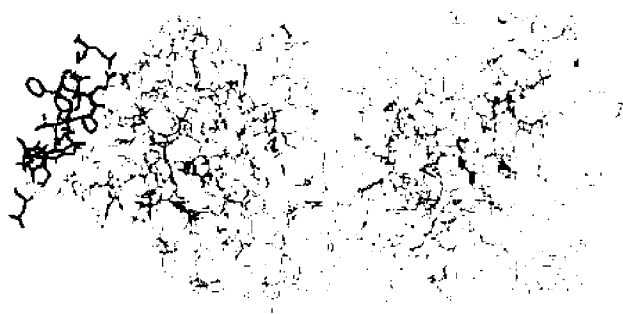
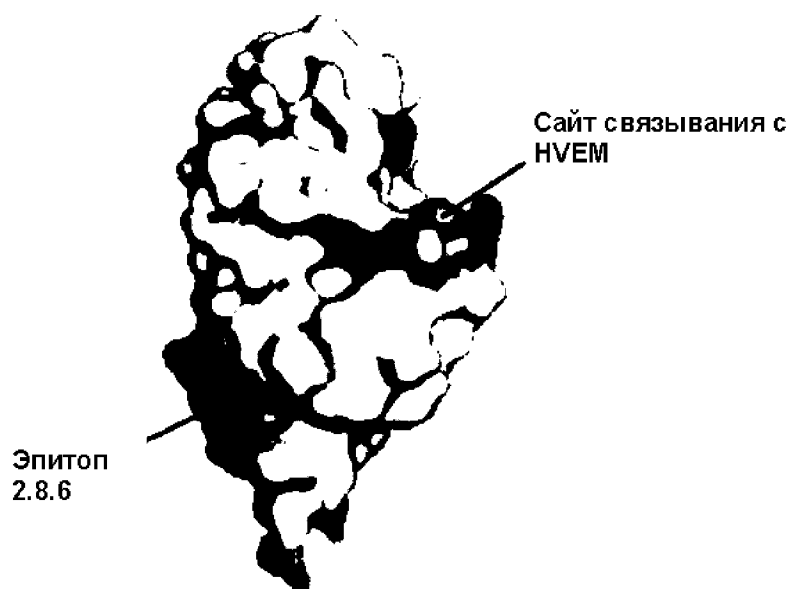
Фиг. 3

