

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391237 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.06.26(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2021.10.22

(54) МОДУЛЯТОРЫ В- И Т-ЛИМФОЦИТАРНЫХ АТТЕНУАТОРОВ (ВТЛА) И СПОСОБ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/105,067; 63/192,984

(32) 2020.10.23; 2021.05.25

(33) US

(86) PCT/US2021/056289

(87) WO 2022/087441 2022.04.28

(88) 2022.08.25

(71) Заявитель:
АНАПТИСБАЙО, ИНК. (US)

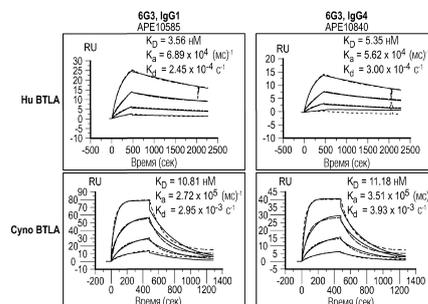
(72) Изобретатель:

Даль Мартин Эдвард, Пармли
Стефен, Кери Мэрилин, Коррея Жан
да Сильва, Шоу Морена (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) ВТЛА-связывающий агент и иммуноглобулиновые полипептиды тяжелой и легкой цепей связывающего агента, а также способы применения ВТЛА-связывающего агента для лечения расстройства или заболевания, которое реагирует на агонизм ВТЛА, такого как аутоиммунное или воспалительное заболевание.



A1

202391237

202391237

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577942EA/081

МОДУЛЯТОРЫ В- И Т-ЛИМФОЦИТАРНЫХ АТТЕНЮАТОРОВ (ВТЛА) И СПОСОБ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Перекрестные ссылки на родственные заявки

[0001] Настоящая заявка на патент испрашивает приоритет в отношении временной заявки на патент США 63/192,984, поданной 25 мая 2021 г., и временной заявки на патент США 63/105,067, поданной 23 октября 2020 г., полное описание которой настоящим включено в качестве ссылки в полном объеме.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПО ССЫЛКЕ МАТЕРИАЛОВ, ПРЕДСТАВЛЕННЫХ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[0002] В настоящее описание посредством ссылки включен в полном объеме машиночитаемый список последовательностей нуклеотидов/аминокислот, представленный одновременно с настоящим документом.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Т-лимфоциты активируются из наивного состояния за счет комбинации включения Т-клеточного рецептора (TCR) и положительных сигналов, исходящих от костимулирующих молекул. И наоборот, коингибирующие молекулы играют важную роль в модулировании активности Т-клеток, доставляя отрицательные сигналы, чтобы уравновесить положительные костимулирующие сигналы. Коингибирующие молекулы действуют как контрольные точки для поддержания иммунологической толерантности к себе и для контроля активированных Т-клеток после разрешения иммунных поражений, таких как инфекции и воспаления.

[0004] CD28 является доминирующей костимулирующей молекулой на Т-клетках, которая после взаимодействия с лигандами В7.1 или В7.2 на поверхности антигенпрезентирующих клеток (АРС) доставляет внутриклеточные сигналы, которые усиливают пролиферацию и дифференцировку Т-клеток с сопутствующим участием TCR. Пролиферация Т-клеток и эффекторные функции ингибируются, когда одни и те же лиганды взаимодействуют с коингибирующей молекулой антигена-4 цитотоксический Т-лимфоцитов (CTLA-4) на Т-клетках (Chambers et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 19:565-594, 2001; Egen et al., *Nature Immunol.*, 3:611-618, 2002). Точно так же пролиферация Т-клеток и эффекторные функции ингибируются, когда клетки, экспрессирующие PD-L1, взаимодействуют с коингибирующей молекулой PD-1 на Т-клетках (Carter et al. *Eur J Immunol.*, 32:634-43, 2002).

[0005] Дисфункция отрицательных сигналов контрольных точек может способствовать хроническим воспалительным состояниям, предотвращая супрессивные сигналы, которые обычно контролируют аутореактивные В- и Т-лимфоциты. У пациентов с аутоиммунными заболеваниями иммунная система реагирует на нормальные ткани организма, как если бы они были чужеродными, и ткани могут быть инфильтрированы активированными Т-клетками и В-клетками, у которых нарушена толерантность к

аутоантигенам. Как следствие, аутоиммунные Т- и В-лимфоциты опосредуют воспаление и повреждение тканей. Лимфоциты, экспрессирующие коингибирующие молекулы, такие как В- и Т-лимфоцитарный аттенуатор (ВТЛА), антиген-4 цитотоксических Т-лимфоцитов (СТЛА-4) и PD-1, обычно подавляются другими иммунными или неиммунными клетками в тканях, которые экспрессируют соответствующие лиганды. .

[0006] Было показано, что нокаут коингибирующих молекул или фармакологическая блокада коингибирующих взаимодействий высвобождают супрессорные разрывы и вызывают экспансию опухолеспецифических популяций Т-клеток и направляют их на атаку и уничтожение опухолевых клеток в животных моделях различных видов рака. Мыши с нокаутом ВТЛА обладают повышенной чувствительностью к экспериментальному аутоиммунному энцефаломиелиту (Watanabe et al., Nat. Immunol., 4:670-679, 2003). И наоборот, было показано, что агонистические антитела, нацеленные на мышинный ВТЛА, подавляют активность Т-клеток и продемонстрировали эффективность на мышинных моделях реакции «трансплантат против хозяина» (GvHD) (Albring et al., J. Exp. Med., 207: 2551-2559, 2010).

[0007] Лигандом для ВТЛА является медиатор проникновения вируса герпеса (HVEM), также известный как член суперсемейства 14 рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF14). HVEM также является положительной костимулирующей молекулой, которая связывает два секретлируемых фактора роста, лимфотоксин альфа и LIGHT, и также используется вирусом простого герпеса (HSV) для проникновения в клетки. Взаимодействие ВТЛА с Т-клетками с помощью HVEM, экспрессируемого на опухолевых клетках или других иммунных клетках, приводит к отрицательным супрессорным сигналам. Антитела против ВТЛА, которые связываются с ВТЛА и являются его агонистами, могут индуцировать прямые отрицательный сигналы, подобные сигналам, доставляемым нативным лигандом HVEM, тем самым подавляя аутореактивные Т- и В-клеточные ответы при аутоиммунных и воспалительных заболеваниях. Кроме того, агонистические антитела, которые привлекают ВТЛА, не мешая естественному взаимодействию HVEM-ВТЛА, могут усиливать естественный коингибирующий сигнал.

[0008] Таким образом, необходимы агенты, способные связывать ВТЛА и модулировать сигналы иммунных контрольных точек.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0009] В настоящем описании предложены ВТЛА-связывающие агенты, содержащие полипептиды тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина. В настоящем описании также предложен способ применения ВТЛА-связывающих агентов для модулирования взаимодействия между HVEM и ВТЛА и/или Т-клеточного ответа у млекопитающего.

[0010] Также предложены родственные композиции и способы, как будет видно из следующего подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ НЕСКОЛЬКИХ ВИДОВ ЧЕРТЕЖА(ЧЕРТЕЖЕЙ)

[0011] На Фигуре 1 представлены результаты кинетики связывания поверхностного

плазмонного резонанса антитела 6G3 с внеклеточным доменом BTLA человека и BTLA яванского макака.

[0012] Фигура 2 представляет собой график, изображающий результаты анализа кинетического исключения кинетики связывания антитела 6G3 с внеклеточным доменом BTLA человека и BTLA яванского макака.

[0013] Фигура 3 представляет собой график, изображающий результаты связывания антитела 6G3 с клетками 293с18, стабильно трансфицированными BTLA человека и BTLA яванского макака.

[0014] Фигура 4 представляет собой график, изображающий результаты связывания антитела 6G3 с CD4+ Т-клетками, CD8+ Т-клетками и CD20+ В-клетками периферической крови человека нормального донора.

[0015] Фигура 5А представляет собой график, изображающий результаты связывания антитела 6G3 с нормальными CD3+ Т-клетками периферической крови яванского макака.

[0016] Фигура 5В представляет собой график, изображающий результаты связывания антитела 6G3 с нормальными CD20+ В-клетками периферической крови яванского макака.

[0017] Фигура 5С представляет собой точечный график проточной цитометрии, изображающий результаты связывания эталонного антитела против BTLA с нормальными CD3+ и CD3- клетками периферической крови яванского макака.

[0018] Фигура 5D представляет собой точечный график проточной цитометрии, изображающий результаты связывания антитела 6G3 с нормальными CD3+ и CD3- клетками периферической крови яванского макака.

[0019] Фигура 6 представляет собой график, изображающий результаты конкурентного анализа, который иллюстрирует способность антител против BTLA конкурировать с HVEM-Fc и предварительно сформированным комплексом HVEM-Fc/тримерный LIGHT за связывание с клетками 293с18, стабильно трансфицированными BTLA человека.

[0020] Фигура 7А представляет собой ленточную модель, иллюстрирующую кристаллическую структуру внеклеточного домена BTLA человека (черный цвет), состыкованную с пространственной моделью кристаллической структуры внеклеточного связывающего домена HVEM человека (серый цвет). Модель изображает результаты эксперимента по обмену водорода на дейтерий, который картирует пептиды на BTLA человека, связанные с антителом 6G3.

[0021] На Фигуре 7В представлена ленточная модель, иллюстрирующая кристаллическую структуру внеклеточного домена BTLA человека (черный цвет), состыкованную с пространственной моделью кристаллической структуры внеклеточного связывающего домена HVEM человека (серый цвет). Молекула повернута на 30° по сравнению с видом молекулы, показанным на Фигуре 7А, и представляет результаты эксперимента по обмену водорода и дейтерия, который картирует пептиды на

человеческом BTLA, связанные с эталонным антителом-антагонистом против BTLA.

[0022] Фигура 8 представляет собой график, показывающий ингибирующую активность антитела 6G3 в репортерном анализе с использованием люциферазы HVEM-NF-κB HEK 293, измеряющем индуцированную LIGHT передачу сигналов HVEM, когда BTLA и HVEM экспрессируются в одной и той же клетке.

[0023] Фигура 9A представляет собой график, изображающий результаты анализа переноса энергии флуоресцентного резонанса, измеряющего ассоциацию BTLA и HVEM на поверхности трансфицированных клеток 293с18, который иллюстрирует способность антител против BTLA конкурировать со связыванием BTLA и HVEM на одной и той же клеточной поверхности.

[0024] Фигура 9B представляет собой график, изображающий результаты анализа переноса энергии флуоресцентного резонанса, измеряющего ассоциацию BTLA и HVEM на поверхности трансфицированных клеток 293с18, который иллюстрирует способность антител против BTLA, доноров флуоресценции, генерировать сигнал переноса энергии с помощью акцепторного антитела против HVEM.

[0025] Фигура 10 представляет собой график, изображающий частичную ингибирующую активность антитела 6G3 в репортерном анализе с люциферазой HVEM-NF-κB HEK 293, измеряющем индуцированную BTLA передачу сигналов HVEM, когда BTLA и HVEM экспрессируются на разных клетках.

[0026] Фигура 11 представляет собой график, показывающий агонистическую активность антитела 6G3, добавленного в качестве растворимого антитела, в анализе передачи сигналов BTLA PathHunter Jurkat с рекрутированием SHP2.

[0027] Фигура 12 представляет собой график, показывающий ингибирующую активность антител против BTLA в анализе передачи сигнала BTLA PathHunter Jurkat с рекрутированием SHP2, где передачу сигнала BTLA индуцировали с помощью HVEM на трансфицированной клеточной линии U-2 OS.

[0028] Фигура 13 представляет собой график, изображающий агонистическую активность антитела 6G3 в анализе передачи сигналов BTLA PathHunter Jurkat с рекрутированием SHP2 с добавлением трансфицированных FcγR1a клеток U-2 OS для обеспечения взаимодействия FcγR.

[0029] Фигура 14A представляет собой схему ксеногенной мышинной модели NSG/Hu-PBMC для исследования «заболевания трансплантат против хозяина», описанного в настоящем документе, в соответствии с вариантами осуществления изобретения.

[0030] Фигура 14B представляет собой схему, показывающую временную шкалу, график дозирования и модельные группы исследования NSG/Hu-PBMC «заболевания трансплантат против хозяина», описанного в настоящем документе, в соответствии с вариантами осуществления изобретения.

[0031] Фигура 14C представляет собой график, изображающий результаты общей выживаемости в исследовании NSG/Hu-PBMC «трансплантат против хозяина» для групп

животных, получавших два раза в неделю 1 мг/кг, 3 мг/кг или 10 мг/кг антитела 6G3.

[0032] Фигура 15 представляет собой график, показывающий индивидуальную и среднюю (SD) концентрации sBTLA человека на дозовую группу в гуманизированной мышинной модели GvHD после введения дозы антитела 6G3 в дозах 1, 3 и 10 мг/кг (IP) два раза в неделю. Образцы плазмы были собраны в середине исследования посредством сердечного кровотока.

[0033] Фигура 16 представляет собой график, показывающий средние (SD) концентрации sBTLA яванского макака в сыворотке на дозовую группу у яванских макаков после введения дозы 6G3 IgG4. Всем животным вводили однократную дозу 6G3 IgG4 внутривенно или подкожно, и образцы крови собирали у всех животных во всех группах до введения дозы, через 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 168, 240, 336, 504, 672 и 840 часов после введения дозы.

[0034] Фигура 17 представляет собой график, показывающий средние (SD) концентрации sBTLA яванского макака в сыворотке на дозовую группу у яванских макаков после введения дозы 6G3 IgG4. Всем животным вводили еженедельные дозы 6G3 IgG4 в дни 1, 8 и 15 либо внутривенно, либо подкожно, и образцы крови собирали у всех животных во всех группах в дни 1, 8 и 15: до введения, через 3, 24, 48, 72, 96 часов после введения дозы.

[0035] Фигура 18 представляет собой график, показывающий средние (SD) концентрации 6G3 IgG4 в сыворотке (мкг/мл) на дозовую группу у яванских макаков после введения дозы 6G3 IgG4. Всем животным вводили еженедельную дозу 6G3 IgG4 в дни 1, 8 и 15 либо внутривенно, либо подкожно, и образцы крови собирали у всех животных во всех группах в дни 1, 8 и 15: до введения дозы, через 3, 24, 48, 72, 96 часов после введения дозы.

[0036] Фигура 19 представляет собой четыре графика, демонстрирующие различные данные на дозовую группу у яванских макаков после введения дозы 6G3 IgG4, контроля изотипа или контроля CTLA-4-Ig. На первом графике показана экспрессия BTLA (MFI) для дозовой группы. На втором графике показан процент T-клеток BTLA⁺ на дозовую группу. Третий график показывает количество T-клеток человека на мкл крови на дозовую группу. Четвертый график показывает процент CD25-положительных клеток на дозовую группу.

[0037] Фигура 20 представляет собой четыре графика, показывающие занятость рецептора и поверхностную экспрессию BTLA T-клеток и B-клеток в дозовой группе у яванских макаков после введения дозы 6G3 IgG4. Всем животным вводили еженедельную дозу 6G3 IgG4 или контрольную дозу в дни 1, 8 и 15 внутривенно или подкожно. Первый график показывает процентное изменение свободных рецепторов на T-клетках по сравнению с исходным уровнем. На втором графике показано процентное изменение экспрессии BTLA на T-клетках по сравнению с исходным уровнем. Третий график показывает процентное изменение свободных рецепторов на B-клетках по сравнению с исходным уровнем. Четвертый график показывает процентное изменение по сравнению с

исходным уровнем экспрессии VTLA на В-клетках.

[0038] Фигура 21А представляет собой две гистограммы здоровых контрольных доноров и доноров с атопическим дерматитом, представленные в виде наложенных друг на друга гистограмм контроля изотипа на CD3⁺ Т-клетках, обработанных 6G3 IgG4.

[0039] Фигура 21В представляет собой два графика, демонстрирующие снижение пролиферации Т-клеток под действием 6G3 IgG4 у здоровых контролей и доноров с атопическим дерматитом, показанное в виде процентного снижения пролиферации (слева) и индекса деления (справа).

[0040] Фигура 21С представляет собой два графика, показывающие уровни IFN γ в супернатанте культуры здоровых доноров и доноров с атопическим дерматитом через 72 часа после стимуляции антителом против CD3 и антителом против CD28 в присутствии или в отсутствие 100 нМ 6G3 IgG4 или контроля изотипа.

[0041] Фигура 21D представляет собой график, показывающий уровень поверхностной экспрессии VTLA (построенный как средняя интенсивность флуоресценции (MFI)) на CD3⁺ Т-клетках здоровых контролей и доноров с атопическим дерматитом.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0042] В настоящем описании предложен VTLA-связывающий агент, содержащий полипептиды тяжелой цепи и легкой цепи иммуноглобулина. VTLA представляет собой трансмембранный белок типа 1 массой 30 килодальтон (кДа) с внеклеточным доменом, подобным иммуноглобулину, ингибирующим иммунорецептоным мотивом на основе тирозина (ITIM) и иммунорецепторным мотивом переключения на основе тирозина (ITSM). VTLA экспрессируется на В-клетках и Т-клетках и действует как отрицательный регулятор активности как В-, так и Т-клеток посредством взаимодействия со своим рецептором, медиатором проникновения вируса герпеса (HVEM), экспрессируемым на опухолевых клетках или APC (Watanabe et al., Nat. Immunol., 4:670-679, 2003). В некоторых вариантах осуществления VTLA-связывающий агент связывается с VTLA без ингибирования связывания между VTLA и HVEM. В одном аспекте VTLA-связывающий агент усиливает связывание между VTLA и HVEM.

[0043] Агент, связывающий PD-1, содержит вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина и вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина, каждая из которых содержит три определяющих комплементарность области (CDR), обычно называемых CDR1, CDR2 или CDR3. Области CDR также могут быть обозначены как «H» или «L» в номенклатуре для обозначения тяжелой или легкой цепи, соответственно, т. е. CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 или CDRL3. CDR данной последовательности Ig можно определить с помощью любой из нескольких общепринятых схем нумерации, таких как Kabat, Chothia, Martin (Enhanced Chothia), IGMT или AHo (это общеупотребительные названия для схем нумерации, широко известных в данной области и описанных в опубликованной литературе см., например, Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, NIH (1991)

с описанием схемы нумерации «Kabat»; Chothia, et al., Canonical Structures for the Hypervariable Regions of Immunoglobulins, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987) и Al-Lazikani et al., Standard Conformations for the Canonical Structures of Immunoglobulins, *J. Mol. Biol.*, 273:927-948 (1997) с описанием схемы нумерации «Chothia»; Abhinandan et al., Analysis and Improvements to Kabat and Structurally Correct Numbering of Antibody Variable Domains, *Mol. Immunol.*, 45: 3832-3839 (2008), с описанием схемы нумерации «Martin» или «Enhanced Chothia»; Lefranc et al., The IMGT unique numbering for immunoglobulins, T cell Receptors and Ig-like domains, *The Immunologist*, 7: 132-136 (1999) и Lefranc et al., IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and I superfamily V-like domains, *Dev. Comp. Immunol.*, 27: 55-77 (2003) с описанием схемы нумерации «IMGT»; и Honegger et al., Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool, *J. Mol. Biol.*, 309: 657-670 (2001) с описанием схемы нумерации «АНо»). ВТЛА-связывающие агенты представленные в настоящем документе, являются искусственными и не встречающимися в природе. Они были созданы с помощью лабораторных методов и, таким образом, корректно их считать рекомбинантными или синтетическими молекулами, содержащими рекомбинантные или синтетические аминокислотные последовательности. Полипептиды тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина могут быть «выделены» в том смысле, что они удалены из среды, в которой они получены (например, из клеточной культуры), и очищены до любой степени.

[0044] Согласно одному аспекту изобретения ВТЛА-связывающий агент содержит полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина. ВТЛА-связывающий агент содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-15, 207, 208, 217 или 218, или по меньшей мере их CDR; или содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с любой из SEQ ID NO: 1-15, 207, 208, 217 или 218. CDR могут быть определены с использованием любой известной схемы нумерации, такой как Kabat, Chothia, Martin (Enhanced Chothia), IGMT или АНо. В некоторых вариантах осуществления CDR1, CDR2 и CDR3 содержат остатки 31-35 (CDRH1), 50-66 (CDRH2) и 99-106 (CDRH3) SEQ ID NO: 1-15, 207, 208, 217 или 218.

[0045] В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь иммуноглобулина содержит следующие CDR:

(a) CDRH1, содержащую AspTyrThrIleHis (SEQ ID NO: 27);

(b) CDRH2, содержащую TrpIleTyrProGlySerGlyAsnThrLysTyrAsnAspXaa1PheLysXaa2 (SEQ ID NO: 30), где Xaa1

представляет собой лизин (Lys) или глутаминовую кислоту (Glu), а Xaa2 представляет собой аспарагиновую кислоту (Asp) или валин (Val) (например, SEQ ID NO: 28, 30, 31, 212 или 222); и

(с) CDRH3, содержащую ArgXaa1Xaa2TyrXaa3MetXaa4Tyr (SEQ ID NO: 32), где Xaa1 представляет собой аспарагин (Asn) или серин (Ser), Xaa2 представляет собой тирозин (Tyr) или гистидин (His), Xaa3 представляет собой аланин (Ala) или валин (Val), а Xaa4 представляет собой глутаминовую кислоту (Glu) или аспарагиновую кислоту (Asp). Примеры таких последовательностей CDRH3 включают, например, SEQ ID NO: 29, 33, 34, 213 или 223.

[0046] В некоторых вариантах осуществления полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Xaa1 Thr Xaa2 Thr Asp Tyr Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Asp Xaa3 Phe Lys Xaa4 Arg Val Thr Ile Thr Xaa5 Asp Xaa6 Ser Xaa7 Xaa8 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Xaa9 Cys Ala Arg Arg Xaa10 Xaa11 Tyr Xaa12 Met Xaa13 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala (SEQ ID NO: 26) или по меньшей мере ее CDR-области, где

Xaa1 представляет собой фенилаланин (Phe) или тирозин (Tyr),

Xaa2 представляет собой фенилаланин (Phe) или лейцин (Leu),

Xaa3 представляет собой лизин (Lys) или глутаминовую кислоту (Glu),

Xaa4 представляет собой аспарагиновую кислоту (Asp) или валин (Val),

Xaa5 представляет собой аланин (Ala) или аргинин (Arg),

Xaa6 представляет собой лизин (Lys) или треонин (Thr),

Xaa7 представляет собой аланин (Ala) или серин (Ser),

Xaa8 представляет собой серин (Ser) или треонин (Thr),

Xaa9 представляет собой тирозин (Tyr) или фенилаланин (Phe), и

Xaa10 представляет собой аспарагин (Asn) или серин (Ser),

Xaa11 представляет собой тирозин (Tyr) или гистидин (His),

Xaa12 представляет собой аланин (Ala) или валин (Val), и

Xaa13 представляет собой глутаминовую кислоту (Glu) или аспарагиновую кислоту (Asp).