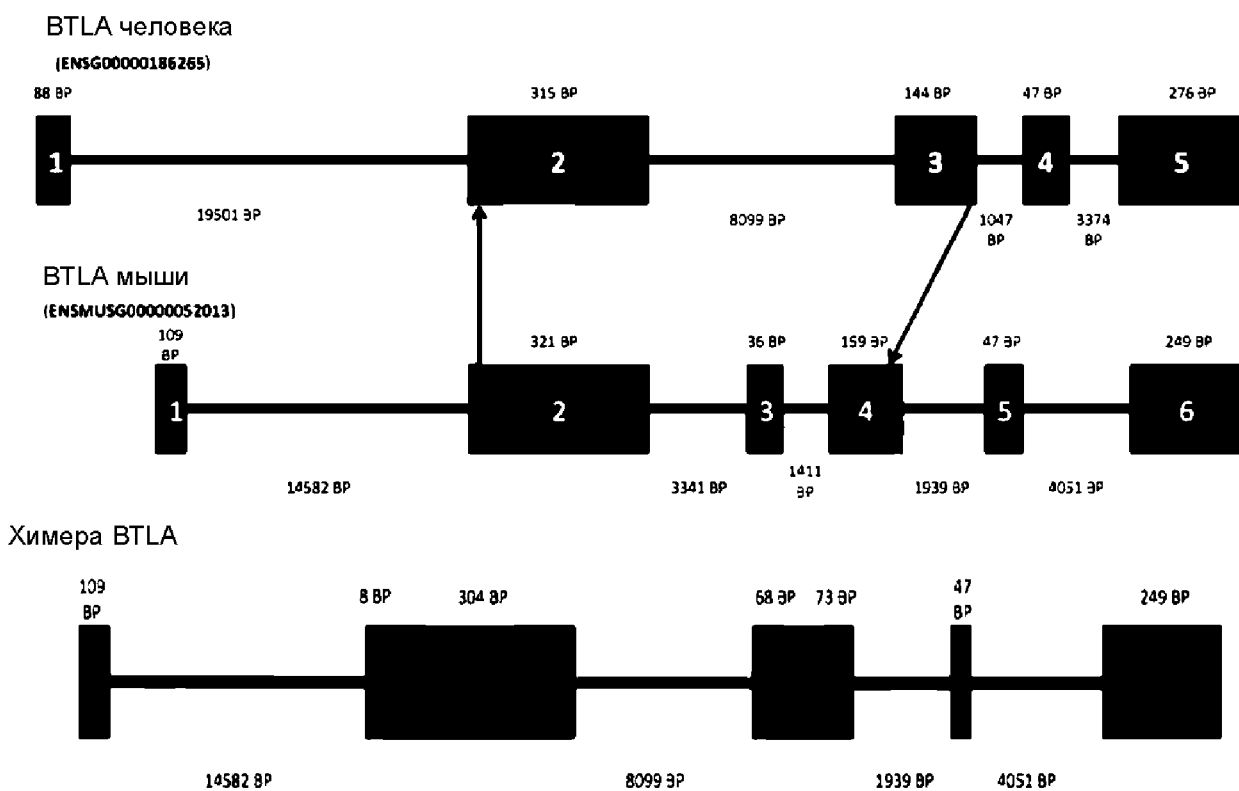


Фиг. 4

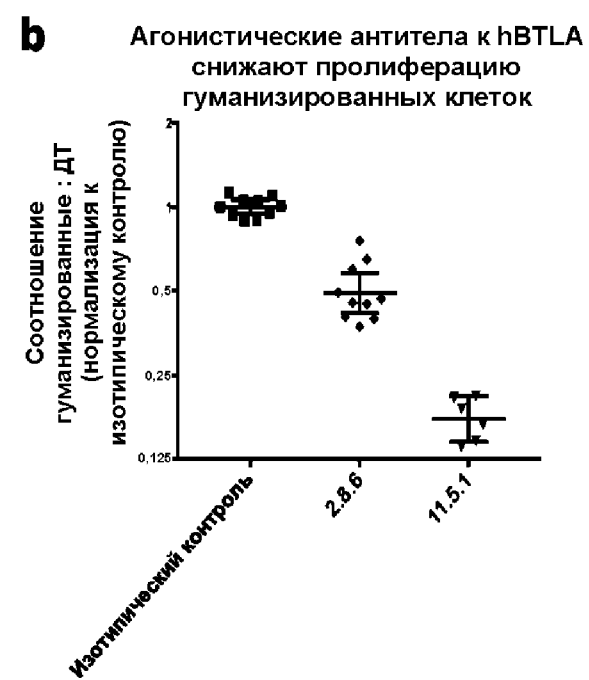
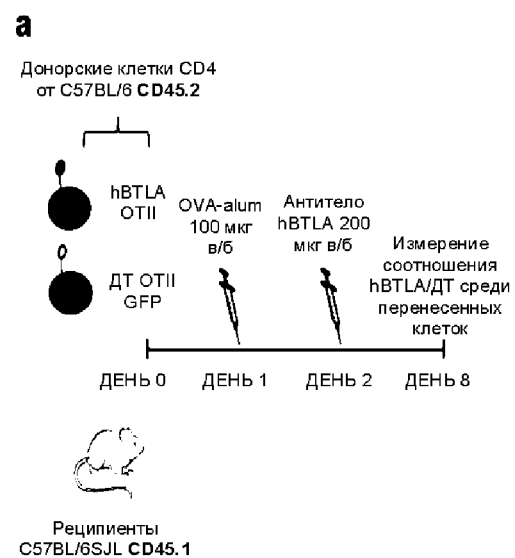
a**BTLA**

Контактные остатки на BTLA
A50, G51, D52, P53, E83, D84, R85, Q86, E103, P104, V105, L106, P107, N108, D135

Fab 2.8.6**b**

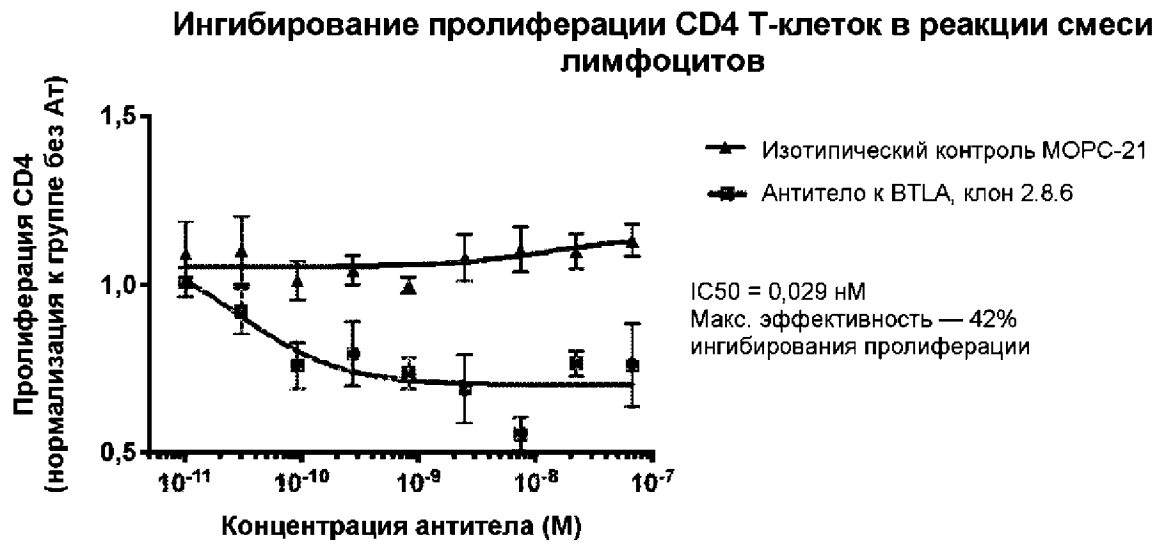


Фиг. 5

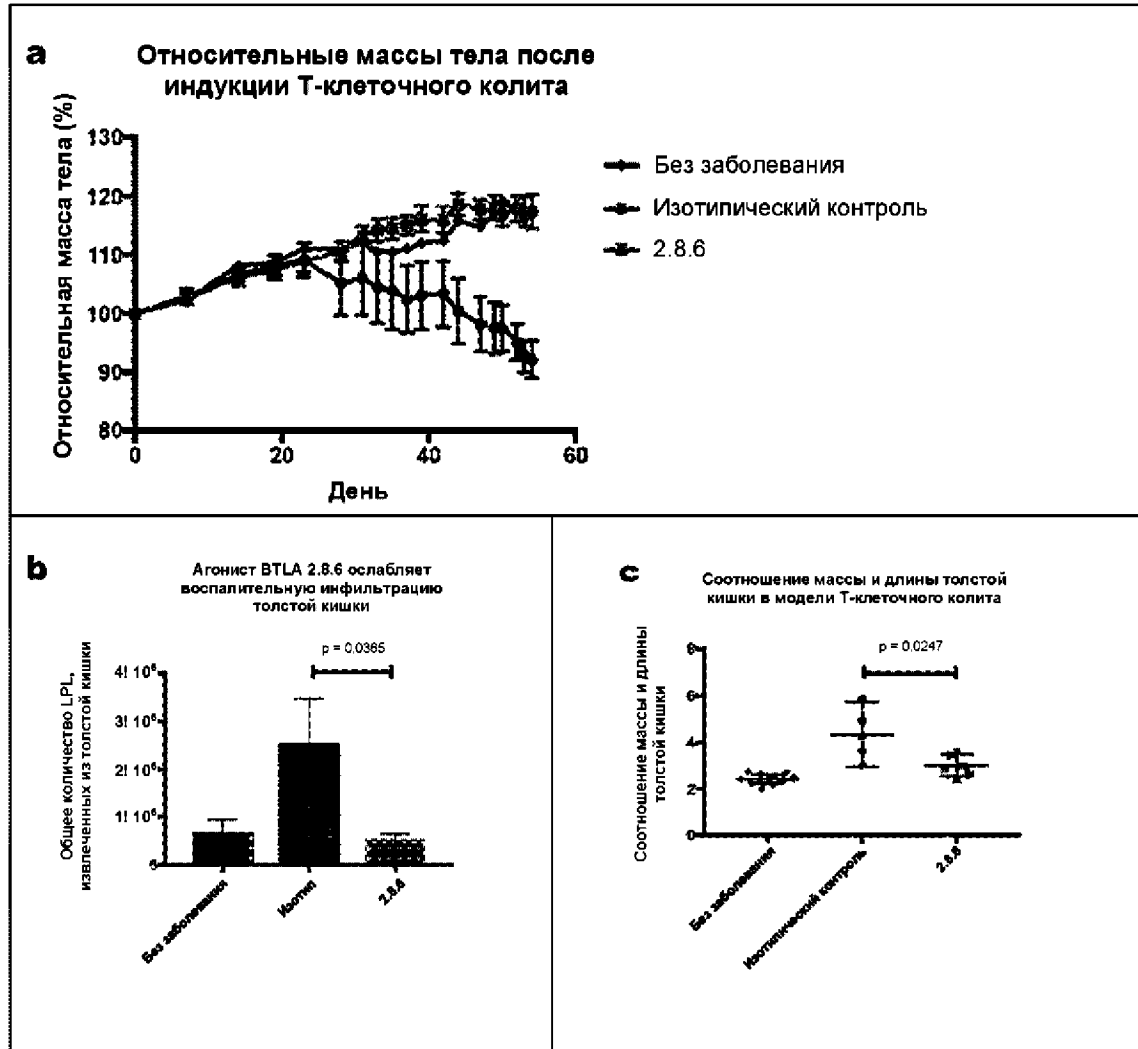


Фиг. 6

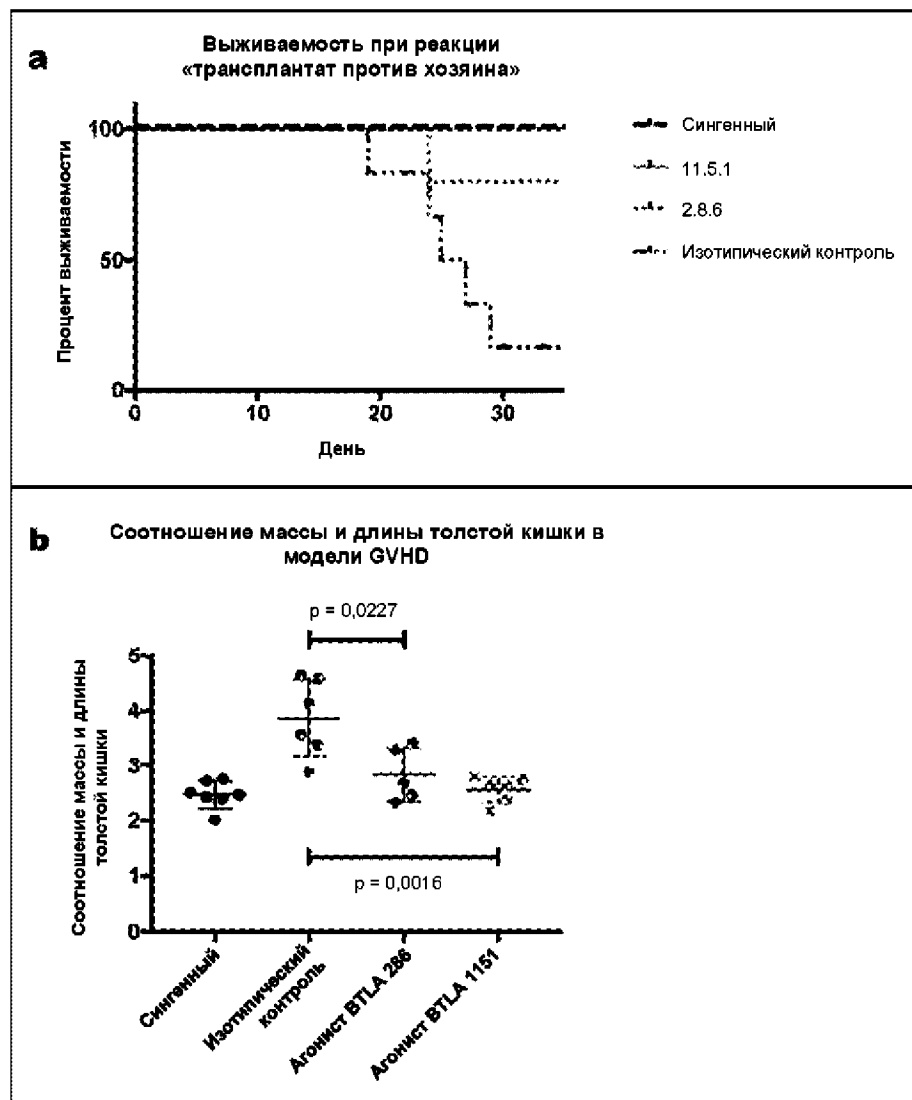