В некоторых вариантах осуществления полипептид тяжелой цепи Ig содержит SEQ ID NO: 26 при условии, что он сохраняет те же CDR (CDR1, CDR2 и CDR3), что и любая из SEQ ID NO: 1-15, 207, 208, 217 или 218.

[0047] В соответствии с этим аспектом изобретения полипептид легкой цепи иммуноглобулина ВТЛА-связывающего агента может содержать аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 16-25, 209, 210, 219 или 220 или, по меньшей мере, ее CDR; или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере

мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности) с любой из SEQ ID NO: 16-25, 209, 210, 219 или 220. Как и в случае тяжелой цепи Ig, CDR могут быть определены с использованием любой известной схемы нумерации, такой как Kabat, Chothia, Martin (Enhanced Chothia), IGMT или АНо. В некоторых вариантах осуществления CDR1, CDR2 и CDR3 содержат остатки 24-34 (CDRH1), 50-56 (CDRH2) и 89-97 (CDRH3) SEQ ID NO: 16-25, 209, 210, 219 или 220.

[0048] В некоторых вариантах осуществления легкая цепь Ig содержит следующие CDR:

- (a) CDRL1, содержащую LysAlaSerGlnAsnValPheThrAsnValAla (SEQ ID NO: 36);
- (b) CDRL2, содержащую SerAlaSerTyrArgXaaSer (SEQ ID NO: 39), где Xaa представляет собой тирозин (Tyr) или серин (Ser) (например, SEQ ID NO: 37, 40, 215 или 225); и
- (c) CDRL3, содержащую GlnGlnTyrXaa1Xaa2TyrProTyrThr (SEQ ID NO: 41), где Xaa1 представляет собой серин (Ser) или аспарагин (Asn), а Xaa2 представляет собой треонин (Thr) или серин (Ser) (например, SEQ ID NO: 38, 41, 42, 216 или 226).

[0049] В других вариантах осуществления полипептид легкой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Phe Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Xaa1 Pro Lys Xaa2 Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Xaa3 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Xaa4 Cys Gln Gln Tyr Xaa5 Xaa6 Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg (SEQ ID NO: 35) или по меньшей мере ее CDR-области, где

- Xaa1 представляет собой серин (Ser) или пролин (Pro),
- Xaa2 представляет собой пролин (Pro) или лейцин (Leu),
- Xaa3 представляет собой тирозин (Tyr) или серин (Ser),
- Xaa4 представляет собой тирозин (Tyr) или фенилаланин (Phe),
- Xaa5 представляет собой серин (Ser) или аспарагин (Asn), и
- Xaa6 представляет собой треонин (Thr) или серин (Ser).

В некоторых вариантах осуществления полипептид легкой цепи Ig содержит SEQ ID NO: 35 при условии, что он сохраняет те же самые CDR (CDR1, CDR2 и CDR3), что и любая из SEQ ID NO: 16-25, 209, 210, 219 или 220.

[0050] В другом аспекте изобретения ВТЛА-связывающий агент содержит полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащий любую из SEQ ID NO: 43-156 или по меньшей мере ее CDR; или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85% или 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%,

по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности) с любой из SEQ ID NO: 43-156. CDR могут быть определены с использованием любой известной схемы нумерации, такой как Kabat, Chothia, Martin (Enhanced Chothia), IGMT или АНО. В некоторых вариантах осуществления CDR1, CDR2 и CDR3 содержат остатки 31-35 (CDRH1), 50-66 (CDRH2) и 99-113 (CDRH3) SEQ ID NO: 43-156, за исключением того, что в SEQ ID NO: 66, CDRH1 может представлять собой остатки 50-67, а CDRH3 может представлять собой остатки 100-114; и в SEQ ID NO: 141, 150, 152, 153, 155 и 156 CDRH3 может представлять собой остатки 100-114.

[0051] В некоторых вариантах осуществления полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина содержит следующие CDR:

(a) CDRH1, содержащую X^1SX^2MN (SEQ ID NO: 195), где X^1 представляет собой N или T, а X^2 представляет собой W, F, H, G, P, R, K, D, S, L, V, N или Y;

(b) CDRH2, содержащую $RIYPX^1GX^2X^3DTNYX^4GKFK$ (SEQ ID NO: 196), где:

X^1 отсутствует или представляет собой A;

X^2 представляет собой D, Y, Q, G, L, F, H, S, P, R или T;

X^3 представляет собой G, Y, A, F, S, D, V, T, E, K или R; и

X^4 представляет собой N, V, Q, R, A, F, Y, S, G, P или T; и

(c) CDRH3, содержащую $X^1SGTFX^2X^3GNYX^4X^5YFDV$ (SEQ ID NO: 197), где:

X^1 представляет собой K или R;

X^2 представляет собой N или D;

X^3 представляет собой D, S, F, Y, F, V, S, G, T, R, I, L или E;

X^4 представляет собой R или H; и

X^5 представляет собой W, R, F, L, N, Y, P, I, V, A, S, G, R или K.

[0052] В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь Ig содержит CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 201; CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 202; и CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 203.

[0053] В некоторых вариантах осуществления BTLA-связывающий агент содержит полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащий последовательность: $QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSKASGYX^1FSX^2SX^3MNWVRQAPGQGLEWMGRIYPX^4GX^5X^6DTNYX^7GKFKGRVTITADKX^8TX^9TAYMELX^{10}SLRSEX^{11}TAVX^{12}YX^{13}CAX^{14}SGTFX^{15}X^{16}GNYX^{17}X^{18}YFDVWGKGTTVTVSSA$ (SEQ ID NO: 193), или по меньшей мере ее CDR-области, где

X^1 представляет собой A или V;

X^2 представляет собой N или T;

X^3 представляет собой W, F, H, G, P, R, K, D, S, L, V, N или Y;

X^4 отсутствует или представляет собой A;

- X⁵ представляет собой D, Y, Q, G, L, F, H, S, P, R или T;
 X⁶ представляет собой G, Y, A, F, S, D, V, T, E, K или R;
 X⁷ представляет собой N, V, Q, R, A, F, Y, S, G, P или T;
 X⁸ представляет собой S или F;
 X⁹ представляет собой S, T или N;
 X¹⁰ представляет собой S или R;
 X¹¹ представляет собой D или V;
 X¹² отсутствует или представляет собой Y;
 X¹³ представляет собой Y или F;
 X¹⁴ представляет собой K или R;
 X¹⁵ представляет собой N или D;
 X¹⁶ представляет собой D, S, F, Y, F, V, S, G, T, R, I, L или E;
 X¹⁷ представляет собой R или H; и
 X¹⁸ представляет собой W, R, F, L, N, Y, P, I, V, A, S, G, R или K.

В некоторых вариантах осуществления полипептид тяжелой цепи Ig содержит SEQ ID NO: 193 при условии, что она сохраняет те же CDR (CDR1, CDR2 и CDR3), что и любая из SEQ ID NO: 43-156.

[0054] В соответствии с этим аспектом изобретения связывающий агент дополнительно содержит легкую цепь Ig, содержащую любую из SEQ ID NO: 157-192 или по меньшей мере ее CDR; или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85% или 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности) с любой из SEQ ID NO: 157-192. CDR могут быть определены с использованием любой известной схемы нумерации, такой как Kabat, Chothia, Martin (Enhanced Chothia), IGMT или AHO. В некоторых вариантах осуществления CDR1, CDR2 и CDR3 содержат остатки 24-34 (CDRL1), 50-56 (CDRL2) и 89-97 (CDRL3) SEQ ID NO: 157-192.

[0055] В некоторых вариантах осуществления BTLA-связывающий агент может содержать полипептид легкой цепи иммуноглобулина, содержащий:

- (a) CDRL1, содержащую RX¹SENIYX²X³LA (SEQ ID NO: 198), где
 X¹ представляет собой A или V;
 X² представляет собой S или N; и
 X³ представляет собой H, N или Y;
 (b) CDRL2, содержащую X¹AX²NLAX³ (SEQ ID NO: 199), где
 X¹ представляет собой A или N;
 X² представляет собой T или K; и

X³ представляет собой N, L, Q, G, F, V, K, S, R, T, H или P; и
(с) CDRL3, содержащую QX¹FX²GPPLT (SEQ ID NO: 200), где

X¹ представляет собой L или H; и

X² представляет собой W, F, Y, P, N, V, K, M, L, G или S.

[0056] В некоторых вариантах осуществления легкая цепь Ig содержит CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 204; CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 205; и CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 206.

[0057] В некоторых вариантах осуществления полипептид легкой цепи иммуноглобулина содержит последовательность: X¹IQX²TQSPSSLSASVGDRVTITCRX³SENIYX⁴X⁵LAWYQKX⁶GKAPKLLIYX⁷AX⁸NLA X⁹GVPSRFSGSGSGTDX¹⁰TLTISSLQPEDFATYYCQX¹¹FX¹²GPPLTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 194), или по меньшей мере ее CDR, где

X¹ представляет собой A или D;

X² представляет собой L или M;

X³ представляет собой A или V;

X⁴ представляет собой S или N;

X⁵ представляет собой H, N или Y;

X⁶ представляет собой P или Q;

X⁷ представляет собой A или N;

X⁸ представляет собой T или K;

X⁹ представляет собой N, L, Q, G, F, V, K, S, R, T, H или P;

X¹⁰ представляет собой F или Y;

X¹¹ представляет собой L или H;

X¹² представляет собой W, F, Y, P, N, V, K, M, L, G, S.

В некоторых вариантах осуществления полипептид легкой цепи Ig содержит SEQ ID NO: 194 при условии, что она сохраняет те же CDR (CDR1, CDR2 и CDR3), что и любая из SEQ ID NO: 157-192.

[0058] В соответствии с одним вариантом осуществления BTLA-связывающий агент содержит вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 144 или аминокислотную последовательность, имеющую с ней по меньшей мере 80%, 85% или 90% идентичность последовательности (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности); или вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую по меньшей мере CDR SEQ ID NO: 144, где области CDR представлены выше (например, CDR1 - SEQ ID NO: 201, CDR2 - SEQ ID NO: 202 и CDR3 - SEQ ID NO: 203), или как определено в соответствии с любой из различных известных

схем нумерации иммуноглобулинов (например, Kabat, Chothia, Martin (Enhanced Chothia), IGMT или АНo); и вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 174 или аминокислотную последовательность, имеющую с ней по меньшей мере 80%, 85% или 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности), или вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина, содержащую по меньшей мере CDR SEQ ID NO: 174; где области CDR представлены выше (например, CDR1 - SEQ ID NO: 204, CDR2 - SEQ ID NO: 205 и CDR3 - SEQ ID NO: 206) или определены в соответствии с любой из различных известных схем нумерации иммуноглобулинов (например, Kabat, Chothia, Martin (Enhanced Chothia), IGMT или АНo). В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 144 и вариабельную область легкой цепи SEQ ID NO: 174 или, по меньшей мере, их CDR, как определено Kabat. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 144 и вариабельную область легкой цепи SEQ ID NO: 174 или, по меньшей мере, их CDR, как определено Chothia. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 144 и вариабельную область легкой цепи SEQ ID NO: 174 или, по меньшей мере, их CDR, как определено Martin. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 144 и вариабельную область легкой цепи SEQ ID NO: 174 или, по меньшей мере, их CDR, как определено IGMT. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 144 и вариабельную область легкой цепи SEQ ID NO: 174 или, по меньшей мере, их CDR, как определено АНo.

[0059] Также предложен ВТLА-связывающий агент, который связывается с тем же эпитопом, что и ВТLА-связывающий агент, содержащий полипептиды тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, представленные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления ВТLА-связывающий агент связывается с тем же эпитопом, что и ВТLА-связывающий агент, содержащий вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 144 и вариабельную область легкой цепи SEQ ID NO: 174. В некоторых вариантах осуществления ВТLА-связывающий агент связывается с тем же эпитопом, что и ВТLА-связывающий агент, содержащий вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 5 и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 17; ВТLА-связывающий агент, содержащий вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 207 и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 209; или ВТLА-связывающий агент, содержащий вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 217 и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 219. Считается, что ВТLА-связывающий

агент связывается с одним и тем же эпитопом, если он конкурирует за связывание с BTLA с BTLA-связывающим агентом, содержащим описанные здесь полипептиды тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложен BTLA-связывающий агент, который связывается с аминокислотными остатками 52-65 и/или 100-106 BTLA человека (например, SEQ ID NO: 227 и/или 228) (эталонная последовательность UniProt ID Q7Z6A9 или соответствующие положения последовательности встречающегося в природе варианта BTLA человека). В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложен BTLA-связывающий агент, который связывается с аминокислотными остатками 46065, 82-91 или 100-106 BTLA человека (например, SEQ ID NO: 229, 230 и/или 231) (эталонная последовательность UniProt ID Q7Z6A9 или соответствующие положения последовательности встречающегося в природе варианта BTLA человека).

[0060] «Идентичность» последовательности, используемая в отношении последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, может быть определена путем сравнения интересующей последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности с эталонной последовательностью нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности. Процент идентичности представляет собой процент нуклеотидов или аминокислотных остатков, которые совпадают (т. е. идентичны) между интересующей последовательностью и эталонной последовательностью при оптимальном выравнивании. Ряд математических алгоритмов для получения оптимального выравнивания и вычисления идентичности между двумя или более последовательностями известен и общедоступен. Примеры таких программ включают CLUSTAL-W, T-Coffee и ALIGN (для выравнивания последовательностей нуклеиновых кислот и аминокислот), программы BLAST (например, BLAST 2.1, BL2SEQ и их более поздние версии от Национального центра биотехнологической информации, Bethesda, MD) и программы FASTA (например, FASTA3x, FASTM и SSEARCH) (для выравнивания последовательностей и поиска сходства последовательностей). Алгоритмы выравнивания последовательностей также раскрыты, например, в Altschul et al., *J. Molecular Biol.*, 215(3): 403-410 (1990), Beigert et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(10): 3770-3775 (2009), Durbin et al., eds., *Biological Sequence Analysis: Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids*, Cambridge University Press, Cambridge, UK (2009), Soding, *Bioinformatics*, 21(7): 951-960 (2005), Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*, 25(17): 3389-3402 (1997), и Gusfield, *Algorithms on Strings, Trees and Sequences*, Cambridge University Press, Cambridge UK (1997)).

[0061] Что касается последовательностей, имеющих менее чем 100% идентичности с последовательностями тяжелой и легкой цепей, конкретно указанными выше, одна или более аминокислот вышеупомянутых полипептидов тяжелой цепи и/или полипептидов легкой цепи иммуноглобулина могут быть заменены или замещены другой аминокислотой, и/или одна или более аминокислот могут быть удалены или вставлены в описанные аминокислотные последовательности при условии, что активность

полипептида (например, способность связывать BTLA, когда он присутствует в составе BTLA-связывающего агента) в значительной степени сохраняется. «Биологическая активность» BTLA-связывающего агента относится, например, к аффинности связывания с конкретным эпитопом BTLA (без ингибирования связывания BTLA с его рецептором и/или без ингибирования активности BTLA *in vivo* (например, IC50)), фармакокинетики и перекрестной реактивности (например, с не относящимися к человеку гомологами или ортологами белка BTLA или с другими белками или тканями). В некоторых вариантах осуществления биологическая активность BTLA-связывающего агента включает способность агента усиливать связывание BTLA с его рецептор(ами) и/или иным образом повышать активность BTLA *in vivo*. Другие биологические свойства или характеристики антигенсвязывающего агента, признанные в данной области, включают, например, авидность, селективность, растворимость, укладку, иммунотоксичность, экспрессию и состав. Вышеупомянутые свойства или характеристики можно наблюдать, измерять и/или оценивать с использованием стандартных методов, включая, помимо прочего, ИФА, конкурентный ИФА, анализ поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore™), или конкуренцию фаз в растворе (KINEXA™), *in vitro* или анализы нейтрализации *in vivo*, анализы связывания рецептор-лиганд, анализы продукции и/или секреции цитокинов или факторов роста, а также анализы трансдукции сигнала и иммуногистохимические анализы.

[0062] Замена или замещение аминокислоты может быть консервативным, полуконсервативным или неконсервативным. Фраза «консервативная аминокислотная замена» или «консервативная мутация» относится к замене одной аминокислоты другой аминокислотой с общим свойством. Функциональный способ определения общих свойств между отдельными аминокислотами заключается в анализе нормализованных частот аминокислотных замен между соответствующими белками гомологичных организмов (Schulz and Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, New York (1979)). В соответствии с такими анализами можно определить группы аминокислот, в которых аминокислоты внутри группы предпочтительно обмениваются друг с другом и, следовательно, больше всего похожи друг на друга по своему влиянию на общую структуру белка (Schulz and Schirmer, см. выше).

[0063] Аминокислоты в широком смысле делятся на «ароматические» или «алифатические». Ароматическая аминокислота включает ароматическое кольцо. Примеры «ароматических» аминокислот включают гистидин (H или His), фенилаланин (F или Phe), тирозин (Y или Tyr) и триптофан (W или Trp). Неароматические аминокислоты широко классифицируются как «алифатические». Примеры «алифатических» аминокислот включают глицин (G или Gly), аланин (A или Ala), валин (V или Val), лейцин (L или Leu), изолейцин (I или Ile), метионин (M или Met), серин (S или Ser), треонин (T или Thr), цистеин (C или Cys), пролин (P или Pro), глутаминовая кислота (E или Glu), аспарагиновая кислота (A или Asp), аспарагин (N или Asn), глутамин (Q или Gln), лизин (K или Lys) и аргинин (R или Arg).

[0064] Алифатические аминокислоты можно разделить на четыре подгруппы. «Большая алифатическая неполярная подгруппа» состоит из валина, лейцина и изолейцина. «Алифатическая слабополярная подгруппа» состоит из метионина, серина, треонина и цистеина. «Алифатическая полярная/заряженная подгруппа» состоит из глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты, аспарагина, глутамина, лизина и аргинина. Подгруппа «малых остатков» состоит из глицина и аланина. Группа заряженных/полярных аминокислот может быть подразделена на три подгруппы: «положительно заряженная подгруппа», состоящая из лизина и аргинина, «отрицательно заряженная подгруппа», состоящая из глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты, и «полярная подгруппа», состоящая из аспарагина и глутамина.

[0065] Ароматические аминокислоты можно подразделить на две подгруппы: «подгруппа азотсодержащего гетероцикла», состоящая из гистидина и триптофана, и «фенилсодержащая подгруппа», состоящая из фенилаланина и тирозина.

[0066] Примеры консервативных аминокислотных замен включают замены аминокислот внутри подгрупп, описанных выше, например, лизин на аргинин и наоборот, так что может сохраняться положительный заряд, глутаминовая кислота на аспарагиновую кислоту и наоборот, так что может сохраняться отрицательный заряд, серин на треонин, так что может сохраняться свободный -ОН, и глутамин на аспарагина, так что может сохраняться свободный -NH₂. «Полуконсервативные мутации» включают аминокислотные замены аминокислот в тех же группах, перечисленных выше, но не в пределах одной подгруппы. Например, замена аспарагиновой кислоты на аспарагин или аспарагина на лизин включает аминокислоты в одной группе, но в разных подгруппах. «Неконсервативные мутации» включают замены аминокислот между разными группами, например, лизин на триптофан, фенилаланин на серин и т. д.

[0067] Вышеуказанные мутации (например, замены) могут быть сделаны в любой области цепи Ig. В некоторых вариантах осуществления аминокислота(ы) заменена в CDR (например, CDR1, CDR2 или CDR3) полипептида тяжелой цепи и/или полипептида легкой цепи иммуноглобулина; в других вариантах осуществления аминокислота(ы) заменена в каркасных областях, а не в CDR; в еще других вариантах осуществления аминокислоты заменены как в каркасных областях, так и в CDR. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанные мутации производятся в областях, отличных от CDR. Другими словами, переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи могут иметь заявленную идентичность последовательности с последовательностями, представленными в настоящем описании, но сохранять CDR специально предоставленной последовательности.

[0068] Кроме того, одна или более аминокислот могут быть встроены в вышеупомянутые полипептиды тяжелой цепи и/или полипептиды легкой цепи иммуноглобулина при условии, что это не отменяет функцию полипептида в контексте ВТЛА-связывающего агента (например, не предотвращает связывание агента, содержащего полипептид, от связывания с ВТЛА без ингибирования связывания ВТЛА с

его рецептором). Любое количество любых подходящих аминокислот может быть вставлено в аминокислотную последовательность полипептида тяжелой цепи и/или полипептида легкой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислота (например, 2 или более, 5 или более или 10 или более аминокислот), но не более 20 аминокислот (например, 18 или менее, 15 или менее или 12 или менее аминокислот) могут быть вставлены в аминокислотную последовательность полипептида тяжелой цепи и/или полипептида легкой цепи иммуноглобулина. В других вариантах осуществления 1-10 аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот) вставляют в аминокислотную последовательность полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина и/или полипептида легкой цепи. В этом отношении аминокислота(ы) может быть вставлена в любой из вышеупомянутых полипептидов тяжелой цепи и/или полипептидов легкой цепи иммуноглобулина в любом подходящем месте. В некоторых вариантах осуществления аминокислота(ы) вставлена в CDR (например, CDR1, CDR2 или CDR3) полипептида тяжелой цепи и/или полипептида легкой цепи иммуноглобулина; в других вариантах осуществления аминокислота(ы) вставлена в каркасные области, а не в CDR; в других вариантах осуществления аминокислоты вставлены как в каркасные области, так и в CDR.

[0069] Выделенные полипептиды тяжелой цепи и полипептиды легкой цепи иммуноглобулина по изобретению не ограничиваются полипептидами, содержащими определенные аминокислотные последовательности, описанные в настоящем документе, и также включают любой полипептид тяжелой цепи или полипептид легкой цепи, который конкурирует с полипептидом тяжелой цепи или полипептидом легкой цепи иммуноглобулина по изобретению за связывание с BTLA при включении в BTLA-связывающий агент. В этом отношении, например, полипептид тяжелой цепи или полипептид легкой цепи иммуноглобулина может представлять собой любой полипептид тяжелой цепи или полипептид легкой цепи, который связывается с одним и тем же эпитопом BTLA, распознаваемым полипептидами тяжелой и легкой цепей, описанными в настоящем документе, при включении в BTLA-связывающий агент. Конкуренцию антител можно проанализировать с помощью обычных анализов конкуренции пептидов, которые используют методы ИФА, вестерн-блоттинга или иммуногистохимии (см., например, Патенты США 4828981 и 8568992; и Braitbard et al., *Proteome Sci.*, 4: 12 (2006)).

[0070] BTLA-связывающий агент представляет собой белковую молекулу, содержащую переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина и переменную область легкой цепи, указанные в настоящем описании, которая специфически связывается с белком BTLA (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент). В некоторых вариантах осуществления BTLA-связывающий агент связывается с BTLA, не отменяя или, в некоторых вариантах осуществления, не ингибируя связывание BTLA с его рецептором. В некоторых вариантах осуществления BTLA-связывающий агент усиливает связывание BTLA с HVEM, чтобы усилить опосредованную BTLA передачу сигналов. Используемый в настоящем описании термин «ингибировать» в отношении связывания

ВТЛА с его рецептором или опосредованной ВТЛА передачи сигналов относится к способности существенно противодействовать, запрещать, предотвращать, ограничивать, замедлять, нарушать, изменять, устранять или останавливать (полностью или частично), связывание ВТЛА с его рецептором или опосредованную ВТЛА-НВЕМ передачу сигналов в присутствии связывающего агента по сравнению с таким связыванием или передачей сигналов в отсутствие связывающего агента. Термин «увеличивать» или «усиливать», используемый в отношении связывания ВТЛА с его рецептором или опосредованной ВТЛА передачи сигналов, означает увеличение или усиление такого связывания или передачи сигналов любым способом и в любой степени в присутствии связывающего агента по сравнению с таким связыванием или передачей сигнала в отсутствие связывающего агента. В некоторых вариантах осуществления связывание ВТЛА с его рецептором или ВТЛА-опосредованная передача сигналов увеличиваются в достаточной степени, чтобы уменьшить или облегчить любой симптом заболевания или состояния, связанного с недостаточной активностью ВТЛА, или которое улучшается от повышенной активности ВТЛА, или обратить вспять прогрессирование или тяжесть такого заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления ВТЛА-связывающий агент не ингибирует связывание ВТЛА-рецептор более чем на 25% (например, не ингибирует связывание ВТЛА-рецептор более чем на 10% или более чем на 5%). В некоторых вариантах осуществления ВТЛА-связывающий агент увеличивает связывание ВТЛА-рецептора по меньшей мере примерно на 20%, примерно на 30%, примерно на 40%, примерно на 50%, примерно на 60%, примерно на 70%, примерно на 80%, примерно на 90%, примерно на 95%, примерно на 100% или на диапазон, определяемый любыми двумя из предыдущих значений, по сравнению с активностью ВТЛА в отсутствие ВТЛА-связывающего агента.

[0071] ВТЛА-связывающий агент может быть частью полиспецифической (например, биспецифической или «двойной реактивной») конструкции (например, полиспецифического антитела, такого как биспецифическое или двойное реактивное антитело), которая связывает ВТЛА и другой антиген. Такая конструкция может содержать полипептиды тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина, которые связывают ВТЛА, как описано в настоящем документе, в комбинации с тяжелыми цепями и легкими цепями из иммуноглобулина, который связывает антиген, отличный от ВТЛА. Такой биспецифический ВТЛА-связывающий агент может связывать, например, ВТЛА и другой отрицательный регулятор иммунной системы, такой как антиген-4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4), Т-клеточный иммуноглобулин и муциновый домен-3 (ТИМ-3), белок 1 программируемой клеточной смерти (PD-1) и/или белок 3 гена активации лимфоцитов (LAG-3). Иммуноглобулины, которые связывают такие другие антигены-мишени, известны в данной области.

[0072] Конъюгаты антител также предложены в настоящем описании. Например, ВТЛА-связывающий агент может представлять собой конъюгат (1) антитела против ВТЛА или его фрагмента и (2) вторичного белка или небелкового фрагмента. В качестве

дополнительной иллюстрации ВТЛА-связывающий агент может содержать антитело против ВТЛА или его фрагмент, конъюгированный с другим пептидом, флуоресцентной молекулой или химиотерапевтическим агентом.

[0073] В некоторых вариантах осуществления ВТЛА-связывающий агент может представлять собой «цельный» иммуноглобулин или «фрагмент» антигенсвязывающего иммуноглобулина. «Цельный» иммуноглобулин обычно состоит из четырех полипептидов: двух полипептидов тяжелой (H) цепи и двух полипептидов легкой (L) цепи. Каждая из тяжелых цепей содержит одну N-концевую переменную (VH) область и три C-концевых константных (CH1, CH2 и CH3) области, а каждая легкая цепь содержит одну N-концевую переменную (VL) область и одну C-концевую константную (CL) область. Легкие цепи антител могут быть отнесены к одному из двух различных типов, каппа (κ) или лямбда (λ), на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов. В типичном иммуноглобулине каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью дисульфидными связями, и две тяжелые цепи связаны друг с другом дисульфидными связями. В этой конфигурации переменная область легкой цепи обычно выровнена с переменной областью тяжелой цепи, а константная область легкой цепи обычно выровнена с первой константной областью тяжелой цепи. Остальные константные области тяжелых цепей обычно выровнены друг с другом.

[0074] Переменные области или гиперпеременные области каждой пары легкой и тяжелой цепей образуют антигенсвязывающий сайт антитела. Области VH и VL имеют одинаковую общую структуру, причем каждая область включает четыре каркасных (FW или FR) области. Термин «каркасная область», используемый в настоящем документе, относится к относительно консервативным аминокислотным последовательностям в пределах переменной области, которая расположена между гиперпеременными или определяющими комплементарность областями (CDR). В каждом переменном домене имеется четыре каркасных области, которые обозначены как FR1, FR2, FR3 и FR4. Каркасные области образуют β -листы, которые обеспечивают структурный каркас переменной области (см., например, С.А. Janeway et al. (eds.), *Immunobiology*, 5th Ed., Garland Publishing, New York, NY (2001)). Каркасные области соединены тремя областями, определяющими комплементарность (CDR). Три CDR, известные как CDR1, CDR2 и CDR3, образуют «гиперпеременную область» антитела, которая обычно считается ответственной за связывание антигена.

[0075] Термин «фрагмент антитела» и подобные термины (например, «фрагмент антитела», «функциональный фрагмент антитела») используются в настоящем описании взаимозаменяемо для обозначения одного или более фрагментов или частей антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (см., как правило, Holliger et al., *Nat. Biotech.*, 23(9): 1126-1129 (2005)). «Фрагменты» антител, используемые в настоящем описании и обычно в данной области техники, включают не только фрагменты или кусочки цельного антитела в буквальном смысле, но также и другие известные сконструированные антителоподобные конструкции, которые могут включать

линкеры или другие элементы, не встречающиеся в природном антителе в дополнение к фрагменту антитела. Фрагмент антитела может содержать, например, одну или более (или все) CDR, переменные области (или их части), константные области (или их части) или некоторую их комбинацию. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, (i) фрагмент Fab, который представляет собой одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1, (ii) фрагмент F(ab')₂, который представляет собой двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области, (iii) фрагмент F_v, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, (iv) фрагмент Fab', полученный в результате разрыв дисульфидного мостика фрагмента F(ab')₂ с использованием мягких восстанавливающих условий, (v) дисульфид-стабилизированный фрагмент F_v (dsF_v) и (vi) доменное антитело (dAb), которое представляет собой пептид домена с одной переменной областью антитела (VH или VL), который специфически связывает антиген. BTLA-связывающий агент также может представлять собой фрагмент одноцепочечного антитела. Примеры фрагментов одноцепочечных антител включают, но не ограничиваются этим, (i) одноцепочечный F_v (scF_v), который представляет собой одновалентную молекулу, состоящую из двух доменов фрагмента F_v (т. е. VL и VH), соединенных синтетическим линкером, который позволяет синтезировать два домена в виде одной полипептидной цепи (см., например, Bird et al., Science, 242: 423-426 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883 (1988); и Osbourn et al., Nat. Biotechnol., 16: 778 (1998)) и (ii) диантитело, которое представляет собой димер полипептидных цепей, где каждая полипептидная цепь содержит VH, соединенную с VL пептидным линкером, который слишком короткий, чтобы позволить спаривание между VH и VL на одной и той же полипептидной цепи, тем самым стимулируя спаривание между комплементарными доменами на разных полипептидных цепях VH-VL с образованием димерной молекулы, имеющей два функциональных антигенсвязывающих сайта. Фрагменты антител известны в данной области и более подробно описаны, например, в Публикации заявки на патент США 2009/0093024 A1.

[0076] В некоторых вариантах осуществления BTLA-связывающий агент содержит константную область тяжелой цепи, такую как фрагмент области, способной к кристаллизации (Fc), или ее часть. Область Fc может относиться к любому классу/подклассу Ig (IgA (IgA1, IgA2), IgD, IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgM, включая их варианты. В некоторых вариантах осуществления BTLA-связывающий агент представляет собой «цельный» или «полный» Ig (т. е. антитело). В некоторых вариантах осуществления BTLA-связывающий агент содержит Fc-область IgG, такую как IgG1 или IgG4. Например, агент, связывающий BTLA, может представлять собой антитело IgG1 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления BTLA-связывающий агент содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 144 и 174, соответственно, или по меньшей мере их CDR (как представлено в настоящем документе или как определено согласно Kabat, Chothia, Martin (расширенная

нумерация Chothia), IGMT или АНо), или последовательности, имеющие с ними 90% идентичности, где ВТЛА-связывающий агент представляет собой антитело IgG1. В некоторых вариантах осуществления ВТЛА-связывающий агент содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 144 и 174, соответственно, или по меньшей мере их CDR (как представлено в настоящем документе или как определено согласно Kabat, Chothia, Martin (расширенная нумерация Chothia), IGMT или АНо), или последовательности, имеющие с ними 90% идентичности, где ВТЛА-связывающий агент представляет собой IgG4-антитело.

[0077] ВТЛА-связывающий агент может быть человеческим антителом, антителом, не относящимся к человеку, или химерным антителом или может быть получен из них. Под «химерным» понимают антитело или его фрагмент, включающие как человеческие, так и области, отличные от человеческих. Предпочтительно ВТЛА-связывающий агент представляет собой гуманизированное антитело. «Гуманизированное» антитело представляет собой моноклональное антитело, содержащее каркас человеческого антитела и по меньшей мере одну CDR, полученную или происходящую из антитела, отличного от человеческого. Антитела, отличные от человеческих, включают антитела, выделенные из любого животного, отличного от человека, такого как, например, грызун (например, мышь или крыса). Гуманизированное антитело может содержать одну, две или три CDR, полученные или происходящие из антитела, отличного от человеческого. В одном варианте осуществления изобретения CDRH3 ВТЛА-связывающего агента по изобретению получена или происходит из мышинового моноклонального антитела, в то время как остальные переменные области и константная область ВТЛА-связывающего агента по изобретению получены или происходят из моноклонального антитела человека.

[0078] Человеческое антитело, антитело, отличное от человеческого, химерное антитело или гуманизированное антитело можно получить любыми способами, включая источники *in vitro* (например, гибридома или клеточная линия, рекомбинантно продуцирующие антитело) и источники *in vivo* (например, грызуны). Способы получения антител известны в данной области и описаны, например, в Köhler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 5: 511-519 (1976); Harlow and Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press (1988); и Janeway et al. (eds.), *Immunobiology*, 5th Ed., Garland Publishing, New York, NY (2001)). В некоторых вариантах осуществления человеческое антитело или химерное антитело можно получить с использованием трансгенного животного (например, мыши), в котором один или более генов эндогенного иммуноглобулина заменены одним или более генами иммуноглобулина человека. Примеры трансгенных мышей, у которых гены эндогенных антител эффективно заменены генами человеческих антител, включают, но не ограничиваются ими, Medarex HUMAB-MOUSE™, Kirin TC MOUSE™ и Kyowa Kirin KM-MOUSE™ (см., например, Lonberg, *Nat. Biotechnol.*, 23(9): 1117-25 (2005) и Lonberg, *Handb. Exp. Pharmacol.*, 181: 69-97 (2008)). Гуманизированное антитело может быть получено с использованием любого подходящего метода, известного в данной области (см., например, An, Z. (ed.), *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic*, John

Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey (2009)), включая, например, трансплантацию CDR, отличных от человеческих, на каркас человеческого антитела (см., например, Kashmiri et al., *Methods*, 36(1): 25-34 (2005); и Hou et al., *J. Biochem.*, 144(1): 115-120 (2008)). В одном варианте осуществления гуманизованное антитело может быть получено с использованием способов, описанных, например, в Публикации заявки на патент США 2011/0287485 A1.

[0079] ВТЛА-связывающий агент не ограничен какой-либо конкретной аффинностью к его эпитопу. Термин «аффинность» относится к константе равновесия для обратимого связывания двух агентов и выражается как константа диссоциации (KD). Однако в некоторых вариантах осуществления ВТЛА может иметь аффинность к ВТЛА от примерно 1 пиколя (пМ) до примерно 100 микроля (μМ) (например, от примерно 1 пиколя (пМ) до примерно 1 наномля (нМ), от примерно 1 нМ до примерно 1 микроля (μМ) или от примерно 1 μМ до примерно 100 μМ). В одном варианте осуществления ВТЛА-связывающий агент может связываться с белком ВТЛА с KD, меньшей или равной 1 наномоль (например, 0,9 нМ, 0,8 нМ, 0,7 нМ, 0,6 нМ, 0,5 нМ, 0,4 нМ, 0,3 нМ, 0,2 нМ), 0,1 нМ, 0,05 нМ, 0,025 нМ, 0,01 нМ, 0,001 нМ или в соответствии с диапазоном, определяемым любыми двумя из предыдущих значений). В другом варианте осуществления ВТЛА-связывающий агент может связываться с ВТЛА с KD, меньшей или равной 200 пМ (например, 190 пМ, 175 пМ, 150 пМ, 125 пМ, 110 пМ, 100 пМ, 90 пМ, 80 пМ, 75 пМ, 60 пМ, 50 пМ, 40 пМ, 30 пМ, 25 пМ, 20 пМ, 15 пМ, 10 пМ, 5 пМ, 1 пМ или в соответствии с диапазоном, определяемым любыми двумя из предыдущих значений). Аффинность иммуноглобулина к интересующему антигену или эпитопу можно измерить с помощью любого известного в данной области анализа. Такие методы включают, например, сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS), разделяемые гранулы (например, магнитные гранулы), поверхностный плазмонный резонанс (SPR), конкуренцию в фазе раствора (KINEXA™), пэннинг антигенов, конкурентные анализы связывания и/или ИФА (см., например, Janeway et al. (eds.), *Immunobiology*, 5th ed., Garland Publishing, New York, NY, 2001). В некоторых вариантах осуществления ВТЛА-связывающий агент имеет аффинность к ВТЛА, как описано выше (например, 1 нМ или меньше или 200 пМ или меньше) при измерении с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR). В некоторых вариантах осуществления ВТЛА-связывающий агент имеет аффинность к ВТЛА, как описано выше (например, 1 нМ или меньше или 200 пМ или меньше) при измерении с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

[0080] Предложенный в настоящем описании ВТЛА-связывающий агент можно использовать для любых целей, таких как модулирование (например, стимуляция или усиление) передачи сигналов ВТЛА у млекопитающего, модулирование (например, ингибирование) иммунного ответа у млекопитающего и/или лечение или предотвращение заболевания или состояния, связанного с дефицитом передачи сигналов ВТЛА (например, связанное с ВТЛА-опосредованным иммунным ответом). Таким образом, в одном аспекте

изобретение относится к способу стимуляции или усиления передачи сигналов ВТЛА у млекопитающего, включающему введение млекопитающему ВТЛА-связывающего агента, при этом ВТЛА-связывающий агент способствует или усиливает связывание ВТЛА с HVEM или иным образом способствует или усиливает передачу сигналов ВТЛА.

[0081] Млекопитающее может быть млекопитающим, имеющим заболевание или состояние, связанное с дефицитом передачи сигналов ВТЛА или связанное с ВТЛА-опосредованным иммунным ответом. Например, млекопитающее может иметь заболевание или состояние, которое улучшается за счет иммуносупрессии. Такое заболевание будет реагировать на агонизм ВТЛ, так что введение ВТЛА-связывающего агента млекопитающему будет лечить или предотвращать заболевание или состояние. Заболевание, состояние или расстройство, связанное с передачей сигналов ВТЛА и реагирующее на агонизм ВТЛА, может быть любым заболеванием или расстройством, при котором повышение активности ВТЛА имеет терапевтический эффект у млекопитающих, предпочтительно у человека, или недостаточная экспрессия или снижение активности ВТЛА вызывает или способствует патологическим эффектам заболевания или расстройства. Безотносительно к какой-либо теории или механизму действия, полагают, что ВТЛА-связывающий агент облегчает иммуносупрессивную передачу сигналов ВТЛА-HVEM и, таким образом, подавляет иммунный ответ.

[0082] «Иммунный ответ» может включать, например, выработку антител и/или активацию иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток), выработку воспалительных цитокинов или любые признаки или нарушения, описанные в настоящем документе или иным образом известные в данной области. Используемые в настоящем описании термины «лечение» и т. п. относятся к получению желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Предпочтительно эффект является терапевтическим, т. е. эффект частично или полностью излечивает заболевание и/или неблагоприятный симптом, связанный с заболеванием. С этой целью способ по изобретению включает введение «терапевтически эффективного количества» ВТЛА-связывающего агента. «Терапевтически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, возраст, пол и масса индивидуума, а также способности ВТЛА-связывающего агента вызывать желаемый ответ у индивидуума.

[0083] Альтернативно, фармакологический и/или физиологический эффект может быть профилактическим, т. е. эффект полностью или частично предотвращает заболевание или его симптом. В этом отношении способ по изобретению включает введение «профилактически эффективного количества» ВТЛА-связывающего агента. «Профилактически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого профилактического результата (например, предотвращения начала заболевания).

[0084] ВТЛА-связывающий агент применим для подавления иммунного ответа на антиген и лечения любого заболевания или состояния, связанного с аномальным или чрезмерным иммунным ответом. Заболевание или расстройство может быть воспалительным или аутоиммунным расстройством. Примеры воспалительных или аутоиммунных заболеваний включают, например, инфекции (вирусные, бактериальные, грибковые и паразитарные), эндотоксический шок, связанный с инфекцией, артрит, ревматоидный артрит, астму, хроническую обструктивную болезнь легких (COPD), воспалительное заболевание органов малого таза, болезнь Бехчета, Болезнь Альцгеймера, воспалительные заболевания кишечника, включая болезнь Крона и язвенный колит, болезнь Пейрони, глютеновую болезнь, заболевание желчного пузыря, пилонидальную болезнь, перитонит, псориаз, псориатический артрит, васкулит, васкулит, ассоциированный с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA), хирургические спайки, инсульт, Диабет I типа, болезнь Лайма, артрит, менингоэнцефалит, аутоиммунный увеит, иммуноопосредованные воспалительные заболевания центральной и периферической нервной системы, такие как рассеянный склероз, волчанка (например, системная красная волчанка и хроническая дискоидная красная волчанка) и синдром Гийена-Барра, атопический дерматит, полимиозит, дерматомиозит, аутоиммунный гепатит, фиброзирующий альвеолит, болезнь Грейвса, IgA-нефропатия, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, болезнь Меньера, пузырчатка, пемфигоид, первичный билиарный холангит, гепатит, саркоидоз, склеродермия (локализованная склеродермия, системная склеродермия и прогрессирующая системная склеродермия), Гангуломатоз с полиангиитом, другие аутоиммунные заболевания, холангит, панкреатит, травму (операцию), реакцию «трансплантат против хозяина», отторжение трансплантата, болезни сердца, включая ишемические заболевания, такие как инфаркт миокарда, а также атеросклероз, узелковый периартериит (узелковый полиартериит и микроскопический полиангиит), аллергический гранулематозный ангиит, гиперчувствительный ангиит, синдром аортита (артериит Такаясу), височный артериит, внутрисосудистое свертывание крови, резорбцию кости, остеопороз, остеоартрит, пародонтит и гипохлоргидию, болезнь Стилла, синдром Когана, RS3PE, ревматическую полимиалгию, синдром фибромиалгии, синдром антифосфолипидных антител, эозинофильный фасциит, синдром Гийена-Барре, тяжелую миастению, хронический атрофический гастрит, синдром Гудпасчера, быстро прогрессирующий гломерулонефрит, мегалобластную анемию, гемолитическую анемию, аутоиммунную нейтропению, тиреоидит Хашимото, аутоиммунную надпочечниковую недостаточность, первичный гипотиреоз, идиопатическую болезнь Аддисона (хроническая недостаточность надпочечников), герпес беременных, Линейный IgA-зависимый буллезный дерматоз, приобретенный буллезный эпидермолиз, очаговую алопецию, витилиго, болезнь Харада, аутоиммунную оптическую нейропатию, идиопатическую азооспермию, рецидивирующую потерю плода или бесплодие, связанное с отсутствием толерантности плода к матери.

[0085] В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство

представляет собой артрит (например, ревматоидный артрит или рефрактерный к TNF ревматоидный артрит), гигантоклеточный артериит, ревматическую полимиалгию, первичный синдром Шегрена, очаговую алопецию, первичный билиарный холангит (PBC), витилиго, ANCA- васкулит, Диабет 1 типа, неинфекционный увеит, псориаз, реакцию «трансплантат против хозяина» (GvHD) или воспалительное заболевание кишечника.