Фиг. 7



Фиг. 8

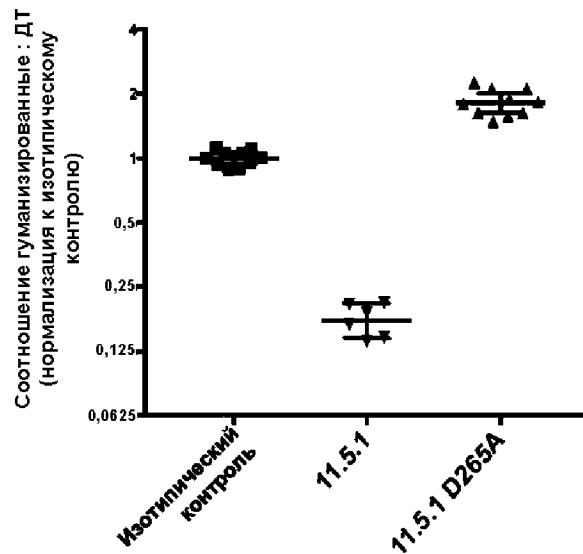


Фиг. 9

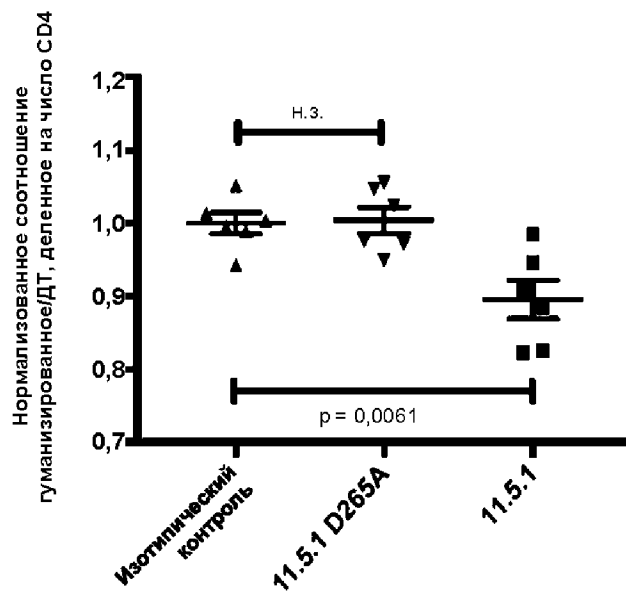


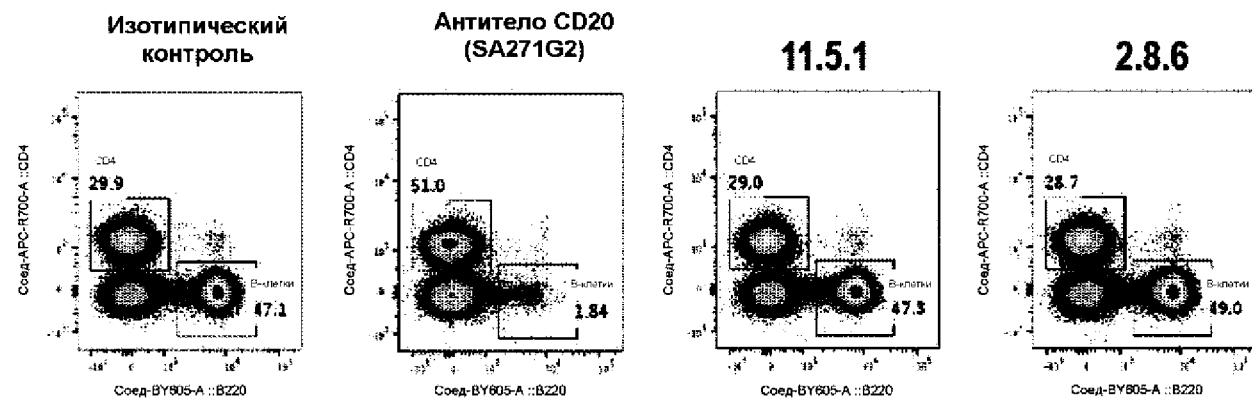
Фиг. 10