[0086] Используемый в настоящем описании термин «лечение» и т. п. относится к получению желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Предпочтительно эффект является терапевтическим, т. е. эффект частично или полностью излечивает заболевание и/или облегчает в какой-либо степени неблагоприятный симптом, связанный с заболеванием. С этой целью способ по изобретению включает введение «терапевтически эффективного количества» BTLA-связывающего агента. «Терапевтически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, возраст, пол и масса индивидуума, а также способности BTLA-связывающего агента вызывать желаемый ответ у индивидуума. Например, терапевтически эффективным количеством BTLA-связывающего агента по изобретению является количество, которое повышает биоактивность BTLA у человека.

[0087] Альтернативно, фармакологический и/или физиологический эффект может быть профилактическим, т. е. эффект полностью или частично предотвращает заболевание или его симптом. В этом отношении способ по изобретению включает введение «профилактически эффективного количества» BTLA-связывающего агента. «Профилактически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого профилактического результата (например, предотвращения начала заболевания).

[0088] BTLA-связывающий агент может быть частью композиции, подходящей для введения млекопитающему. Предпочтительно композиция представляет собой фармацевтически приемлемую (например, физиологически приемлемую) композицию, которая содержит носитель, предпочтительно фармацевтически приемлемый (например, физиологически приемлемый) носитель, и аминокислотные последовательности по изобретению, антигенсвязывающий агент или вектор. В контексте изобретения можно использовать любой подходящий носитель, и такие носители хорошо известны в данной области техники. Выбор носителя будет частично определяться конкретным местом, в которое можно вводить композицию, и конкретным методом, используемым для введения композиции. Композиция также может содержать любое другое вспомогательное вещество, используемое в составе терапевтических молекул (например, белков или антител), в частности, составов для парентерального введения, включая, например, буферы, модификаторы тоничности, стабилизаторы, поверхностно-активные вещества и т.

п. Композиция необязательно может быть стерильной. Композиция может быть заморожена или лиофилизована для хранения и восстановлена в подходящем стерильном носителе перед использованием. Композиции могут быть получены в соответствии с обычными способами, описанными, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2001).

[0089] Типичная доза может составлять, например, от 1 мкг/кг до 20 мг/кг массы тела животного или человека; однако дозы ниже или выше этого примерного диапазона входят в объем изобретения. Суточная доза для парентерального введения может составлять от примерно 0,00001 мкг/кг до примерно 20 мг/кг общей массы тела (например, примерно 0,001 мкг/кг, примерно 0,1 мкг/кг, примерно 1 мкг/кг, примерно 5 мкг/кг, примерно 10 мкг/кг, примерно 100 мкг/кг, примерно 500 мкг/кг, примерно 1 мг/кг, примерно 5 мг/кг, примерно 10 мг/кг или диапазон, определяемый любыми двумя из предыдущих значений), предпочтительно примерно от 0,1 мкг/кг до примерно 10 мг/кг общей массы тела (например, примерно 0,5 мкг/кг, примерно 1 мкг/кг, примерно 50 мкг/кг, примерно 150 мкг/кг, примерно 300 мкг/кг, примерно 750 мкг/кг, примерно 1,5 мг/кг, примерно 5 мг/кг или диапазон, определяемый любыми двумя из предыдущих значений), более предпочтительно примерно от 1 мкг/кг до 5 мг/кг общей массы тела (например, примерно 3 мкг/кг, примерно 15 мкг/кг, примерно 75 мкг/кг, примерно 300 мкг/кг, примерно 900 мкг/кг, примерно 2 мг/кг, примерно 4 мг/кг или диапазон, определяемый любыми двумя из предыдущих значений), и еще более предпочтительно примерно от 0,5 до 15 мг/кг массы тела в сутки (например, примерно 1 мг/кг, примерно 2,5 мг/кг, примерно 3 мг/кг, примерно 6 мг/кг, примерно 9 мг/кг, примерно 11 мг/кг, примерно 13 мг/кг или диапазон, определяемый любыми двумя из предыдущих значений). Терапевтическую или профилактическую эффективность можно контролировать путем периодической оценки пациентов, получающих лечение. При повторных введениях в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение можно повторять до тех пор, пока не произойдет желаемое подавление симптомов заболевания, или, альтернативно, лечение можно продолжать в течение всей жизни пациента. Однако могут быть полезны и другие режимы дозирования, которые входят в объем изобретения. Желаемая доза может быть введена однократным болюсным введением композиции, многократным болюсным введением композиции или непрерывным инфузионным введением композиции.

[0090] Введение можно осуществлять с использованием любых стандартных способов введения, включая пероральное, внутривенное, внутрибрюшинное, подкожное, легочное, чрескожное, внутримышечное, интраназальное, трансбуккальное, подъязычное введение или введение в виде суппозиториев. Композиция предпочтительно пригодна для парентерального введения. Термин «парентеральный», используемый в настоящем описании, включает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное и внутрибрюшинное введение. Более предпочтительно композицию вводят млекопитающему с использованием периферической системной доставки путем внутривенной, внутрибрюшинной или подкожной инъекции.

[0091] После введения млекопитающему (например, человеку) биологическая активность ВТЛА-связывающего агента может быть измерена любым подходящим методом, известным в данной области. Биологическая активность может коррелировать со стабильностью ВТЛА-связывающего агента в организме. В одном варианте осуществления изобретения ВТЛА-связывающий агент (например, антитело) имеет период полужизни *in vivo* от примерно 30 минут до 45 дней (например, примерно 30 минут, примерно 45 минут, примерно 1 час, примерно 2 часа, примерно 4 часов, примерно 6 часов, примерно 10 часов, примерно 12 часов, примерно 1 день, примерно 5 дней, примерно 10 дней, примерно 15 дней, примерно 25 дней, примерно 35 дней, примерно 40 дней, примерно 45 дней или диапазон, определяемый любыми двумя из предыдущих значений). В другом варианте осуществления ВТЛА-связывающий агент имеет период полужизни *in vivo* от примерно 2 часов до 20 дней (например, примерно 5 часов, примерно 10 часов, примерно 15 часов, примерно 20 часов, примерно 2 дня, примерно 3 дня, примерно 7 дней, примерно 12 дней, примерно 14 дней, примерно 17 дней, примерно 19 дней или диапазон, определяемый любыми двумя из предыдущих значений). В другом варианте осуществления ВТЛА-связывающий агент имеет период полужизни *in vivo* от примерно 10 дней до примерно 40 дней (например, примерно 10 дней, примерно 13 дней, примерно 16 дней, примерно 18 дней, примерно 20 дней, примерно 23 дня, примерно 26 дней, примерно 29 дней, примерно 30 дней, примерно 33 дня, примерно 37 дней, примерно 38 дней, примерно 39 дней, примерно 40 дней или диапазон, определяемый любыми двумя из предыдущих значений).

[0092] ВТЛА-связывающий агент по изобретению можно вводить отдельно или в комбинации с другими лекарственными средствами. Например, ВТЛА-связывающий агент можно вводить в комбинации с другими агентами для лечения или предотвращения заболеваний, описанных в настоящем документе, такими как другие противовоспалительные или иммуносупрессивные агенты. В этом отношении, например, ВТЛА-связывающий агент можно использовать в комбинации по меньшей мере с одним другим агентом, включая, например, любой противовоспалительный агент, известный в данной области, глюкокортикоиды, низкомолекулярные иммуносупрессивные агенты, вакцины, биологические методы лечения (например, другие моноклональные антитела, вирусы, генная терапия и адоптивный перенос Т-клеток) и/или хирургическое вмешательство. Когда способом по изобретению лечат инфекционное заболевание, ВТЛА-связывающий агент можно вводить в комбинации по меньшей мере с одним антибактериальным агентом или по меньшей мере с одним противовирусным агентом. В этом отношении антибактериальным агентом может быть любой подходящий антибиотик, известный в данной области. Противовирусным агентом может быть любая вакцина любого подходящего типа, которая специфически нацелена на конкретный вирус (например, живые аттенуированные вакцины, субъединичные вакцины, рекомбинантные векторные вакцины) и любая низкомолекулярная противовирусная терапия (например, ингибиторы репликации вируса и нуклеозидные аналоги).

[0093] В дополнение к терапевтическим применениям BTLA-связывающий агент, описанный в настоящем документе, можно использовать в диагностических или исследовательских целях. В этом отношении BTLA-связывающий агент может быть использован в способе диагностики расстройства или заболевания, при котором неправильная экспрессия (например, недостаточная экспрессия) или сниженная активность BTLA вызывает или способствует патологическим эффектам заболевания или расстройства. Аналогичным образом BTLA-связывающий агент можно использовать в анализе для мониторинга уровня белка BTLA у пациента, проходящего тестирование на заболевание или расстройство, которое реагирует на стимулирование BTLA. К числу исследовательских применений относятся, например, методы, в которых используется BTLA-связывающий агент и метка для детектирования белка BTLA в образце, например, в жидкости организма человека или в экстракте клеток или тканей. BTLA-связывающий агент можно использовать с модификацией или без нее, такой как ковалентное или нековалентное мечение детектируемым фрагментом. Например, детектируемый фрагмент может представлять собой радиоизотоп (например, ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I), флуоресцентное или хемилюминесцентное соединение (например, флуоресцеинизотиоцианат, родамин или люциферин), фермент (например, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза, или пероксидаза хрена), или простетические группы. Любой способ, известный в данной области, для отдельной конъюгации антигенсвязывающего агента (например, антитела) с детектируемым фрагментом может быть использован в контексте изобретения (см., например, Hunter et al., *Nature*, 194: 495-496). (1962); David et al., *Biochemistry*, 13:1014-1021 (1974); Pain et al., *J. Immunol. Meth.*, 40: 219-230 (1981); и Nygren, *J. Histochem. и Cytochem.*, 30: 407-412 (1982)).

[0094] Уровень белка BTLA можно измерить с использованием BTLA-связывающего агента, предложенного в настоящем документе, любым подходящим способом, известным в данной области. Такие способы включают, например, радиоиммуноанализ (RIA) и FACS. Нормальные или стандартные значения экспрессии BTLA можно установить с помощью любого подходящего метода, например, путем объединения образца, содержащего или предположительно содержащего BTLA, с BTLA-специфическим антителом в условиях, подходящих для образования комплекса антиген-антитело. Антитело прямо или косвенно метят детектируемым веществом для облегчения детектирования связанного или несвязанного антитела. Подходящие детектируемые вещества включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы и радиоактивные материалы (см., например, Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc. (1987)). Затем количество полипептида BTLA, экспрессированного в образце, сравнивают со стандартным значением.

[0095] Безотносительно к какой-либо конкретной теории или механизму действия, считается, что введение BTLA-связывающего агента, как описано в настоящем документе, вызывает выделение BTLA, по крайней мере, из некоторых клеток, на которых он

экспрессируется, что приводит к увеличению уровня растворимого BTLA (sBTLA), присутствующего в крови, плазме, сыворотке или ткани (например, ткани кожи) пациента, которому вводят BTLA-связывающий агент. Таким образом, в настоящем описании предложен способ (например, способ *in vitro*) детектирования, измерения или мониторинга фармакологической активности BTLA-связывающего агента у пациента, включающий детектирование растворимого BTLA (sBTLA) в образце крови, плазмы, сыворотки или ткани (например, ткани кожи) пациента, которому был введен BTLA-связывающий агент. В настоящем описании также предложен способ выбора пациента для лечения BTLA-связывающим агентом, путем детектирования или измерения (например, *in vitro*) sBTLA в образце крови, плазмы, сыворотки или ткани (например, ткани кожи) пациента, где пациента выбирают для лечения, когда уровень sBTLA повышен по сравнению с нормальным, не больным пациентом того же типа. sBTLA можно детектировать и, необязательно, количественно определить с помощью любого из нескольких способов, известных в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления sBTLA выявляют путем контакта образца крови, плазмы, сыворотки или ткани пациента (например, *in vitro*) с BTLA-связывающим агентом, предложенным в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления sBTLA, обнаруженный в образце крови, плазмы, сыворотки или ткани субъекта, связан с BTLA-связывающим агентом (например, ранее введенным BTLA-связывающим агентом).

[0096] В некоторых вариантах осуществления BTLA-связывающий агент, вводимый пациенту, который вызывает выделение BTLA у пациента, представляет собой BTLA-связывающий агент, который не ингибирует связывание BTLA с HVEM. BTLA-связывающий агент может представлять собой любой BTLA-связывающий агент, такой как любой из BTLA-связывающих агентов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления BTLA-связывающий агент содержит переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина любой из SEQ ID NO: 1-15, 207, 208, 217 или 218, или по меньшей мере ее CDR, или аминокислотную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90% идентичности последовательности; и переменную область легкой цепи иммуноглобулина любой из SEQ ID NO: 16-25, 209, 210, 219 или 220, или по меньшей мере ее CDR; или аминокислотную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90% идентичности последовательности. Например, BTLA-связывающий агент может содержать CDR, представленные SEQ ID NO: 27, 30, 32, 36, 39 и 41. В других вариантах осуществления BTLA-связывающий агент содержит переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина любой из SEQ ID NO: 43-156 или по меньшей мере ее CDR; или аминокислотную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90% идентичности последовательности; и переменную область легкой цепи иммуноглобулина любой из SEQ ID NO: 157-192 или, по меньшей мере, ее CDR; или аминокислотную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90% идентичности последовательности; имеющие любые или все другие признаки, описанные в настоящем документе. Например, BTLA-связывающий агент может содержать CDR,

представленные SEQ ID NO: 195-200; например, BTLA-связывающий агент, содержащий CDR, содержащие SEQ ID NO: 201-206, или содержащий тяжелые и легкие цепи Ig с SEQ ID NO: 193 и 194, или SEQ ID NO: 144 и 174, или по меньшей мере их CDR, или тяжелые и легкие цепи Ig, имеющие 90% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 193 и 194 или SEQ ID NO: 144 и 174, соответственно.

[0097] В некоторых вариантах осуществления sBTLA в крови, плазме, сыворотке или ткани (например, ткани кожи) пациента, которому вводили BTLA, детектируют с помощью захватывающего антитела, которое связывается с sBTLA. Захватывающее антитело может быть любым антителом, которое связывается с BTLA. В некоторых вариантах осуществления захватывающее антитело представляет собой антитело против BTLA, предложенное в настоящем описании. Захватывающее антитело может быть таким же или отличным от BTLA-связывающего агента, вводимого пациенту. В некоторых вариантах осуществления захватывающее антитело sBTLA отличается от BTLA-связывающего агента, вводимого пациенту. В некоторых вариантах осуществления захватывающее антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую любую из SEQ ID NO: 1-15, 207, 208, 217 или 218, или по меньшей мере ее CDR, или аминокислотную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90% идентичности последовательности; и переменную область легкой цепи, содержащую любую из SEQ ID NO: 16-25, 209, 210, 219 или 220, или по меньшей мере ее CDR, или аминокислотную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90% идентичности последовательности; имеющие любые или все другие признаки, описанные в настоящем документе. В дополнительных вариантах осуществления захватывающее антитело может содержать CDR 1-3 тяжелой цепи, представленные SEQ ID NO: 27, 30 и 32; и CDR 1-3 легкой цепи, представленные SEQ ID NO: 36, 39 и 41; или любую из более конкретно указанных CDR, представленных в настоящем описании. Например, захватывающее антитело может содержать тяжелую цепь Ig с SEQ ID NO: 26 (например, любую из SEQ ID NO: 1-15, 207, 208, 217 или 218) и легкую цепь Ig с SEQ ID NO: 35 (например, любую из SEQ ID NO: 16-25, 209, 210, 219 или 220). Необязательно, в комбинации с такими вариантами осуществления BTLA-связывающий агент, вводимый пациенту, может содержать переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина любой из SEQ ID NO: 43-156 или, по меньшей мере, ее CDR; или аминокислотную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90% идентичности последовательности; и переменную область легкой цепи иммуноглобулина любой из SEQ ID NO: 157-192 или, по меньшей мере, ее CDR; или аминокислотную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90% идентичности последовательности; имеющие любые или все другие признаки, описанные в настоящем документе. Например, BTLA-связывающий агент может содержать CDR, представленные SEQ ID NO: 195-200; например, BTLA-связывающий агент, содержащий CDR, содержащие SEQ ID NO: 201-206, или содержащие тяжелые и легкие цепи Ig с SEQ ID NO: 193 и 194 или SEQ ID NO: 144 и 174.

[0098] Безотносительно к какой-либо теории или механизму действия, полагают, что связывание BTLA (или sBTLA) с антителом, которое не ингибирует связывание BTLA с HVEM, как описано в настоящем документе, усиливает связывание захватывающего антитела с sBTLA. Таким образом, в настоящем описании также предложен анализ для детектирования и/или количественного определения sBTLA в крови, плазме, сыворотке или ткани (например, ткани кожи), способ, включающий контакт с образцом крови, плазмы, сыворотки или ткани (например, ткани кожи) с захватывающим антителом и BTLA-связывающим агентом, который не ингибирует связывание BTLA с HVEM. В некоторых вариантах осуществления BTLA-связывающий агент, который не ингибирует связывание BTLA с HVEM, представляет собой BTLA-связывающий агент, который содержит переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина любой из SEQ ID NO: 43-156 или по меньшей мере ее CDR; или аминокислотную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90% идентичности последовательности; и переменную область легкой цепи иммуноглобулина любой из SEQ ID NO: 157-192 или, по меньшей мере, ее CDR; или аминокислотную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90% идентичности последовательности; имеющие любые или все другие признаки, описанные в настоящем документе. Например, BTLA-связывающий агент может содержать CDR, представленные SEQ ID NO: 195-200; например, BTLA-связывающий агент, содержащий CDR, содержащие SEQ ID NO: 201-206, или содержащий тяжелые и легкие цепи Ig с SEQ ID NO: 193 и 194 или SEQ ID NO: 144 и 174. В некоторых вариантах осуществления захватывающее антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую любую из SEQ ID NO: 1-15, 207, 208, 217 или 218, или по меньшей мере ее CDR, или аминокислотную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90% идентичности последовательности; и переменную область легкой цепи, содержащую любую из SEQ ID NO: 16-25, 209, 210, 219 или 220, или по меньшей мере ее CDR, или аминокислотную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90% идентичности последовательности; имеющие любые или все другие признаки, описанные в настоящем документе. Например, захватывающее антитело может содержать CDR 1-3 тяжелой цепи, представленные SEQ ID NO: 27, 30 и 32; и CDR 1-3 легкой цепи, представленные SEQ ID NO: 36, 39 и 41; или любую из более конкретно указанных CDR, представленных в настоящем документе. Например, захватывающее антитело может содержать тяжелую цепь Ig с SEQ ID NO: 26 (например, любую из SEQ ID NO: 1-15, 207, 208, 217 или 218) и легкую цепь Ig с SEQ ID NO: 35 (например, любую из SEQ ID NO: 16-25, 209, 210, 219 или 220).

[0099] В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных способов детектирования, измерения или квалификации sBTLA в крови, плазме, сыворотке или ткани способ может дополнительно включать сравнение концентрации sBTLA в образце крови, плазмы, сыворотки или ткани с эталонной концентрацией sBTLA. Может быть использована любая подходящая эталонная концентрация. В некоторых вариантах осуществления эталонная концентрация sBTLA представляет собой концентрацию sBTLA

в образце крови, плазмы, сыворотки или ткани того же пациента или объекта до введения ВТЛА-связывающего агента. В качестве альтернативы или в дополнение эталонная концентрация sBTLA может быть обеспечена концентрацией sBTLA в крови, плазме, сыворотке или ткани другого объекта, например, нормального, здорового объекта того же типа, который не получал введение ВТЛА-связывающего агента или контрольную концентрацию sBTLA, установленную путем статистического анализа концентрации sBTLA в крови, плазме, сыворотке или ткани популяции таких объектов (например, средняя концентрация sBTLA в образце крови, плазмы, сыворотки или ткани из такой популяции нормальных здоровых объектов, не получавших лечение ВТЛА-связывающим агентом). В некоторых вариантах осуществления эталонная концентрация sBTLA устанавливается способом, включающим контакт образца крови, плазмы, сыворотки или ткани пациента или образцов крови, плазмы, сыворотки или ткани из популяции пациентов с захватывающим антителом, как описано выше; необязательно также приведение образца крови, плазмы, сыворотки или ткани в контакт с ВТЛА-связывающим агентом, который не ингибирует связывание ВТЛА с HVEM, как описано в настоящем документе, одновременно или последовательно в любом порядке.

[0100] В других вариантах осуществления способ включает сравнение концентрации sBTLA в образце крови, плазмы, сыворотки или ткани от пациента, которому был введен ВТЛА-связывающий агент, с концентрацией sBTLA в образце крови, плазмы, сыворотки или ткани того же пациента в другой момент времени либо до, либо после введения пациенту ВТЛА-связывающего агента. Например, концентрацию sBTLA можно измерить в два или более моментов времени после введения ВТЛА-связывающего агента и сравнить для оценки эффекта ВТЛА-связывающего агента с течением времени, необязательно с одним или более дополнительными промежуточными введениями ВТЛА-связывающего агента. Таким образом, можно контролировать лечение с использованием ВТЛА-связывающего агента.

[0101] Кроме того, в настоящем описании предложена композиция, содержащая ВТЛА-связывающий агент, который не ингибирует связывание ВТЛА с HVEM, и второе захватывающее антитело, которое связывается с sBTLA, которое полезно в вышеупомянутых способах детектирования, измерения или мониторинга sBTLA в крови, плазме, сыворотке или ткани. В некоторых вариантах осуществления ВТЛА-связывающий агент, который не ингибирует связывание ВТЛА с HVEM, содержит переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина любой из SEQ ID NO: 43-156 или, по меньшей мере, ее CDR; или аминокислотную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90% идентичности последовательности; и переменную область легкой цепи иммуноглобулина любой из SEQ ID NO: 157-192 или, по меньшей мере, ее CDR; или аминокислотную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90% идентичности последовательности; имеющие любые или все другие признаки, описанные в настоящем документе. Например, ВТЛА-связывающий агент может содержать CDR, представленные SEQ ID NO: 195-200; например, ВТЛА-связывающий агент, содержащий

CDR, содержащие SEQ ID NO: 201-206, или содержащие тяжелые и легкие цепи Ig с SEQ ID NO: 193 и 194 или SEQ ID NO: 144 и 174. В некоторых вариантах осуществления захватывающее антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую любую из SEQ ID NO: 1-15, 207, 208, 217 или 218, или по меньшей мере ее CDR, или аминокислотную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90% идентичности последовательности; и переменную область легкой цепи, содержащую любую из SEQ ID NO: 16-25, 209, 210, 219 или 220, или по меньшей мере ее CDR, или аминокислотную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90% идентичности последовательности; имеющие любые или все другие признаки, описанные в настоящем документе. Например, захватывающее антитело может содержать CDR 1-3 тяжелой цепи, представленные SEQ ID NO: 27, 30 и 32; и CDR 1-3 легкой цепи, представленные SEQ ID NO: 36, 39 и 41; или любую из более конкретно указанных CDR, представленных в настоящем документе. Например, захватывающее антитело может содержать тяжелую цепь Ig с SEQ ID NO: 26 (например, любую из SEQ ID NO: 1-15, 207, 208, 217 или 218) и легкую цепь Ig с SEQ ID NO: 35 (например, любую из SEQ ID NO: 16-25, 209, 210, 219 или 220).

[0102] ВТЛА-связывающий агент, захватывающее антитело или композиция могут поставляться в наборе, то есть в виде упакованной комбинации реагентов в заранее определенных количествах с инструкциями по проведению диагностического анализа. Если ВТЛА-связывающий агент помечен ферментом, желательно, чтобы набор включал субстраты и кофакторы, необходимые для фермента (например, предшественник субстрата, который обеспечивает детектируемый хромофор или флуорофор). Кроме того, в набор могут быть включены другие добавки, такие как стабилизаторы, буферы (например, блокирующий буфер или лизирующий буфер) и т. п. Относительные количества различных реагентов можно варьировать, чтобы обеспечить концентрации реагентов в растворе, которые существенно оптимизируют чувствительность анализа. Реагенты могут поставляться в виде сухих порошков (обычно лиофилизированных), включая вспомогательные вещества, которые при растворении образуют раствор реагента соответствующей концентрации.

Нуклеиновые Кислоты

[0103] Изобретение также относится к одной или более нуклеиновым кислотам, которые кодируют полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина, полипептид легкой цепи иммуноглобулина и ВТЛА-связывающий агент по настоящему изобретению.

[0104] Подразумевается, что термин «последовательность нуклеиновой кислоты» охватывает полимер ДНК или РНК, то есть полинуклеотид, который может быть одноцепочечным или двухцепочечным и который может содержать неприродные или измененные нуклеотиды. Термины «нуклеиновая кислота» и «полинуклеотид», используемые в настоящем описании, относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, либо рибонуклеотидов (РНК), либо дезоксирибонуклеотидов (ДНК). Эти термины относятся к первичной структуре молекулы и, таким образом, включают двух- и

одноцепочечную ДНК, а также двух- и одноцепочечную РНК. Термины включают, в качестве эквивалентов, аналоги либо РНК, либо ДНК, полученные из аналогов нуклеотидов и модифицированных полинуклеотидов, таких как, но не ограничиваясь ими, метилированные и/или кэпированные полинуклеотиды. Нуклеиновые кислоты обычно связаны фосфатными связями с образованием последовательностей нуклеиновых кислот или полинуклеотидов, хотя в данной области известны многие другие связи (например, фосфоротиоаты, боранофосфаты и т. п.).

[0105] Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина, полипептид легкой цепи иммуноглобулина или BTLA-связывающий агент, может быть частью вектора. Вектор может представлять собой, например, плазмиду, эписому, космиду, вирусный вектор (например, ретровирусный или аденовирусный) или фаг. Подходящие векторы и способы получения векторов хорошо известны в данной области (см., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 3-е издание, Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001), и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, New York, N.Y. (1994)).

[0106] Вектор обычно содержит последовательности, регулирующие экспрессию, такие как промотор, энхансер, сигнал полиаденилирования, терминатор транскрипции, сигнальный пептид (например, сигнальный пептид остеоонектина), внутренний сайт посадки рибосомы (IRES) и т. п., которые обеспечивают экспрессию кодирующей последовательности в клетке-хозяине. Типичные последовательности контроля экспрессии известны в данной области и описаны, например, в Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Vol. 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990).

[0107] В данной области техники хорошо известно большое количество промоторов, включая конститутивные, индуцируемые и репрессируемые промоторы, из множества различных источников. Репрезентативные источники промоторов включают, например, вирусы, млекопитающих, насекомых, растения, дрожжи и бактерии, и подходящие промоторы из этих источников легко доступны или могут быть получены синтетическим путем на основе общедоступных последовательностей, например, из депозитариев, таких как ATCC, а также из других коммерческих или индивидуальных источников. Промоторы могут быть однонаправленными (т. е. инициировать транскрипцию в одном направлении) или двунаправленными (т. е. инициировать транскрипцию либо в 3'-, либо в 5'-направлении). Неограничивающие примеры промоторов включают, например, бактериальную систему экспрессии T7, бактериальную систему экспрессии pBAD (araA), промотор цитомегаловируса (CMV), промотор SV40, промотор RSV. Индуцируемые промоторы включают, например, систему Tet (патенты США 5464758 и 5814618), индуцируемую систему экдизонов (No et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93: 3346-3351 (1996)), систему T-REX™ (Invitrogen, Carlsbad, CA), систему LACSWITCH™ (Stratagene, San Diego, CA) и систему рекомбиназы, индуцируемую тамоксифеном Cre-ERT (Indra et al., *Nuc. Acid. Res.*, 27: 4324-4327 (1999); *Nuc. Acid. Res.*,

28: e99 (2000); Патент США 7112715; и Kramer & Fussenegger, *Methods Mol. Biol.*, 308: 123-144 (2005)).

[0108] Термин «энхансер», используемый в настоящем описании, относится к последовательности ДНК, которая увеличивает транскрипцию, например, последовательности нуклеиновой кислоты, с которой она функционально связана. Энхансеры могут располагаться на расстоянии многих тысяч пар оснований от кодирующей области последовательности нуклеиновой кислоты и могут опосредовать связывание регуляторных факторов, профили метилирования ДНК или изменения в структуре ДНК. Большое количество энхансеров из множества различных источников хорошо известно в данной области и доступно в виде клонированных полинуклеотидов или внутри них (например, из депозитариев, таких как АТСС, а также из других коммерческих или индивидуальных источников). Ряд полинуклеотидов, содержащих промоторы (такие как широко используемый промотор CMV), также содержат энхансерные последовательности. Энхансеры могут быть расположены выше, внутри или ниже кодирующих последовательностей.

[0109] Вектор также может содержать «ген маркера селекции». Термин «ген маркера селекции», используемый в настоящем описании, относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая позволяет клеткам, экспрессирующим последовательность нуклеиновой кислоты, быть специфически отобранными так или иначе в присутствии соответствующего селективного агента. Подходящие гены маркеров селекции известны в данной области и описаны, например, в публикациях международных патентных заявок WO 1992/008796 и WO 1994/028143; Wigler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 3567-3570 (1980); O'Hare et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 1527-1531 (1981); Mulligan & Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 2072-2076 (1981); Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.*, 150: 1-14 (1981); Santerre et al., *Gene*, 30: 147-156 (1984); Kent et al., *Science*, 237: 901-903 (1987); Wigler et al., *Cell*, 11: 223-232 (1977); Szybalska & Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 48: 2026-2034 (1962); Lowy et al., *Cell*, 22: 817-823 (1980); и Патенты США 5122464 и 5770359.

[0110] В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой «эписомный экспрессирующий вектор» или «эписому», который способен реплицироваться в клетке-хозяине и сохраняется в виде внехромосомного сегмента ДНК в клетке-хозяине в присутствии соответствующего селективного давления (см. например, Conese et al., *Gene Therapy*, 11: 1735-1742 (2004)). Репрезентативные коммерчески доступные эписомные экспрессирующие векторы включают, но не ограничиваются ими, эписомные плазмиды, которые используют ядерный антиген 1 Эпштейна-Барр (EBNA1) и точку начала репликации вируса Эпштейна-Барр (EBV) (oriP). Векторы pREP4, pCER4, pREP7 и pcDNA3.1 от Invitrogen (Карлсбад, Калифорния) и pBK-CMV от Stratagene (Ла-Хойя, Калифорния) представляют собой неограничивающие примеры эписомных векторов, которые используют Т-антиген и точку начала репликации SV40 вместо EBNA1 и oriP.

[0111] Другие подходящие векторы включают интегрирующие экспрессирующие векторы, которые могут случайным образом интегрироваться в ДНК клетки-хозяина или могут включать сайт рекомбинации для обеспечения специфической рекомбинации между экспрессирующим вектором и хромосомой клетки-хозяина. Такие интегрирующие экспрессирующие векторы могут использовать эндогенные последовательности контроля экспрессии хромосом клетки-хозяина для осуществления экспрессии желаемого белка. Примеры векторов, которые интегрируются сайт-специфическим образом, включают, например, компоненты системы flp-in от Invitrogen (Карлсбад, Калифорния) (например, pcDNATM5/FRT) или систему cre-lox, например, присутствует в основных векторах pExchange-6 от Stratagene (La Jolla, CA). Примеры векторов, которые случайным образом интегрируются в хромосомы клетки-хозяина, включают, например, pcDNA3.1 (при введении в отсутствие Т-антигена) от Life Technologies (Карлсбад, Калифорния), UCSE от Millipore (Биллерика, Массачусетс) и pCI или pFN10A (ACT) FLEXITM от Promega (Мэдисон, Висконсин).

[0112] Также можно использовать вирусные векторы. Репрезентативные коммерчески доступные вирусные экспрессирующие векторы включают, но не ограничиваются ими, систему Per.C6 на основе аденовируса, доступную от Crucell, Inc. (Лейден, Нидерланды), pLP1 на основе лентивирусов от Invitrogen (Карлсбад, Калифорния) и ретровирусные векторы pFB-ERV плюс pCFB-EGSH от Stratagene (Лажойя, Калифорния).

[0113] Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие аминокислотные последовательности изобретения, могут быть введены в клетку на одном и том же векторе (т. е. «in cis»). Однонаправленный промотор можно использовать для контроля экспрессии каждой последовательности нуклеиновой кислоты. В другом варианте осуществления можно использовать комбинацию двунаправленных и однонаправленных промоторов для контроля экспрессии множества последовательностей нуклеиновых кислот. Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие аминокислотные последовательности по изобретению, альтернативно могут быть предоставлены популяции клеток на отдельных векторах (т. е. «in trans»). Каждая из последовательностей нуклеиновых кислот в каждом из отдельных векторов может содержать одинаковые или разные последовательности контроля экспрессии. Отдельные векторы могут быть введены в клетки одновременно или последовательно.

[0114] Вектор(ы), содержащий нуклеиновую кислоту(ы), кодирующую аминокислотные последовательности по изобретению, можно вводить в клетку-хозяин, которая способна экспрессировать кодируемые ими полипептиды, включая любую подходящую прокариотическую или эукариотическую клетку. Таким образом, изобретение относится к выделенной клетке, содержащей вектор по изобретению. Предпочтительными клетками-хозяевами являются те, которые можно легко и надежно выращивать, которые имеют достаточно высокие скорости роста, имеют хорошо охарактеризованные системы экспрессии и могут быть легко и эффективно

трансформированы или трансфецированы.

[0115] Примеры подходящих прокариотических клеток включают, но не ограничиваются ими, клетки рода *Bacillus* (такие как *Bacillus subtilis* и *Bacillus brevis*), *Escherichia* (такие как *E. coli*), *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Salmonella* и *Erwinia*. Особенно полезные прокариотические клетки включают различные штаммы *Escherichia coli* (например, K12, HB101 (ATCC № 33694), DH5 α , DH10, MC1061 (ATCC № 53338) и CC102).

[0116] В некоторых вариантах осуществления вектор вводят в эукариотическую клетку. Подходящие эукариотические клетки известны в данной области и включают, например, дрожжевые клетки, клетки насекомых и клетки млекопитающих. Примеры подходящих дрожжевых клеток включают клетки из рода *Kluveromyces*, *Pichia*, *Rhizosporidium*, *Saccharomyces* и *Schizosaccharomyces*. Предпочтительные дрожжевые клетки включают, например, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*.

[0117] Подходящие клетки насекомых описаны, например, в Kitts et al., *Biotechniques*, 14: 810-817 (1993); Lucklow, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 4: 564-572 (1993); и Lucklow et al., *J. Virol.*, 67: 4566-4579 (1993). Предпочтительные клетки насекомых включают Sf-9 и HI5 (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния).

[0118] В некоторых вариантах осуществления в изобретении используются клетки млекопитающих. Ряд подходящих клеток-хозяев млекопитающих известен в данной области, и многие из них доступны из Американской коллекции типовых культур (ATCC, Манассас, Вирджиния). Примеры подходящих клеток млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, клетки яичника китайского хомяка (CHO) (например, клетки CHO-K1, ATCC No. CCL61), клетки CHO DHFR (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 4216-4220 (1980)), эмбриональные клетки почки человека (HEK) 293 или 293T (ATCC No. CRL1573) и клетки 3T3 (ATCC No. CCL92). Другими подходящими клеточными линиями млекопитающих являются COS-1 обезьяны (ATCC No. CRL1650) и клеточные линии COS-7 (ATCC No. CRL1651), а также клеточная линия CV-1 (ATCC No. CCL70). Другие иллюстративные клетки-хозяева млекопитающих включают клеточные линии приматов и клеточные линии грызунов, включая трансформированные клеточные линии. Подходят также нормальные диплоидные клетки, клеточные штаммы, полученные из культуры первичной ткани *in vitro*, а также первичные эксплантаты. Другие подходящие клеточные линии млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, мышинные клетки нейробластомы N2A, HeLa, мышинные клетки L-929 и клеточные линии хомяков ВНК или НаК, каждая из которых доступна в ATCC. Способы выбора подходящих клеток-хозяев млекопитающих и способы трансформации, культивирования, амплификации, скрининга и очистки клеток известны в данной области.

[0119] В одном варианте осуществления клетка млекопитающего представляет собой клетку человека. Например, клетка млекопитающего может представлять собой человеческую лимфоидную клеточную линию или клеточную линию, полученную из нее, такую как клеточная линия пре-B-лимфоцитарного происхождения. Примеры

человеческих лимфоидных клеточных линий включают, без ограничения, RAMOS (CRL-1596), Daudi (CCL-213), EB-3 (CCL-85), DT40 (CRL-2111), 18-81 (Jack et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 1581-1585 (1988)), клетки Raji (CCL-86), клетки PER.C6 (Crucell Holland B.V., Leiden, The Netherlands) и их производные.

[0120] Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность по изобретению, может быть введена в клетку любым подходящим способом, таким как «трансфекция», «трансформация» или «трансдукция». «Трансфекция», «трансформация» или «трансдукция» в контексте настоящего документа относятся к введению одного или более экзогенных полинуклеотидов в клетку-хозяин с использованием физических или химических методов. Многие подходящие методы известны в данной области и включают, например, совместное осаждение ДНК с фосфатом кальция (см., например, Murray E.J. (ed.), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 7, *Gene Transfer and Expression Protocols*, Humana Press (1991)); ДЭАЭ-декстран; электропорацию; трансфекцию, опосредованную катионными липосомами; бомбардировку микрочастицами с помощью частиц вольфрама (Johnston, *Nature*, 346: 776-777 (1990)); и совместное осаждение ДНК с фосфатом стронция (Brash et al., *Mol. Cell Biol.*, 7: 2031-2034 (1987)). Фаговые или вирусные векторы могут быть введены в клетки-хозяева после выращивания инфекционных частиц в подходящих упаковочных клетках, многие из которых имеются в продаже.

[0121] Нуклеиновые кислоты и клетки можно использовать для любых целей, например, для производства описанного в настоящем документе ВТЛА-связывающего агента. В этом отношении изобретение относится к способу получения ВТЛА-связывающего агента, включающему культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелые и/или легкие полипептиды иммуноглобулина ВТЛА-связывающего агента. Другими словами, способ включает экспрессию нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелые и/или легкие цепи иммуноглобулина ВТЛА-связывающего агента, в клетке (например, в клетке *in vitro*, такой как любая из обсуждаемых здесь клеточных линий, включая клетки СНО и СНО-К1). Следует понимать, что тяжелая и легкая цепи иммуноглобулина могут быть экспрессированы из одной нуклеиновой кислоты в данной клетке, или тяжелая и легкая цепи иммуноглобулина могут быть экспрессированы из отдельных нуклеиновых кислот в одной и той же клетке. Способ может дополнительно включать сбор и/или очистку ВТЛА-связывающего агента из клеток или сред для культивирования клеток с использованием известных методов.

[0122] Следующие примеры дополнительно иллюстрируют изобретение, но, конечно, их не следует рассматривать как ограничивающие каким-либо образом его объем.

ПРИМЕРЫ

[0123] В Таблице 2 представлены примеры ВТЛА-связывающих агентов (например, антител или фрагментов антител), содержащих переменные области тяжелой цепи иммуноглобулина с SEQ ID NO: 1-15 и переменные области легкой цепи с SEQ ID NO:

16-25.

Таблица 2

Идентификация Ab	Варибельная область тяжелой цепи	Варибельная область легкой цепи
APE08678	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 16
APE08729	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 16
APE08730	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 18
APE08731	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 17
APE08756	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 18
APE08757	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 16
APE08758	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 18
APE08759	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 16
APE08793	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 17
APE08794	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 17
APE08795	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 18
APE08796	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 17
APE09032	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 19
APE09033	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 19
APE09065	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 21
APE09066	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 20
APE09067	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 17
APE09068	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 17
APE09069	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 17
APE09356	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 21
APE09357	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 17
APE09358	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 17
APE09359	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 21
APE09360	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 17
APE09361	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 21
APE09362	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 21
APE09491	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 19
APE09495	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 19
APE09496	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 17
APE09785	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 19
APE09786	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 17
APE09787	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 19
APE09788	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 17
APE09833	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 19
APE09834	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 23
APE09835	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 22
APE09836	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 23
APE09837	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 22
APE09838	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 23
APE09839	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 22
APE09840	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 17
APE09841	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 19
APE09842	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 17
APE09843	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 19
APE09897	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 25
APE09898	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 24

APE09899	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 25
APE09900	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 24
APE09901	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 25
APE09902	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 24

[0124] Для антител или фрагментов антител в Таблице 2 CDR, пронумерованные по Kabat, являются следующими: CDRH1 расположена в положениях 31-35 соответствующей последовательности VH; CDRH2 расположена в положениях 50-66 соответствующей последовательности VH; CDRH3 расположена в положениях 99-106 соответствующей последовательности VH; CDRL1 расположена в положениях 24-34 соответствующей последовательности VL; CDRL2 расположена в положениях 50-56 соответствующей последовательности VL; и CDRL3 расположена в положениях 89-97 соответствующей последовательности VL. BTLA-связывающие агенты имеющие пары переменных областей тяжелой и легкой цепей, указанные в Таблице 2, или, по меньшей мере, их CDR, обеспечивают конкретные варианты осуществления изобретения. Дополнительные пары переменных областей тяжелой и легкой цепей из Таблицы 2 или, по меньшей мере, их CDR могут обеспечить еще другие BTLA-связывающие агенты, и предполагается, что они входят в объем настоящего изобретения.

[0125] В Таблице 3 представлены примеры BTLA-связывающих агентов (например, антител или фрагментов антител), содержащих переменные области тяжелой цепи иммуноглобулина с SEQ ID NO: 43-156 и переменные области легкой цепи с SEQ ID NO: 157-192.