а Эффект агониста 11.5.1 *in vivo*
зависит от связывания с FcR

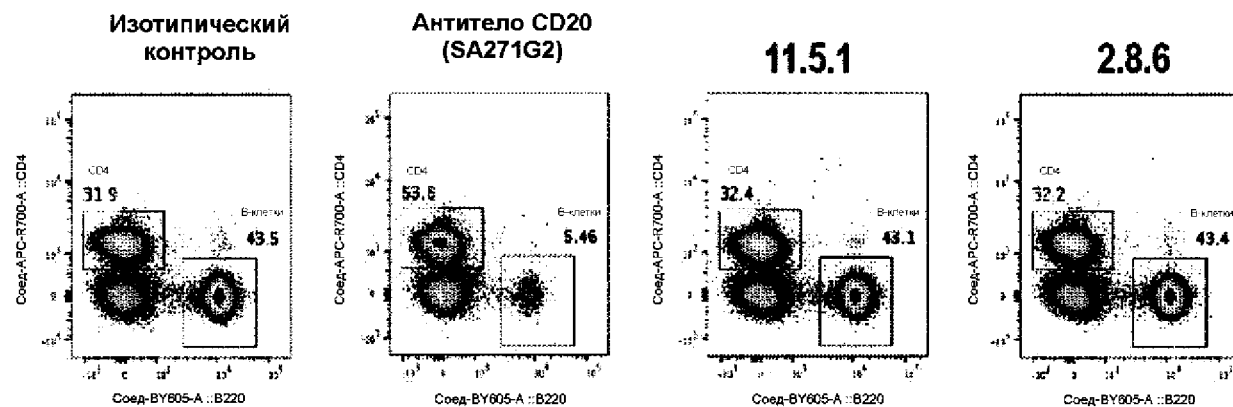


б Эффект агониста 11.5.1 *in vitro*
зависит от связывания с FcR

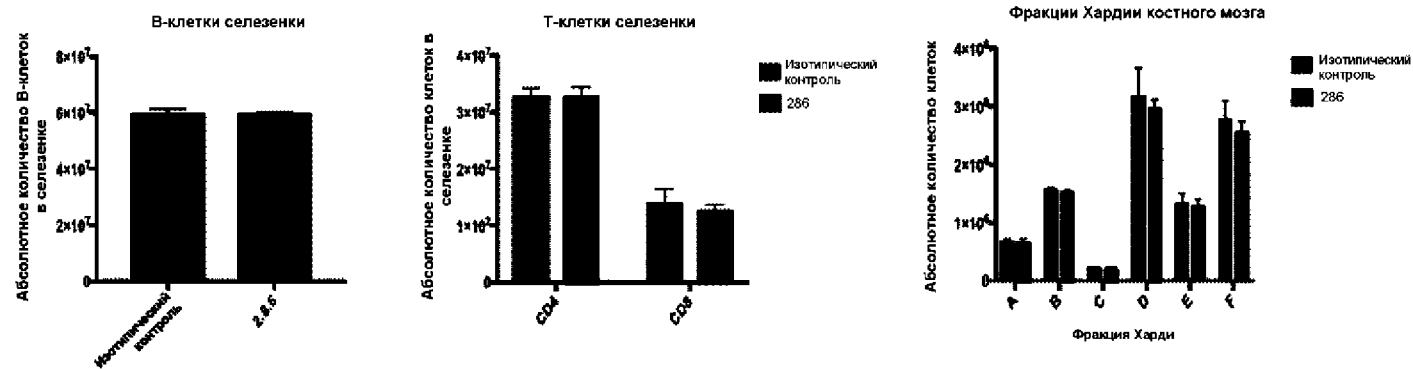




Фиг. 11

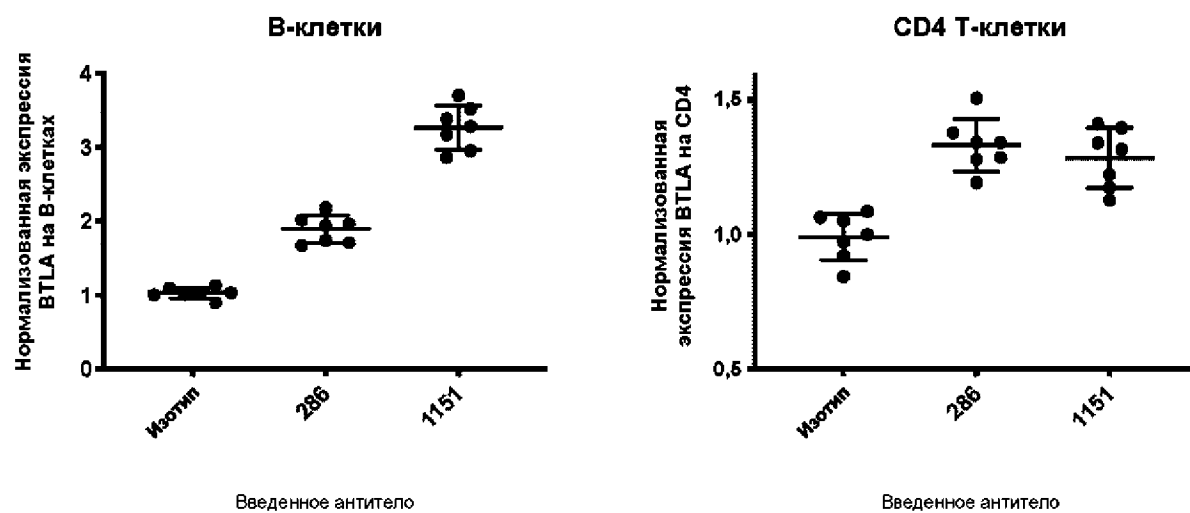


Фиг. 12



Фиг. 13

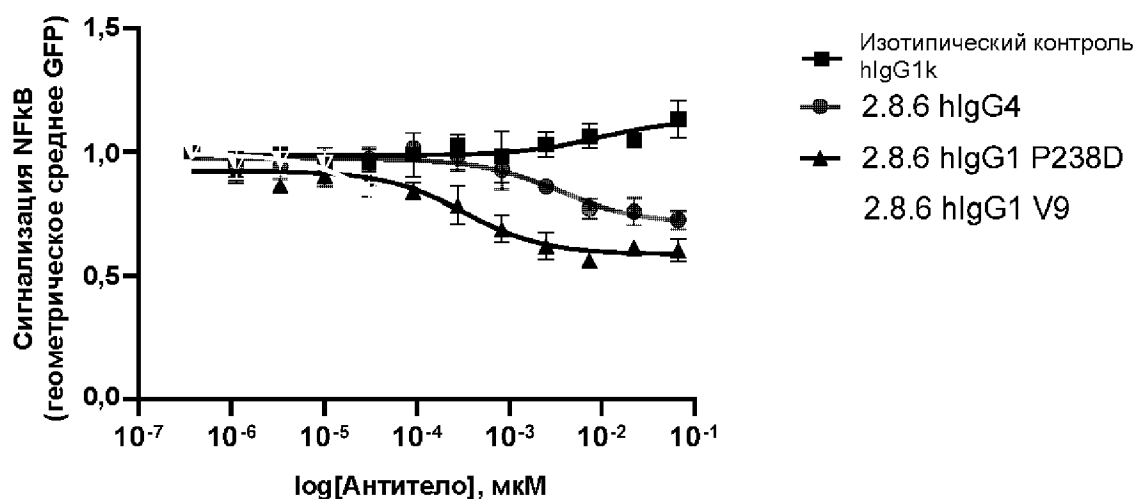