Таблица 3

Идентификация Ab	Переменная область тяжелой цепи	Переменная область легкой цепи
APE08876	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 159
APE08894	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 158
APE08895	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 157
APE08896	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 160
APE08897	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 159
APE08898	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 158
APE08899	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 157
APE08900	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 160
APE08901	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 159
APE08902	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 158
APE08903	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 157
APE08904	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 160
APE09035	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 160
APE09036	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 160
APE09037	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 160
APE09038	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 160
APE09043	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 166
APE09044	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 165
APE09045	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 164
APE09046	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 163
APE09047	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 162
APE09048	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 161

APE09076	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 167
APE09233	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 167
APE09234	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 165
APE09235	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 161
APE09236	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 161
APE09237	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 161
APE09238	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 161
APE09261	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 160
APE09262	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 160
APE09263	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 160
APE09783	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 160
APE09784	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 160
APE09987	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 168
APE09988	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 168
APE10018	SEQ ID NO: 61	SEQ ID NO: 160
APE10019	SEQ ID NO: 60	SEQ ID NO: 160
APE10020	SEQ ID NO: 59	SEQ ID NO: 160
APE10021	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 160
APE10022	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 160
APE10023	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 160
APE10024	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 160
APE10068	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 168
APE10070	SEQ ID NO: 63	SEQ ID NO: 168
APE10070	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 168
APE10071	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 168
APE10072	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 160
APE10074	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 160
APE10074	SEQ ID NO: 63	SEQ ID NO: 160
APE10075	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 160
APE10265	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 168
APE10266	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 168
APE10267	SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 168
APE10268	SEQ ID NO: 80	SEQ ID NO: 168
APE10269	SEQ ID NO: 79	SEQ ID NO: 168
APE10270	SEQ ID NO: 78	SEQ ID NO: 168
APE10271	SEQ ID NO: 77	SEQ ID NO: 168
APE10272	SEQ ID NO: 76	SEQ ID NO: 168
APE10273	SEQ ID NO: 75	SEQ ID NO: 168
APE10274	SEQ ID NO: 74	SEQ ID NO: 168
APE10275	SEQ ID NO: 73	SEQ ID NO: 168
APE10276	SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 168
APE10277	SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 168
APE10278	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 168
APE10279	SEQ ID NO: 69	SEQ ID NO: 168
APE10280	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 160
APE10281	SEQ ID NO: 67	SEQ ID NO: 160
APE10282*†	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 160
APE10284	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 168
APE10285	SEQ ID NO: 67	SEQ ID NO: 168
APE10286*†	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 168

APE10297	SEQ ID NO: 99	SEQ ID NO: 168
APE10298	SEQ ID NO: 98	SEQ ID NO: 168
APE10299	SEQ ID NO: 97	SEQ ID NO: 168
APE10300	SEQ ID NO: 96	SEQ ID NO: 168
APE10301	SEQ ID NO: 95	SEQ ID NO: 168
APE10302	SEQ ID NO: 94	SEQ ID NO: 168
APE10303	SEQ ID NO: 93	SEQ ID NO: 168
APE10304	SEQ ID NO: 92	SEQ ID NO: 168
APE10305	SEQ ID NO: 91	SEQ ID NO: 168
APE10306	SEQ ID NO: 90	SEQ ID NO: 168
APE10307	SEQ ID NO: 89	SEQ ID NO: 168
APE10308	SEQ ID NO: 88	SEQ ID NO: 168
APE10309	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 168
APE10310	SEQ ID NO: 86	SEQ ID NO: 168
APE10311	SEQ ID NO: 85	SEQ ID NO: 168
APE10312	SEQ ID NO: 84	SEQ ID NO: 168
APE10343	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 179
APE10344	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 178
APE10345	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 177
APE10346	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 176
APE10347	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 175
APE10348	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 174
APE10349	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 173
APE10350	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 172
APE10351	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 171
APE10352	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 170
APE10353	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 169
APE10426	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 187
APE10427	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 186
APE10428	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 185
APE10429	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 184
APE10430	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 183
APE10431	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 182
APE10432	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 181
APE10433	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 180
APE10462	SEQ ID NO: 118	SEQ ID NO: 175
APE10463	SEQ ID NO: 117	SEQ ID NO: 175
APE10464	SEQ ID NO: 116	SEQ ID NO: 175
APE10465	SEQ ID NO: 115	SEQ ID NO: 175
APE10466	SEQ ID NO: 114	SEQ ID NO: 175
APE10467	SEQ ID NO: 113	SEQ ID NO: 175
APE10468	SEQ ID NO: 112	SEQ ID NO: 175
APE10469	SEQ ID NO: 111	SEQ ID NO: 175
APE10470	SEQ ID NO: 139	SEQ ID NO: 175
APE10471	SEQ ID NO: 138	SEQ ID NO: 175
APE10472	SEQ ID NO: 137	SEQ ID NO: 175
APE10473	SEQ ID NO: 136	SEQ ID NO: 175
APE10474	SEQ ID NO: 135	SEQ ID NO: 175
APE10475	SEQ ID NO: 134	SEQ ID NO: 175
APE10476	SEQ ID NO: 133	SEQ ID NO: 175

APE10477	SEQ ID NO: 132	SEQ ID NO: 175
APE10478	SEQ ID NO: 131	SEQ ID NO: 175
APE10479	SEQ ID NO: 130	SEQ ID NO: 175
APE10480	SEQ ID NO: 129	SEQ ID NO: 175
APE10481	SEQ ID NO: 128	SEQ ID NO: 175
APE10482	SEQ ID NO: 127	SEQ ID NO: 175
APE10483	SEQ ID NO: 126	SEQ ID NO: 175
APE10484	SEQ ID NO: 125	SEQ ID NO: 175
APE10485	SEQ ID NO: 124	SEQ ID NO: 175
APE10486	SEQ ID NO: 123	SEQ ID NO: 175
APE10487	SEQ ID NO: 122	SEQ ID NO: 175
APE10488	SEQ ID NO: 121	SEQ ID NO: 175
APE10489	SEQ ID NO: 120	SEQ ID NO: 175
APE10490	SEQ ID NO: 119	SEQ ID NO: 175
APE10491	SEQ ID NO: 110	SEQ ID NO: 175
APE10492	SEQ ID NO: 109	SEQ ID NO: 175
APE10493	SEQ ID NO: 108	SEQ ID NO: 175
APE10494	SEQ ID NO: 107	SEQ ID NO: 175
APE10495	SEQ ID NO: 106	SEQ ID NO: 175
APE10496	SEQ ID NO: 105	SEQ ID NO: 175
APE10497	SEQ ID NO: 104	SEQ ID NO: 175
APE10498	SEQ ID NO: 103	SEQ ID NO: 175
APE10499	SEQ ID NO: 102	SEQ ID NO: 175
APE10500	SEQ ID NO: 101	SEQ ID NO: 175
APE10501	SEQ ID NO: 100	SEQ ID NO: 175
APE10513	SEQ ID NO: 139	SEQ ID NO: 174
APE10514	SEQ ID NO: 138	SEQ ID NO: 174
APE10515	SEQ ID NO: 137	SEQ ID NO: 174
APE10516	SEQ ID NO: 136	SEQ ID NO: 174
APE10517	SEQ ID NO: 135	SEQ ID NO: 174
APE10518	SEQ ID NO: 134	SEQ ID NO: 174
APE10519	SEQ ID NO: 133	SEQ ID NO: 174
APE10520	SEQ ID NO: 132	SEQ ID NO: 174
APE10521	SEQ ID NO: 131	SEQ ID NO: 174
APE10522	SEQ ID NO: 130	SEQ ID NO: 174
APE10523	SEQ ID NO: 129	SEQ ID NO: 174
APE10524	SEQ ID NO: 128	SEQ ID NO: 174
APE10525	SEQ ID NO: 127	SEQ ID NO: 174
APE10526	SEQ ID NO: 126	SEQ ID NO: 174
APE10527	SEQ ID NO: 125	SEQ ID NO: 174
APE10528	SEQ ID NO: 124	SEQ ID NO: 174
APE10529	SEQ ID NO: 123	SEQ ID NO: 174
APE10530	SEQ ID NO: 122	SEQ ID NO: 174
APE10531	SEQ ID NO: 121	SEQ ID NO: 174
APE10532	SEQ ID NO: 120	SEQ ID NO: 174
APE10533	SEQ ID NO: 119	SEQ ID NO: 174
APE10534	SEQ ID NO: 110	SEQ ID NO: 174
APE10535	SEQ ID NO: 109	SEQ ID NO: 174
APE10536	SEQ ID NO: 108	SEQ ID NO: 174
APE10537	SEQ ID NO: 107	SEQ ID NO: 174

APE10538	SEQ ID NO: 106	SEQ ID NO: 174
APE10539	SEQ ID NO: 105	SEQ ID NO: 174
APE10540	SEQ ID NO: 104	SEQ ID NO: 174
APE10541	SEQ ID NO: 103	SEQ ID NO: 174
APE10542	SEQ ID NO: 102	SEQ ID NO: 174
APE10543	SEQ ID NO: 101	SEQ ID NO: 174
APE10544	SEQ ID NO: 100	SEQ ID NO: 174
APE10545	SEQ ID NO: 118	SEQ ID NO: 174
APE10546	SEQ ID NO: 117	SEQ ID NO: 174
APE10547	SEQ ID NO: 116	SEQ ID NO: 174
APE10548	SEQ ID NO: 115	SEQ ID NO: 174
APE10549	SEQ ID NO: 114	SEQ ID NO: 174
APE10550	SEQ ID NO: 113	SEQ ID NO: 174
APE10551	SEQ ID NO: 112	SEQ ID NO: 174
APE10552	SEQ ID NO: 111	SEQ ID NO: 174
APE10553	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 189
APE10554	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 188
APE10555	SEQ ID NO: 143	SEQ ID NO: 174
APE10556	SEQ ID NO: 142	SEQ ID NO: 174
APE10570†	SEQ ID NO: 141	SEQ ID NO: 174
APE10571	SEQ ID NO: 140	SEQ ID NO: 174
APE10577	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 174
APE10580	SEQ ID NO: 146	SEQ ID NO: 189
APE10581	SEQ ID NO: 145	SEQ ID NO: 189
APE10583	SEQ ID NO: 146	SEQ ID NO: 174
APE10584	SEQ ID NO: 145	SEQ ID NO: 174
APE10620	SEQ ID NO: 149	SEQ ID NO: 189
APE10621	SEQ ID NO: 148	SEQ ID NO: 189
APE10622	SEQ ID NO: 147	SEQ ID NO: 189
APE10623	SEQ ID NO: 149	SEQ ID NO: 174
APE10624	SEQ ID NO: 148	SEQ ID NO: 174
APE10625	SEQ ID NO: 147	SEQ ID NO: 174
APE10657†	SEQ ID NO: 153	SEQ ID NO: 174
APE10658†	SEQ ID NO: 152	SEQ ID NO: 174
APE10659	SEQ ID NO: 151	SEQ ID NO: 174
APE10660	SEQ ID NO: 118	SEQ ID NO: 191
APE10661	SEQ ID NO: 147	SEQ ID NO: 190
APE10663	SEQ ID NO: 118	SEQ ID NO: 190
APE10664†	SEQ ID NO: 150	SEQ ID NO: 189
APE10665†	SEQ ID NO: 150	SEQ ID NO: 174
APE10677†	SEQ ID NO: 153	SEQ ID NO: 192
APE10679	SEQ ID NO: 151	SEQ ID NO: 192
APE10678†	SEQ ID NO: 152	SEQ ID NO: 192
APE10680†	SEQ ID NO: 156	SEQ ID NO: 174
APE10681†	SEQ ID NO: 155	SEQ ID NO: 174
APE10682	SEQ ID NO: 154	SEQ ID NO: 174
APE10840	SEQ ID NO: 144	SEQ ID NO: 174

[0126] Для антител или фрагментов антител в Таблице 3 области CDR, пронумерованные по Kabat, являются следующими: CDRH1 расположена в положениях 31-35 соответствующей последовательности VH; CDRH2 расположена в положениях 50-

66 соответствующей последовательности VH, за исключением антител, отмеченных *, в которых CDRH2 расположена в положениях 50-67 соответствующей последовательности VH; CDRH3 расположена в положениях 99-113 соответствующей последовательности VH, за исключением антител, отмеченных знаком †, в которых CDRH3 расположена в положениях 100-114; CDRL1 расположена в положениях 24-34 соответствующей последовательности VL; CDRL2 расположена в положениях 50-56 соответствующей последовательности VL; CDRL3 расположена в положениях 89-97 соответствующей последовательности VL. BTLA-связывающие агенты, имеющие пары переменных областей тяжелой и легкой цепей, указанные в Таблице 3, или, по меньшей мере, их CDR, обеспечивают конкретные варианты осуществления изобретения. Дополнительные пары переменных областей тяжелой и легкой цепей из Таблицы 3 или, по меньшей мере, их CDR могут обеспечить еще другие BTLA-связывающие агенты, и предполагается, что они входят в объем настоящего изобретения.

[0127] В следующих примерах означенные антитела представлены ниже:

Ab No.	SEQ ID NOs							
	CDR H1	CDR H2	CDR H3	CDR L1	CDR L2	CDR L3	Варибельная область тяжелой цепи	Варибельная область легкой цепи
6G3								
АРЕ10840. x	201	202	203	204	205	206	144	174
АРЕ12839. x	201	202	203	204	205	206	144	174
АРЕ13308. x	201	202	203	204	205	206	144	174
АРЕ10585. x	201	202	203	204	205	206	144	174
10D8								
АРЕ10134	211	212	213	214	215	216	207	209
АРЕ12774. x	221	222	223	224	225	226	217	219
АРЕ11482	221	222	223	224	225	226	217	219

ПРИМЕР 1

[0128] Антитело 6G3 получали из мышинной гибридомы, полученной стандартными методами слияния из клеток селезенки мыши, иммунизированной BTLA. Антитело гуманизировали с использованием стандартных способов, описанных в настоящем документе. Окончательное оптимизированное антитело экспрессировали в клетках яичника китайского хомяка (СНО) с использованием векторов, представленных в Таблице 1.

Таблица 1

6G3	Условия экспрессии	Варибельная область цепи H	Варибельная область цепи L
АРЕ10840	ExpСНО-S™ транзиторно	SEQ ID NO: 144	SEQ ID NO: 174

АРЕ12839	ЕхріСНО-S сортированный стабильный пул	SEQ ID NO: 144	SEQ ID NO: 174
АЕ13308	СНО-K1 стабильный пул	SEQ ID NO: 144	SEQ ID NO: 174

ПРИМЕР 2

[0129] Этот пример демонстрирует, что описанное в настоящем документе антитело 6G3 против ВТЛА обладает аффинностью связывания, определенной с помощью поверхностного плазмонного резонанса, для ВТЛА человека с $KD \sim 5$ нМ и для ВТЛА яванского макака с $KD \sim 11$ нМ.

[0130] Анализ поверхностного плазмонного резонанса (SPR) проводили с использованием Biacore T200 (GE Healthcare Life Sciences). Кинетические константы определяли с использованием модели связывания 1:1 в оценочном программном обеспечении Biacore T200 для расчета константы ассоциации и константы диссоциации (k_a и k_d , соответственно) и констант диссоциации в качестве меры общей аффинности (KD). IgG против человека (GE Healthcare Life Sciences) иммобилизовали на чипе CM5 с использованием EDC-активированного химического связывания с аминогруппой (контакт в течение 420 секунд при скорости потока 10 мкл/мин). Антитела (АРЕ10585.04 6G3 IgG1 и АРЕ10840.05 6G3 IgG4), каждое в концентрации 0,5 мкг/мл, были захвачены при 60-секундном контакте с проточной кюветой при скорости потока 10 мкл/мин. Мономерный ВТЛА-his человека или ВТЛА-his яванского макака в концентрациях 60 нМ, 20 нМ, 6,7 нМ и 2,2 нМ пропускали через захваченное антитело (ассоциация 480 секунд, диссоциация 1800 секунд). Прогоны проводили при 25°C и использовали буфер, содержащий 10 мМ HEPES, pH 7,6, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA, 0,05% полисорбата 20 (HBS-EP+, pH 7,6; Текнова) для подвижной фазы и всех разведений. В конце каждого цикла связанный антиген удаляли путем регенерации с использованием двух последовательных экспонирований (60 секунд и 90 секунд) в 3 М MgCl₂ (30 мкл/мин). Сенсограммы и константы связывания, соответствующие эксперименту, показаны на Фигуре 1 (ВТЛА человека) и Фигуре 1 (ВТЛА яванского макака). Уровни захвата антител в резонансных единицах (RU) указаны справа на каждой панели.

ПРИМЕР 3

[0131] Этот пример демонстрирует, что описанное в настоящем документе антитело 6G3 против ВТЛА обладает аффинностью связывания, определенной с помощью анализа кинетического исключения, для ВТЛА человека с $KD \sim 410$ пМ и для ВТЛА яванского макака с $KD \sim 1,66$ нМ.

[0132] Измерения аффинности 6G3 IgG4 (АРЕ10840.04 (H-цепь SEQ ID NO: 144, L-цепь SEQ ID NO: 174)) связывания с ВТЛА в растворе определяли на KinExA 3000 (Sapidyne Instruments). На гранулы на основе азлактона (ThermoFisher Scientific) наносили покрытие в виде ECD-his ВТЛА человека (30 мкг/мл) или ВТЛА ECD-his яванского макака (20 мкг/мл) в 50 мМ Na₂CO₃ в течение 2 часов при комнатной температуре и блокировали 10 мг/мл BSA. Концентрацию 6G3 IgG4 АРЕ10840.04 поддерживали постоянной на

уровне 100 пМ для связывания в экспериментах с BTLA как у человека, так и у яванского макака. ECD-his BTLA человека или яванского макака добавляли при 25°C в 2,5-кратных разведениях от 1000 нМ до 68 фМ. Наборы образцов уравнивали при 4°C в течение 72 часов и доводили до комнатной температуры в течение 6 часов перед захватом свободного антитела с помощью связанных с BTLA гранул на основе азлактона. Вторичным антителом для количественного определения 6G3, связанного с гранулами, был конъюгированный с Alexa-Fluor-647 аффинно чистый ослиный IgG против антитела человека (250 нг/мл, Jackson ImmunoResearch Laboratories). Максимальный и фоновый сигналы определяли на образцах только с 6G3 и только с буфером, соответственно. Данные анализировали с использованием программного обеспечения KinExA Pro 3.2.6. 95% доверительные интервалы при анализе значений KD для связывания антитела 6G3 с BTLA человека и BTLA яванского макака показаны на Фигуре 2.

ПРИМЕР 4

[0133] Этот пример демонстрирует, что описанное в настоящем документе антитело 6G3 проявляет насыщение связывания с BTLA человека и яванского макака, экспрессированными в стабильно трансфицированных клетках 293с18.

[0134] Клон клеток 293с18 1E4, стабильно экспрессирующий конструкцию BTLA человека, или клон 1G5, стабильно экспрессирующий BTLA яванского макака, собирали с использованием раствора аккумулязы (Millipore Sigma/Sigma-Aldrich) и один раз промывали фосфатно-солевым буфером, 1% BSA. Клетки BTLA яванского макака 293с18 нагружали липофильным карбоцианиновым красителем DiD (2 мкМ, 1,1'-диоктадецил-3,3,3',3'-тетраметилендикарбоцианин; ThermoFisher Scientific) путем осторожного покачивания в течение 10 минут при комнатной температуре. Клетки, окрашенные DiD, промывали в PBS, 1% BSA и смешивали равные количества клеток человека BTLA 293с18 и BTLA 293с18-DiD-окрашенных клеток яванского макака. Клетки (всего 2×10^5 клеток/образец) инкубировали с указанными концентрациями очищенного 6G3 IgG4 (две производственные партии, APE10840.03 и APE10840.04 (H-цепь SEQ ID NO: 144, L-цепь SEQ ID NO: 174)) или человеческое IgG4-антитело контроля изотипа, специфичное к лизоциму куриного яйца, при осторожном встряхивании в течение 10 минут при 4°C в буфере FACS (PBS, 1% BSA, 0,02% азид натрия). Клетки центрифугировали и один раз промывали FACS-буфером, ресуспендировали в FACS-буфере и инкубировали при осторожном встряхивании в течение дополнительных 20 минут при 4°C. Клетки центрифугировали и промывали один раз буфером FACS без BSA и фиксировали в 100 мкл/лунку 2% параформальдегида в PBS в течение 10 минут при комнатной температуре. Клетки один раз промывали в FACS-буфере и инкубировали при осторожном встряхивании в течение 10 минут при 4°C со вторичным антителом (козьи анти-человеческие каппа-PE, 0,2 мкг/мл в FACS-буфере, SouthernBiotech). Клетки промывали и ресуспендировали в буфере FACS и анализировали на флуоресценцию на BD FACSAria (BD Biosciences). Окрашенные DiD клетки, экспрессирующие BTLA яванского макака (Фигура 3), анализировали на среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) отдельно от

клеток, экспрессирующих VTLA человека (Фигура 3). Кривые аппроксимировали с использованием $\log(\text{ингибитор})$ в зависимости от отклика - переменный наклон (четыре параметра) методом наименьших квадратов в GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.)

[0135] Две партии описанных в настоящем документе антител 6G3 (APE10840.03 и APE10840.04) демонстрируют аналогичное связывание в зависимости от концентрации и насыщения с клетками VTLA 293с18 человека ($EC_{50} \sim 1,7$ нМ и 1,8 нМ, соответственно) и клетками VTLA 293с18 яванского макака ($EC_{50} \sim 2,3$ нМ), как показано на Фигуре 3.

ПРИМЕР 5

[0136] Этот пример демонстрирует, что описанное в настоящем документе антитело 6G3 проявляет связывание с насыщением с $CD4^+$ Т-клетками периферической крови человека нормального донора, $CD8^+$ Т-клетками и $CD20^+$ В-клетками.

[0137] Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) выделяли с помощью центрифугирования в градиенте плотности Histopaque (Sigma-Aldrich) нормальной донорской крови, полученной из Банка крови Сан-Диего (Сан-Диего, Калифорния). PBMC промывали и инкубировали при концентрации 2×10^7 клеток/мл в буфере FACS (PBS, 1% BSA, 0,02% азида натрия) с BD Fc Block человека ($2,5$ мкг/ 1×10^6 клеток, BD Biosciences) и красителя желтых мертвых клеток LIVE/DEAD® Fixable (30 мкл, ThermoFisher Scientific) в течение 10 минут на льду. Клетки однократно промывали в FACS-буфере, ресуспендировали в FACS-буфере в концентрации 1×10^7 клеток/мл и добавляли следующие антитела для фенотипирования: Alexa Fluor 488-антитело против $CD3\epsilon$ человека клон SK7, бриллиантовый фиолетовый 421-антитело против $CD4$ человека клон ОКТ4, бриллиантовый фиолетовый 785-антитело против $CD8$ человека клон SK1 и бриллиантовый фиолетовый 570-антитело против $CD20$ человека клон 2H7 (по 50 мкл каждого; все от BioLegend, Inc.). Клетки (1×10^6 клеток/образец) с добавленными фенотипирующими антителами высевали в 96-луночный планшет с U-образным дном и инкубировали с указанными концентрациями меченных DyLight 650 антител против VTLA или антител контроля изотипа при осторожном встряхивании в течение 20 минут при 4°C в буфере FACS. 6G3 IgG4 (APE10916.02) представляло собой APE10840, меченное DyLight 650 ($3,44$ моль DyL650/моль антитела). Человеческое IgG4-антитело контроля изотипа, специфичное к лизоциму куриного яйца, метили DyLight 650 ($3,22$ моль DyL650/моль антитела). Эталонное антитело против VTLA MIN26 было приобретено в виде антитела, меченного аллофиикоцианином (APC), у BioLegend, Inc. Образцы однократно промывали в FACS-буфере, ресуспендировали в 150 мкл/лунку FACS-буфера и дополнительно промывали в течение 10 минут при 4°C . Образцы центрифугировали и фиксировали в 4% параформальдегиде в фосфатно-солевом буфере в течение 10 минут при комнатной температуре. Образцы дважды промывали FACS-буфером, ресуспендировали в 150 мкл/лунку FACS-буфера и анализировали на флуоресценцию на проточном цитометре NovoCyte (ACEA Biosciences, Inc.). Данные анализировали с использованием программного обеспечения NovoExpress (ACEA Biosciences, Inc.). Средние интенсивности флуоресценции окрашивания антитела против VTLA или изотипа

на активированных CD4⁺ Т-клетках (Фигура 4), CD8⁺ Т-клетках (Фигура 4) или CD20⁺ В-клетках (Фигура 4) были нанесены на график, и кривые аппроксимировали как $\log(\text{агонист})$ в зависимости от ответа (три параметра) с использованием метода наименьших квадратов для расчета EC50 в GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.).