Фиг. 14



Фиг. 15

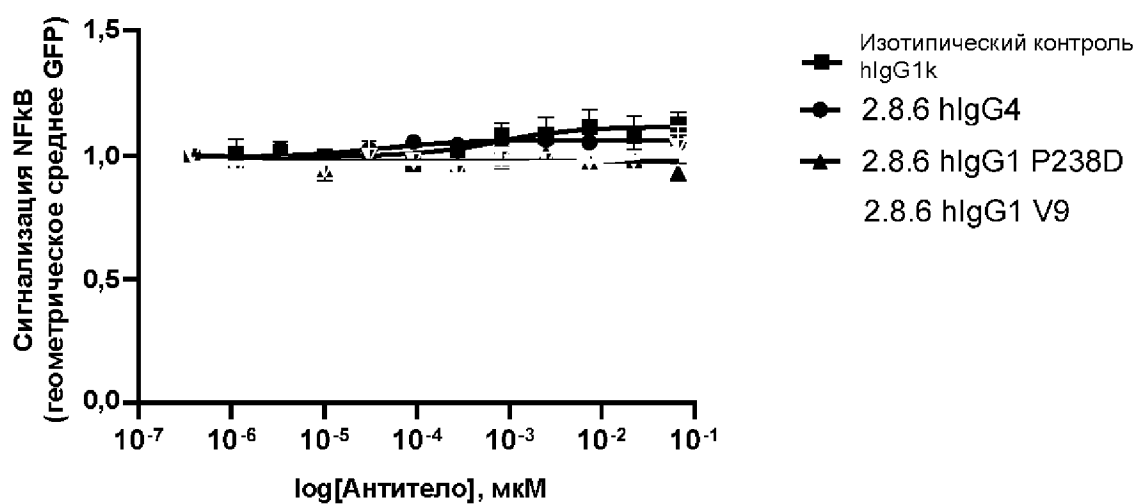
а

Влияние различных изотипов 2.8.6 на ингибирование сигнала NFκB в репортерном анализе