[0138] Описанное в настоящем документе антитело 6G3, помеченное DyLight 650, демонстрирует зависимое от концентрации и насыщающее связывание с CD4⁺ Т-клетками здорового донора (Фигура 4), CD8⁺ Т-клетками (Фигура 4) и В-клетками (Фигура 4). Антитело 6G3 связывается с CD4⁺ Т-клетками с EC50 ~2,4 нМ, с CD8⁺ Т-клетками с EC50 ~3,2 нМ и с CD20⁺ В-клетками с EC50 ~0,5 нМ. Окрашивание антитела против BTLA MIN26-APC в качестве положительного контроля аналогично окрашиванию антитела 6G3. Меченое DyLight 650 человеческое IgG4-антитело контроля изотипа не проявляет окрашивания этих популяций клеток (Фигура 4).

ПРИМЕР 6

[0139] Этот пример демонстрирует, что описанное в настоящем документе антитело 6G3 проявляет зависимое от концентрации связывание с нормальными CD3⁺ Т-клетками периферической крови яванских макаков и CD20⁺ В-клетками.

[0140] 6G3 IgG4 (APE13308), полученное из пула стабильно трансфицированных клеток CHO-K1, было помечено Alexa Fluor 647 (AF647) (набор для мечения антител Alexa Fluor; ThermoFisher Scientific/Molecular Probes) в соответствии с инструкциями производителя и обозначено APE13766.02 (6G3-AF647). Свежую периферическую кровь нормальных яванских макаков получали от Altasciences. Образец цельной крови (800 мкл) инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре с блокирующим реагентом FcR человека (Miltenyi Biotec, Inc.), а затем окрашивали смесью флуоресцентно меченных антител для различения популяций Т- и В-клеток яванского макака [PerCP -Cy5.5 Мышиные антитела против CD3 человека (клон SP34-2; BD Biosciences), BD Horizon V450 Мышиные антитела против CD4 человека (клон L200; BD Biosciences), APC/Cy7 Мышиные антитела против CD8 человека (клон SK1; BD Biosciences), бриллиантовый фиолетовый 785-антитело против CD20 (клон 2H7; BioLegend, Inc.), BD Horizon V500 мышиное антитело против CD45 примата, отличного от человека (клон D058-1283; BD Biosciences)], при комнатной температуре в темноте в течение 20 минут. Затем аликвоты крови распределяли по лункам и инкубировали с указанными концентрациями 6G3-AF647 (APE13766.02) или эталонного мышиного APC-антитела против CD272 человека (BTLA) (клон J168-540; BD Biosciences) в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте. После инкубации эритроциты лизировали в течение 10 минут путем добавления 2 мл разбавленного лизирующего раствора BD Pharm Lyse (BD Biosciences), образцы центрифугировали при 200 x g в течение 5 минут, промывали буфером FACS [Dulbecco's PBS, без кальция, без магния (Gibco/ThermoFisher Scientific), 25 mM HEPES, pH 7,2, 0,1% BSA, 0,1% азида натрия] и фиксировали в 4% параформальдегиде (200 мкл/образец) в течение 10 минут при комнатной температуре. Образцы дважды промывали буфером FACS и анализировали на флуоресценцию на проточном цитометре NovoCyte Quanteon

(ACEA Biosciences, Inc.). Данные анализировали с использованием программного обеспечения NovoExpress (ACEA Biosciences, Inc.). Средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) наносили на график и аппроксимировали с использованием нелинейного регрессионного анализа в GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.). Значения MFI для каждого антитела против BTLA на всех CD3+ клетках показаны на Фигуре 5А; Значения MFI для каждого антитела против BTLA на всех CD20+ клетках показаны на Фигуре 5В. На Фигуре 5С показан точечный анализ окрашивания антитела против CD3 и окрашивания 33 нМ APC-меченого эталонного антитела против BTLA (клон J168-540). На фигуре 5D показан точечный анализ окрашивания антитела против CD3 и окрашивания 100 нМ 6G3-AF647. Связывание каждого антитела против BTLA с CD3-клетками на Фигуре 5С и Фигуре 5D (зеленые клетки в нижних квадрантах каждой панели) отражает связывание с CD20+ В-клетками.

[0141] Описанное в настоящем документе антитело 6G3, меченное AF647, демонстрирует зависимое от концентрации связывание с CD3+ Т-клетками и CD20+ В-клетками периферической крови нормальных яванских макак. Связывание с CD3+ Т-клетками периферической крови не достигает насыщения при концентрации антитела 100 нМ в используемых условиях окрашивания (Фигура 5А) (оценка EC50 ~3,4 нМ), а связывание 6G3-AF647 с CD20+ В-клетками периферической крови начинает насыщаться (приблизительная EC50 ~ 1,4 нМ) (Фигура 5В). MFI окрашивания 6G3-AF647 В-клеток примерно в 9 раз больше, чем MFI окрашивания 6G3-AF647 Т-клеток. Характер окрашивания 6G3-AF647 при 100 нМ на нормальных CD3+ и CD3- (CD20+) клетках яванского макака очень похож на характер окрашивания коммерчески доступного эталонного APC-меченого антитела против BTLA J168 при 33 нМ (Фигура 5D и 5С, соответственно).

ПРИМЕР 7

[0142] Этот пример демонстрирует, что описанное в настоящем документе антитело против BTLA не конкурирует с HVEM или комплексом HVEM/LIGHT за связывание с BTLA на клеточной поверхности.

[0143] Клетки 293с18, клон 1E4, стабильно экспрессирующие BTLA человека, собирали раствором аккумулязы (Millipore Sigma/Sigma-Aldrich) и один раз промывали PBS, 1% BSA. Клетки высевали по 2×10^5 /лунку в 96-луночные планшеты с U-образным дном и помещали на лед. Очищенные антитела в концентрациях, в два раза превышающих указанные, серийно разводили в 3 раза в буфере FACS (PBS, 1% BSA, 0,02% азид натрия). Тестируемые антитела представляли собой человеческое IgG4-антитело контроля изотипа, специфичное к лизоциму куриного яйца, эталонное антагонистическое IgG4-антитело BTLA и IgG4 6G3 (APE10840.06). Тримерные комплексы HVEM/LIGHT были предварительно сформированы путем смешивания эквимольных (по 60 нМ) количеств DyLight 650-HVEM IgG1 Fc человека и тримерного LIGHT-foldon-his и предварительной инкубации в течение 15 минут при комнатной температуре. К разбавленным антителам добавляли либо DyLight 650-HVEM-Fc (конечная концентрация 100 нМ; Фигура 6А), либо

предварительно сформированные комплексы DyLight 650-HVEM/LIGHT (конечная концентрация HVEM/LIGHT, 30 нМ каждый; Фигура 6B) добавляли к разведенным антителам (конечная концентрация антител, как указано) и инкубировали в течение 15 минут на льду. Клетки центрифугировали, осторожно ресуспендировали в смеси антител и HVEM (Фигура 6A) или антител и комплексов HVEM/LIGHT (Фигура 6B) и инкубировали в течение 30 минут на льду. Клетки центрифугировали, один раз промывали FACS-буфером и фиксировали в 2% параформальдегиде в PBS в течение 10 минут при комнатной температуре. Клетки промывали один раз, ресуспендировали в буфере FACS и анализировали на предмет флуоресценции на BD FACSAria (BD Biosciences). Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) наносили на график в GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.), и кривые аппроксимировали с использованием метода наименьших квадратов $\log(\text{агонист})$ против ответа (три параметра).

[0144] Описанное в настоящем документе антитело 6G3 (APE10840.06) не конкурирует ни со связыванием HVEM-Fc (Фигура 6A), ни со связыванием комплекса HVEM/LIGHT (Фигура 6B) с BTLA клеточной поверхности. В присутствии антитела 6G3 наблюдается повышенное связывание HVEM-Fc с BTLA клеточной поверхности (Фигура 6A). Зависимое от 6G3 повышенное связывание HVEM также наблюдается при использовании комплексов HVEM/LIGHT, но оно более выражено при использовании только HVEM-Fc (Фигура 6A и 6B). Эталонное антагонистическое антитело демонстрирует зависимое от концентрации ингибирование связывания HVEM и HVEM/LIGHT с BTLA (Фигура 6A и 6B). Нерелевантное IgG4-антитело соответствующего изотипа не влияет на связывание HVEM или HVEM/LIGHT с BTLA.

ПРИМЕР 8

[0145] Этот пример демонстрирует, что эпитоп на BTLA человека, который связывается описанными в настоящем документе антителами 6G3 и 10D8, находится на стороне BTLA, противоположной сайту связывания HVEM.

[0146] Картирование водородно-дейтериевого обмена пептидов на BTLA, связанных с описанными в настоящем документе антителами 6G3 и 10D8, проводили с использованием рекомбинантного мономера BTLA человека. BTLA, использованный в эксперименте, соответствовал аминокислотным положениям hBTLA 31-155 (UniProt ID # Q7Z6A9), за которыми следовала метка 6-his. На Фигурах 7A, 7B и 7C показана ленточная модель кристаллической структуры внеклеточного домена BTLA человека (черный) в комплексе с пространственной моделью кристаллической структуры внеклеточного связывающего домена HVEM человека (светло-серый), визуализированная в PyMOL из структуры белкового банка данных (Compaan et al., J. Biol Chem 280: 39553-39561 (2005)). На Фигуре 7A обобщен эксперимент по водородно-дейтериевому обмену с использованием антитела 6G3 (APE12839.05 (H-цепь SEQ ID NO: 144, L-цепь SEQ ID NO: 174)), на Фигуре 7B обобщен эксперимент по водородно-дейтериевому обмену с использованием антитела 10D8 (APE11482.06), а на фигуре 7C обобщен эксперимент по водородно-дейтериевому обмену с использованием эталонного BTLA-антагонистического

антитела (APE10693.17). Для каждого эксперимента смесь BTLA/антитело или только BTLA метили дейтерием в течение 4, 10 или 60 минут, чтобы увидеть кинетику обмена. После инкубации белок BTLA подвергали быстрому ферментативному протеолизу при кислом pH и включению дейтерия в полученные пептиды, количественно определяемому с помощью жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии.

[0147] Картирование показало участие следующих остатков BTLA:

Связывание 6G3

Пептид 52-65DPFELECPVKYCAN (SEQ ID NO: 227)

Пептид 100-106LHFEPVL (SEQ ID NO: 228)

Связывание 10D8

Пептид 46-65HSILAGDPFELECPVKYCAN (SEQ ID NO: 229)

Пептид 82-91LEDRQTSWKE (SEQ ID NO: 230)

Пептид 100-106LHFEPVL (SEQ ID NO: 231)

Связывание эталонного антагониста

Пептид 39-41YIK (SEQ ID NO: 232)

Пептид 52-64DPFELECPVKYCA (SEQ ID NO: 233)

Пептид 100-106LHFEPVL (SEQ ID NO: 228)

Пептид 124-131IESHSTTL (SEQ ID NO: 234)

ПРИМЕР 9

[0148] Этот пример демонстрирует, что когда BTLA и HVEM экспрессируются в одной и той же клетке, антитело 6G3, описанное в настоящем документе, ингибирует индуцированную LIGHT передачу сигналов HVEM в репортерном анализе на основе люциферазы и NF-κB.

[0149] Получали клетки 293c18, стабильно экспрессирующие полноразмерный BTLA человека, полноразмерный HVEM человека, и получали репортерную конструкцию NF-κB-люциферазы, полученную из pGL4.32[luc2P/NF-κB-RE/Hygro] (Promega), получали клоны отдельных клеток и конструкцию huHVEM/huBTLA/NF-κB-люцифераза обозначили как клон 8. Получали клетки CHO-S, стабильно экспрессирующие полноразмерный человеческий LIGHT, и дважды сортировали по наивысшей экспрессии LIGHT в виде стабильного пула. Клетки huHVEM/huBTLA/NF-κB-люцифераза собирали с использованием раствора аккутазы (Sigma-Aldrich/Millipore Sigma), ресуспендировали в среде Игла, модифицированной Дульбекко, с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, и высевали (5×10^4 клеток/лунку) на плоскодонный 96-луночный планшет. После 1-часовой инкубации при 37°C, 5% CO₂, к клеткам добавляли указанные концентрации 6G3 IgG4 (APE12839.07 (H-цепь SEQ ID NO: 144, L-цепь SEQ ID NO: 174)), человеческое IgG4-антитело контроля изотипа, специфичное для лизоцима куриного яйца, или эталонное человеческое антагонистическое IgG4-антитело против BTLA. После 30-минутной инкубации при комнатной температуре клетки CHO-S LIGHT собирали и добавляли ($0,55 \times 10^4$ клеток/лунку; конечные условия, 9:1 HVEM-NF-κB-респондерные клетки: стимулирующие клетки CHO-S LIGHT, что соответствовало EC50 ответа NF-κB).

Через 4 часа при 37°C, 5% CO₂ в лунки добавляли равный объем системы для анализа люциферазы Steady-Glo (Promega) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. Люминесценцию образцов считывали на мультимодальном планшет-ридере EnVision (PerkinElmer) со временем измерения 0,1 секунды. Люминесценцию в относительных световых единицах (RLU) наносили в виде графика, и кривые аппроксимировали с использованием log(агонист) против ответа (три параметра) методом наименьших квадратов в GraphPad Prism (программное обеспечение GraphPad).

[0150] Репортерный анализ NF-κB-люцифераза, показанный на Фигуре 8, демонстрирует, что антитело 6G3, раскрытое в настоящем документе, ингибирует HVEM-зависимую передачу сигналов NF-κB зависимым от концентрации образом в ответ на CHO-S LIGHT, когда BTLA и HVEM экспрессируются в одной и той же клетке. Это предполагает, что в этих условиях описанное в настоящем документе антитело 6G3 может способствовать взаимодействию между HVEM и BTLA в одной и той же клетке, что приводит к снижению управляемой LIGHT HVEM-зависимой передачи сигналов NF-κB.

[0151] Репортерный анализ NF-κB-люциферазы, показанный на Фигуре 8, демонстрирует, что эталонное антагонистическое антитело усиливает LIGHT-опосредованную HVEM-зависимую передачу сигналов NF-κB зависимым от концентрации образом в ответ на CHO-S LIGHT, когда BTLA и HVEM экспрессируются на одной и той же клетке. Нарушая взаимодействие BTLA и HVEM на одной и той же клетке, антагонистическое антитело позволит большему количеству несвязанных молекул HVEM стать доступными для взаимодействия с LIGHT, тем самым увеличивая управляемую LIGHT HVEM-зависимую передачу сигналов NF-κB.

ПРИМЕР 10

[0152] Этот пример демонстрирует в анализе переноса энергии флуоресцентного резонанса (FRET), что раскрытое в настоящем описании антитело 6G3 не разрушает комплекс BTLA/HVEM на той же клеточной поверхности.

[0153] На Фигуре 9А клеточный клон 293с18, стабильно экспрессирующий полноразмерный BTLA человека и HVEM человека, собирали с использованием раствором аккутазы (Millipore Sigma/Sigma-Aldrich), промывали буфером FACS (PBS, 1% BSA, 0,02% азида натрия) и высевали в белые 96-луночные планшеты с U-образным дном (2×10^5 клеток/лунку). Клетки центрифугировали, добавляли серийно разведенные в 3 раза антитела в указанных концентрациях и инкубировали в течение 1 часа при осторожном встряхивании при 4°C. Тестируемые антитела представляли собой 6G3 IgG4 (APE12839.05 (H-цепь SEQ ID NO: 144, L-цепь SEQ ID NO: 174)), эталонное антагонистическое IgG4-антитело и человеческое IgG4P-антитело контроля изотипа, специфичное к лизоциму куриного яйца. Клетки центрифугировали, промывали FACS-буфером и ресуспендировали в акцепторном антителе FRET, APC-анти-HVEM (15 мкг/мл; клон 122, BioLegend). Донорное антитело FRET представляет собой биотин-гуманизированное антитело 10D8 (APE12774.02) и предварительно образует комплекс в концентрации 10 мкг/мл с 0,025 мкг/мл стрептавидин-Eu (LANCE Eu-W8044-Streptavidin AD0060,

PerkinElmer) путем инкубации в течение 20 минут при комнатной температуре. Донорный комплекс биотин-анти-BTLA/стрептавидин-Eu добавляли в планшет с акцепторным антителом APC-анти-HVEM и инкубировали 24 часа при 4°C. Планшеты промывали холодным FACS-буфером и флуоресценцию образцов считывали на мультимодальном планшет-ридере EnVision (PerkinElmer, Санта-Клара, Калифорния). Соотношение флуоресценции при 665 нм/615 нм наносили на график в GraphPad Prism (GraphPad Software). Каждая точка представляет собой среднее \pm SEM трех независимых повторных экспериментов. Каждое условие образца для каждого эксперимента повторяли в 5 лунках.

[0154] Анализ FRET, показанный на Фигуре 9А, демонстрирует наличие комплекса BTLA/HVEM на трансфицированных клетках 293с18 и то, что описанное в настоящем документе антитело 6G3 не проявляет ингибирования сигнала FRET BTLA/HVEM при концентрациях до 40 мкг/мл, аналогично антителу контроля изотипа. Этот результат подтверждает, что описанное в настоящем документе антитело 6G3 не ингибирует взаимодействие BTLA и HVEM на одной и той же клеточной поверхности.

[0155] Анализ FRET, показанный на Фигуре 9А, демонстрирует, что эталонное антагонистическое антитело ингибирует сигнал FRET комплекса BTLA/HVEM зависимым от концентрации образом с IC50 приблизительно 0,65 мкг/мл.

[0156] На Фигуре 9В клеточный клон 293с18, стабильно экспрессирующий полноразмерный BTLA человека и HVEM человека, собирали с использованием раствора аккутазы (Millipore Sigma/Sigma-Aldrich), промывали FACS-буфером и высевали в белые 96-луночные планшеты с U-образным дном (2×10^5 клеток/лунку). Клетки центрифугировали, в планшет добавляли акцепторное антитело FRET APC-анти-HVEM (клон 122, BioLegend) или мышьеиное APC-IgG1-антитело контроля изотипа, серийно разбавленное в 3 раза в указанных концентрациях. Биотинилированные донорные антитела FRET предварительно образовывали комплексы в концентрации 10 мкг/мл с 0,025 мкг/мл стрептавидин-Eu (LANCE Eu-W8044-Streptavidin AD0060, PerkinElmer) путем инкубации в течение 20 минут при комнатной температуре. Тестируемые донорные биотинилированные антитела FRET представляли собой биотин-6G3 IgG4 (APE13124.01, который представлял собой биотин-APE12839.05 (H-цепь SEQ ID NO: 144, L-цепь SEQ ID NO: 174)), эталонное антагонистическое биотин-IgG4-антитело, и человеческое биотин-IgG4-антитело контроля изотипа, специфичное к лизоциму куриного яйца. Конечная концентрация комплекса донорное биотин-антитело/стрептавидин-Eu во всех лунках составляла 0,3 мкг/мл антитела и 0,75 нг/мл стрептавидин-Eu. Планшеты инкубировали в течение 24 часов при 4°C, промывали в холодном буфере FACS и флуоресценцию образцов считывали на мультимодальном планшет-ридере EnVision (PerkinElmer). Соотношение флуоресценции при 665 нм/615 нм наносили на график в GraphPad Prism (GraphPad Software). Каждая точка представляет собой среднее значение \pm стандартная ошибка среднего для 2 повторных лунок.

[0157] Анализ FRET, показанный на Фигура 9В, демонстрирует, что в присутствии описанного в настоящем документе антитела биотин-6G3 в комплексе со стрептавидин-Eu

возрастающие концентрации APC-анти-HVEM генерируют зависимый от концентрации увеличивающийся сигнал FRET. Этот пример демонстрирует, что когда антитело 6G3 связывается с BTLA на клеточной поверхности, BTLA все еще способен образовывать комплекс с HVEM на той же клеточной поверхности.

[0158] Анализ FRET, показанный на Фигура 9B, демонстрирует, что в присутствии биотинилированного эталонного антагонистического антитела в комплексе со стрептавидин-EU сигнал FRET комплекса BTLA/HVEM не детектируется и аналогичен сигналу биотинилированного антитела контроля изотипа. Этот пример демонстрирует, что эталонное антагонистическое антитело против BTLA разрушает комплекс BTLA-HVEM на той же клеточной поверхности.

ПРИМЕР 11

[0159] Этот пример демонстрирует, что, когда BTLA и HVEM экспрессируются на разных клетках, раскрытое в настоящем описании антитело 6G3 частично ингибирует BTLA-индуцированную передачу сигналов HVEM в репортерном анализе NF-κB-люцифераза.

[0160] Клетки 293c18, стабильно экспрессирующие полноразмерный HVEM человека и репортерную конструкцию NF-κB-люцифераза, были созданы и обозначены как HVEM/NF-κB-люцифераза, клон 11. Были получены клетки 293c18, стабильно экспрессирующие полноразмерный BTLA человека, клонированы отдельные клетки и обозначены как huBTLA 293c18, клон 2. Клетки BTLA 293c18 человека собирали с использованием раствора аккумулята (Sigma-Aldrich/Millipore Sigma), ресуспендировали в среде DMEM с добавлением 10% FBS и высевали ($0,5 \times 10^4$ клеток/лунку) в плоскодонный 96-луночный планшет. К клеткам добавляли указанные концентрации IgG4-антитела 6G3 (APE13308.03), полученного из пула стабильно трансфицированных клеток CHO-K1, человеческого IgG4-антитела контроля изотипа, специфичного к лизоциму куриного яйца, или эталонного антагонистического IgG4-антитела против BTLA. После 30-минутной инкубации при комнатной температуре клетки HVEM/NF-κB собирали и добавляли (5×10^4 клеток/на лунку). Через 5 часов при 37°C, 5% CO₂ в лунки добавляли равный объем системы для анализа люциферазы Steady-Glo (Promega) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. Люминесценцию образцов считывали на люминометре для микропланшетов GloMax Navigator (Promega) со временем измерения 0,3 секунды. Люминесценцию в относительных световых единицах (RLU) наносили в виде графика, и кривые аппроксимировали с использованием log(агонист) против ответа (три параметра) методом наименьших квадратов в GraphPad Prism (программное обеспечение GraphPad).