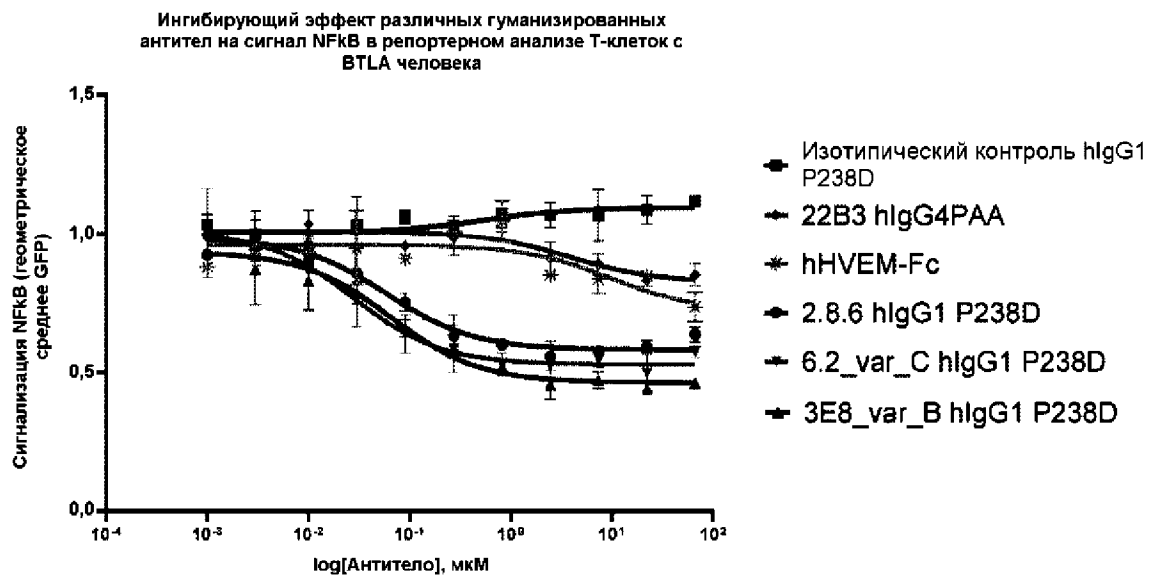


b

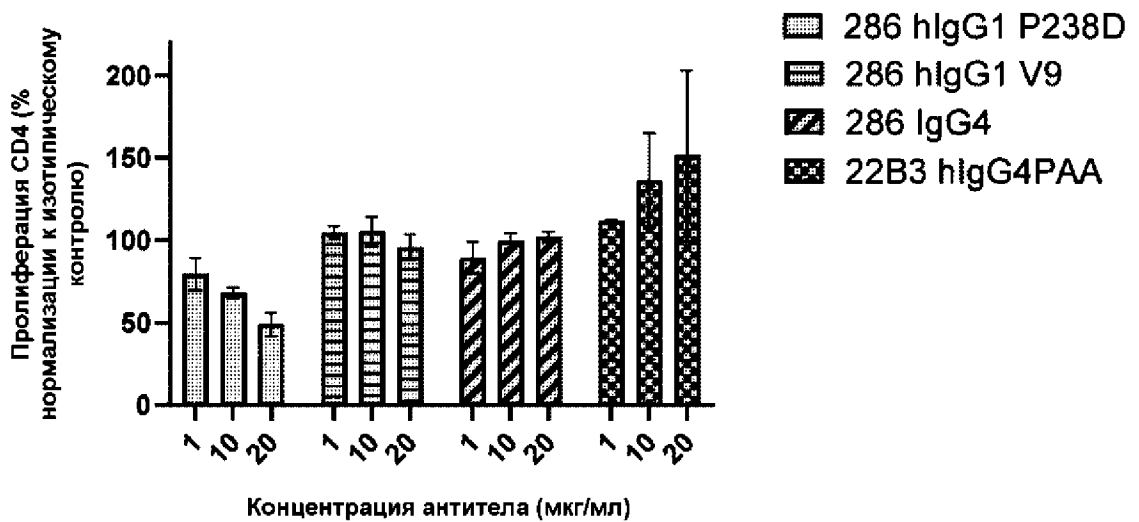
Влияние различных изотипов 2.8.6 на ингибирование сигнала NFκB в репортерном анализе без присутствия FcR



Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19

Масса тела мышей после переноса PBMC в модели ксено-GVHD