[0161] Репортерный анализ NF-κB-люцифераза, показанный на Фигуре 10, демонстрирует, что антитело 6G3, раскрытое в настоящем описании, частично ингибирует HVEM-зависимую передачу сигналов NF-κB зависимым от концентрации образом в ответ на клетки BTLA 293c18, когда HVEM и BTLA экспрессируются на разных клетках. Это предполагает, что в этих условиях антитело 6G3, раскрытое в настоящем описании, может частично ингибировать передачу сигналов HVEM, когда BTLA находится на другой

клетке. Такой же результат получают, когда человеческие клетки BTLA 293c18 фиксируют параформальдегидом перед инкубацией с раскрытым в настоящем описании антителом 6G3, или когда клетки обрабатывают ингибитором динамин-ГТФазы, который блокирует эндоцитоз.

[0162] Репортерный анализ NF-κB-люцифераза, показанный на Фигуре 10, демонстрирует, что добавление эталонного антагонистического антитела против BTLA приводит к зависимому от концентрации полному ингибированию опосредованной BTLA HVEM-зависимой передачи сигналов NF-κB, когда HVEM и BTLA экспрессируются на разных клетках.

ПРИМЕР 12:

[0163] Этот пример демонстрирует прямую агонистическую активность BTLA антитела 6G3, раскрытого в настоящем описании, в анализе передачи сигнала BTLA PathHunter Jurkat с рекрутированием SHP2.

[0164] Клональная клеточная линия Jurkat, стабильно экспрессирующая BTLA человека, меченный донором фермента β-галактозидазы (ED), и SHP2 человека, меченный акцептором фермента β-галактозидазы (EA), была создана в Eurofins DiscoverX (Фремонт, Калифорния) и получила обозначение как клетки Jurkat BTLA-ED SHP2-EA. Для анализа клетки Jurkat BTLA-ED SHP2-EA собирали и помещали в 96-луночный планшет (2×10^4 клеток/на лунку). Разведения антител готовили в отдельном планшете. Тестируемые антитела и белки представляли собой IgG4-антитело 6G3 (APE13308.03), полученное из пула стабильно трансфицированных клеток CHO-K1, человеческое IgG4-антитело контроля изотипа, специфичное к лизоциму куриного яйца, эталонное антагонистическое IgG4-антитело против BTLA и растворимый комплекс человеческий HVEM-IgG1 Fc/тримерный LIGHT (APE11989.16 и APE07872.05 в молярном соотношении 1:1,1). В планшет для анализа клеток добавляли антитела и белки и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. Во все лунки добавляли реагент для детектирования PathHunter Bioassay Detection и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 минут. Затем во все лунки добавляли реагент 2 для детектирования биоанализа и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа перед измерением сигнала люминесценции на мультимодальном планшет-ридере EnVision (PerkinElmer) со временем интегрирования 0,1 секунды. Данные графически отображались в GraphPad Prism (программное обеспечение GraphPad). Значения EC50 рассчитывали с использованием сигмоидальной кривой доза-ответ с переменным наклоном (четыре параметра) без ограничений и с использованием метода наименьших квадратов. Данные представляют собой среднее значение (\pm стандартное отклонение) для трех образцов для каждой точки. Тесты и анализы данных проводили в Eurofins DiscoverX (Фремонт, Калифорния) в рамках проекта ID: DRX-ANAB-190724.

[0165] Анализ передачи сигнала BTLA PathHunter Jurkat с рекрутированием SHP2, показанный на Фигуре 11, демонстрирует, что раскрытое в настоящем описании антитело 6G3 в виде растворимого антитела обладает прямой BTLA-агонистической активностью и

индуцирует зависимую от концентрации передачу сигнала BTLA низкой величины ($EC_{50}=125$ нг/мл). Индуцируя рекрутирование SHP2 к цитоплазматическому домену BTLA, описанное в настоящем документе антитело 6G3 может действовать, инициируя ингибирующую передачу сигналов в активированных Т- и В-клетках.

[0166] Анализ передачи сигнала BTLA PathHunter Jurkat с рекрутированием SHP2, показанный на Фигуре 11, демонстрирует, что эталонное BTLA-антагонистическое антитело в виде растворимого антитела обладает прямой BTLA-агонистической активностью и индуцирует зависимую от концентрации передачу сигнала BTLA ($EC_{50}=28,8$ нг/мл) с более высоким максимальным сигналом, чем антитело 6G3. В анализе передачи сигналов BTLA PathHunter Jurkat с рекрутированием SHP2, показанном на Фигуре 11, растворимый комплекс HVEM/LIGHT индуцирует слабую, зависимую от концентрации индуцированную передачу сигналов BTLA, которая не достигает насыщения, вероятно, из-за низкой аффинности растворимого HVEM к BTLA по сравнению с антителами.

ПРИМЕР 13

[0167] Этот пример демонстрирует в анализе передачи сигнала BTLA PathHunter Jurkat с рекрутированием SHP2, что раскрытое в настоящем описании антитело 6G3 не ингибирует передачу сигнала BTLA, индуцированную HVEM, на трансфицированной клеточной линии U-2 OS.

[0168] Клональная клеточная линия Jurkat, стабильно экспрессирующая BTLA человека, меченный донором фермента β -галактозидазы (ED), и SHP2 человека, меченный акцептором фермента β -галактозидазы (EA), (Jurkat BTLA-ED SHP2-EA клетки), и клеточная линия остеосаркомы U-2 OS, стабильно экспрессирующая HVEM человека (клетки U-2 OS hHVEM), были получены в Eurofins DiscoverX (Фремонт, Калифорния). Для проведения анализа клетки Jurkat BTLA-ED SHP2-EA собирали и помещали в 96-луночный планшет (2×10^4 клеток/на лунку). Разведения антител готовили в отдельном планшете. Тестируемые антитела представляли собой IgG4-антитело 6G3 (APE13308.03), полученное из пула стабильно трансфицированных клеток CHO-K1, человеческое IgG4-антитело контроля изотипа, специфичное к лизоциму куриного яйца, и эталонное антагонистическое IgG4-антитело BTLA. Антитела в указанных концентрациях добавляли в планшет для анализа и инкубировали в течение 1 часа во влажном инкубаторе при 37°C , 5% CO_2 . Клетки U-2 OS hHVEM собирали, ресуспендировали и добавляли в планшет для анализа (5×10^4 клеток/лунку) с клетками Jurkat BTLA-ED SHP2-EA и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. Во все лунки добавляли реагент для детектирования PathHunter Bioassay Detection и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем во все лунки добавляли реагент 2 для детектирования биоанализа и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа перед измерением сигнала люминесценции на мультимодальном планшет-ридере EnVision (PerkinElmer) со временем интегрирования 0,1 секунды. Данные графически отображались в GraphPad Prism (программное обеспечение GraphPad); Значения IC_{50} рассчитывали с

использованием сигмоидальной кривой доза-ответ с переменным наклоном (четыре параметра) без ограничений и с использованием метода наименьших квадратов. Данные представляют собой среднее значение (\pm стандартное отклонение) для трех образцов для каждой точки. Тесты и анализы данных проводили в Eurofins DiscoverX (Фремонт, Калифорния) в рамках проекта ID: DRX-ANAB-191210.

[0169] Анализ передачи сигнала PathHunter Jurkat BTLA с рекрутированием SHP2, показанный на Фигуре 12, демонстрирует, что раскрытое в настоящем описании антитело 6G3 не оказывает влияния на рекрутирование SHP2 к BTLA, индуцированное HVEM на другой клетке.

[0170] Анализ передачи сигнала BTLA PathHunter Jurkat с рекрутированием SHP2, показанный на Фигуре 12, демонстрирует, что эталонное BTLA-антагонистическое антитело проявляет сильное зависимое от концентрации ингибирование передачи сигнала BTLA, индуцированное HVEM на другой клетке ($IC_{50}=8,9$ нг/мл).

ПРИМЕР 14

[0171] Этот пример демонстрирует повышенную прямую агонистическую активность BTLA раскрытого в настоящем описании антитела 6G3 в анализе передачи сигнала PathHunter Jurkat BTLA с рекрутированием SHP2 с добавлением клеток U-2 OS, трансфицированных Fc γ RIa (CD64a), для обеспечения рекрутирования Fc γ R.

[0172] Клональная клеточная линия Jurkat, стабильно экспрессирующая BTLA человека, меченный донором фермента β -галактозидазы (ED), и SHP2 человека, меченный акцептором фермента β -галактозидазы (EA) (клетки Jurkat BTLA-ED SHP2-EA), и клеточная линия остеосаркомы U-2 OS, стабильно экспрессирующая человеческий Fc γ RIa/CD64a (клетки U-2 OS hFc γ RIa), были получены в Eurofins DiscoverX (Фремонт, Калифорния). Клетки U-2 OS hFc γ RIa собирали и помещали в 96-луночный планшет (1×10^4 клеток/лунку). Разведения антител готовили в отдельном планшете, добавляли в планшет для анализа и инкубировали в течение 1 часа во влажном инкубаторе при 37°C, 5% CO₂. Тестируемые антитела представляли собой IgG4-антитело 6G3 (APE13308.03), полученное из пула стабильно трансфицированных клеток CHO-K1, человеческое IgG4-антитело контроля изотипа, специфичное к лизоциму куриного яйца, и эталонное антагонистическое IgG4-антитело BTLA. Клетки Jurkat BTLA-ED SHP2-EA собирали и добавляли в планшет для анализа (2×10^4 клеток/лунку) с клетками U-2 OS hFc γ RIa. Планшет инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. Во все лунки добавляли реагент для детектирования PathHunter Bioassay Detection и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Во все лунки добавляли реагент 2 для детектирования биоанализа и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа перед измерением люминесцентного сигнала на мультимодальном планшет-ридере EnVision (PerkinElmer) со временем интегрирования 0,1 секунды. Данные графически отображались в GraphPad Prism (программное обеспечение GraphPad); Значения EC₅₀ рассчитывали с использованием сигмоидальной кривой доза-ответ с переменным наклоном (четыре параметра) без ограничений и с использованием метода наименьших

квадратов. Данные представляют собой среднее значение (\pm стандартное отклонение) для трех образцов для каждой точки. Тесты и анализы данных проводили в Eurofins DiscoverX (Фремонт, Калифорния) в рамках проекта ID: DRX-ANAB-191210.

[0173] Анализ передачи сигнала BTLA PathHunter Jurkat с рекрутированием SHP2, показанный на Фигуре 13, демонстрирует, что раскрытое в настоящем описании антитело 6G3 в качестве растворимого антитела в присутствии клеток, обеспечивающих рекрутирование Fc γ RIa, обладает повышенной прямой BTLA-агонистической активностью и индуцирует зависимую от концентрации передачу сигнала BTLA (EC50=9,3 нг/мл).

[0174] Анализ передачи сигнала BTLA PathHunter Jurkat с рекрутированием SHP2, показанный на Фигуре 13, демонстрирует, что эталонное BTLA-антагонистическое антитело в качестве растворимого антитела в присутствии клеток, обеспечивающих рекрутирование Fc γ RIa, обладает прямой BTLA-агонистической активностью и индуцирует зависимую от концентрации передачу сигнала BTLA (EC50=3,9 нг/мл).

[0175] Анализ передачи сигнала PathHunter Jurkat BTLA с рекрутированием SHP2, показанный на Фигуре 13, демонстрирует, что и антитело 6G3, раскрытое в настоящем описании, и эталонное BTLA-антагонистическое антитело проявляют повышенную агонистическую активность в присутствии клеточно-ассоциированного Fc γ RIa по сравнению с анализом передачи сигнала Jurkat BTLA без Fc γ RIa (6G3 примерно в 13 раз более эффективно; эталонный BTLA-антагонист примерно в 7,4 раза более эффективен) (сравните Фигуру 11 и Фигуру 13). В то время как растворимое антитело 6G3, раскрытое в настоящем описании, может индуцировать рекрутирование SHP2 к цитоплазматическому домену BTLA и инициировать ингибирующую передачу сигналов в активированных Т- и В-клетках, способность Fc γ RIa-связанного антитела 6G3 индуцировать прямую ингибирующую передачу сигналов может быть усилена.

ПРИМЕР 15

[0176] Этот пример демонстрирует, что раскрытое в настоящем описании антитело 6G3 проявляет эффективность *in vivo* в ксеногенной модели NSG/Hu-PBMC «трансплантат против болезни хозяина» (GvHD) при введении два раза в неделю в дозах 1 мг/кг, 3 мг/кг или 10 мг/кг в течение 4 недель.

[0177] Ксеногенная модель NSG/Hu-PBMC GvHD, тестирующая эффективность раскрытого в настоящем описании антитела 6G3 против BTLA, была проведена в The Jackson Laboratory JAX® In Vivo Pharmacology Services (Сакраменто, Калифорния). Мышей NOD-scid IL2 γ null (NSG) облучали дозой 1 Гр с последующей внутривенной инъекцией 10×10^6 человеческих PBMC каждой мыши, как показано на Фигуре 14А. Антитела (человеческое IgG4-антитело контроля изотипа, специфичное к лизоциму куриного яйца; и IgG4-антитело 6G3 APE13308.05, полученное из пула стабильно трансфицированных клеток CHO-K1) вводили внутривенно два раза в неделю в течение 4 недель, начиная со дня после инъекции PBMC. Раскрытое в настоящем описании антитело 6G3 вводили в дозе 1 мг/кг, 3 мг/кг или 10 мг/кг, а человеческое IgG4-

антитело контроля изотипа вводили в дозе 10 мг/кг. В каждой группе обработки антителами было 12 животных/на группу. Биоаналог белатацепт положительного контроля вводили внутривенно в дозе 75 мкг/мышь три раза в неделю в течение 4 недель. В группе обработки биоаналогом белатацепта было 8 животных. Режимы дозирования и дозовые группы в исследовании показаны на Фигуре 14В. В течение 42-дневного исследования заболевание контролировали три раза в неделю по потере массы тела, смерти и показателям GvHD, измеряя: потерю массы, активность, текстуру шерсти, бледность и положение тела. Животных, демонстрирующих потерю массы тела более чем на 10%, ежедневно контролировали, а животных, у которых наблюдалась потеря массы тела более чем на 20% от исходной массы, подвергали эвтаназии. Выживаемость включала животных, найденных мертвыми, и животных, исключенных из исследования в связи с конечными точками, определенными в протоколе исследования в The Jackson Laboratory JAX® In Vivo Pharmacology Services. Данные о выживаемости были нанесены на график в GraphPad Prism (программное обеспечение GraphPad) с использованием анализа выживаемости Каплана-Мейера, который рассчитывал медиану выживаемости для каждой группы. Статистическую значимость экспериментальных групп в парных сравнениях с группой контроля изотипа определяли в GraphPad Prism с использованием теста Гехана-Бреслоу-Уилкоксона для расчета р-значений.

[0178] Результаты выживаемости для исследования GvHD, показанные на Фигура 14С, демонстрируют, что раскрытое в настоящем описании антитело 6G3 против BTLA демонстрирует статистически высокозначимую эффективность в отношении продления выживаемости при всех протестированных дозах по сравнению с антителом контроля изотипа. Эффективность антитела 6G3 зависела от дозы, при этом в группе обработки дозой 1 мг/кг наблюдали снижение выживаемости по сравнению с группами обработки 3 мг/кг и 10 мг/кг. Среднее время выживания в ходе исследования составляло 16 дней для группы контроля изотипа, 35 дней для группы обработки 1 мг/кг 6G3 и не определено для групп обработки 3 мг/кг и 10 мг/кг 6G3. Эталонное антагонистическое антитело против BTLA вводили в дозе 10 мг/кг в качестве вторичного контроля. У животных, получавших эталонное антагонистическое антитело, не наблюдали повышения выживаемости по сравнению с животными, получавшими контроль изотипа.

ПРИМЕР 16

[0179] Этот пример иллюстрирует квалификацию 96-луночного электрохемилюминесцентного (ECL) сэндвич-анализа для детектирования BTLA после введения дозы антитела 6G3 IgG4 против BTLA в сыворотке яванского макака.

[0180] Во время разработки метода устанавливали параметры анализа, такие как концентрация реагента для захвата, MRD, тип буфера для анализа и концентрация реагента для детектирования. Затем проводили квалификацию анализа путем оценки прецизионности и достоверности внутри и между анализами, линейности разбавления, специфичности и стабильности при замораживании-оттаивании. Последний метод будет использоваться для анализа образцов, полученных в результате исследований

фармакокинетики, ТК и переносимости однократной или многократной дозы, не соответствующих GLP, у яванских макак.

[0181] На 96-луночные планшеты для анализа MSD Standard Bind (MSD Part #L15XA-3) наносили покрытие в течение ночи при 4°C 50 мкл 1 мкг/мл анти-BTLA клона 10D8 (APE10134). На следующий день планшет с покрытием промывали 3 раза 1XPBST и блокировали с использованием 250 мкл блокирующего буфера в течение 60-120 минут. Диапазон калибровочной кривой для BTLA составлял 500-7,8 нг/мл с количественным диапазоном 500-7,8 нг/мл. Стандарты готовили с использованием серии двукратных разведений в 100% сыворотке яванского макака. Также были подготовлены и заморожены в 100% сыворотке яванского макака контроли качества (QC) в пяти различных концентрациях, охватывающих количественный диапазон. Затем все стандарты, образцы и контроли разводили в буфере для анализа, содержащем 100 мкг/мл 6G3 IgG4, при минимально необходимом разведении (MRD) 1:10 и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре на шейкере. После блокировки планшеты промывали 1XPBST и 50 мкл разведенных стандартов, образцы и QC инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре на шейкере при 400-500 об/мин. После инкубации образцов планшеты промывали 3 раза в 1X PBST и в каждую лунку добавляли 50 мкл 0,25 мкг/мл биотинилированного поликлонального антитела против BTLA (PA5-95592 от ThermoFisher) и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре на шейкере. Затем планшеты промывали 3 раза 1X PBST. Затем в каждую лунку добавляли по 50 мкл реагента для вторичного детектирования Стрептавидин-сульфо-метку с концентрацией 0,2 мкг/мл на лунку и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре на шейкере. Затем планшеты промывали в последний раз 3 раза 1X PBST. В каждую лунку добавляли по 150 мкл 2X MSD Буфера для считывания T на лунку и планшет считывали с помощью планшет-ридера MSD Quickplex. Стандарты, образцы и контрольные повторы тестировали в двух повторах, а концентрации в сыворотке рассчитывали обратно на основе эталонных стандартных кривых для ведущего кандидата с использованием SoftMax Pro 7.01 и 4-параметрической аппроксимации кривой со взвешиванием $1/y^2$.

[0182] Перед началом метода квалификации влияние сывороточного матрикса оценивали для антитела 6G3 IgG4. Эффектов матрикса не наблюдалось, и было выбрано минимально необходимое разведение (MRD) 1:10.

[0183] Антитело 10D8 (APE10134) использовали в качестве захватывающего антитела. Было обнаружено, что связывание 10D8 с BTLA повышалось в присутствии антитела 6G3 IgG4 потенциально за счет конформационных изменений BTLA при связывании с 6G3 IgG4 в сыворотке яванского макака. Для нормализации предполагаемых конформационных изменений BTLA к буферу для разведения и всем стандартам, образцам и контролям добавляли 100 мкг/мл 6G3, разводили в соответствии с MRD 1:10 и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре на шейкере перед для добавления образцов в планшет MSD с покрытием 10D8.

[0184] Стандартные кривые с 500, 50, 5, 0,5 и 0 мкг/мл 6G3 IgG4 разводили в

буфере для анализа, содержащем 100 мкг/мл 6G3 IgG4, при MRD 1:10 для оценки (%RE) и прецизионности (%CV) BTLA. Все пять условий стандартной кривой, инкубированные с 100 мкг/мл 6G3 IgG4, имели стандартные концентрации в диапазоне количественного анализа и соответствовали критериям приемлемости средней восстановленной концентрации (%RE), находящейся в пределах 20% от номинальной концентрации. Усредненные результаты прецизионности (%CV) соответствовали критериям приемлемости и не превышали 20% для всех образцов. Суммарная ошибка в процентах (%TE) не превышала 30% для BTLA.

[0185] Точность между анализами (%RE) и прецизионность (%CV) оценивали в течение шести циклов анализов, проведенных в 2 разных дня, и включали калибровочную кривую на каждом планшете и пять уровней QC, которые определяли количественный диапазон. Были оценены пять уровней QC: ULOQ (500 нг/мл), HQC (400 нг/мл), MQC (62,4 нг/мл), LQC (15,6 нг/мл) и LLOQ (7,8 нг/мл). На каждом уровне контроля качества за прогон анализировали в общей сложности 3 независимых повтора в двух экземплярах. Средние результаты точности (%RE) для всех контролей и стандартных концентраций в диапазоне количественного анализа соответствуют критериям приемлемости средней восстановленной концентрации, находящейся в пределах 20% от номинальной концентрации. Усредненные результаты прецизионности (%CV) соответствовали критериям приемлемости и не превышали 20% для всех образцов. Процентная общая ошибка (%TE) не превышала 30% для BTLA ни для стандартных кривых, ни для контроля качества для любых концентраций в количественном диапазоне анализа.

[0186] Точность внутри анализа (% RE) и прецизионность (% CV) метода оценивали в одном цикле с шестью независимыми повторами пяти уровней QC. Средние результаты точности (%RE) для контролей соответствовали критериям приемлемости средней восстановленной концентрации, находящейся в пределах 20% от номинальной концентрации. Усредненные результаты прецизионности (%CV) соответствовали критериям приемлемости и не превышали 20%.

[0187] Линейность разведения оценивали путем проведения ряда разведений на образцах с концентрациями BTLA, которые превышали ULOQ, чтобы продемонстрировать, что высокие концентрации испытуемого образца могут быть разбавлены до количественного диапазона и что анализ не имеет эффекта прозоны. Образцы разводили до количественного диапазона анализа и оценивали обратно рассчитанные концентрации. Усредненные результаты показывают, что возможно разведение образцов до количественного диапазона с коэффициентом разведения до 1:1600. При оцениваемых концентрациях не наблюдалось «эффекта высокой дозы» прозоны.

[0188] Результаты показывают, что анализ является чувствительным и воспроизводимым для оценки концентраций BTLA в сыворотке, полученной в исследованиях на яванских макаках, которым вводили 6G3 IgG4.

ПРИМЕР 17

[0189] Следующий пример иллюстрирует использование сэндвич-анализа электрохемилюминесценции (ECL) для количественного определения растворимого BTLA в сыворотке яванского макака и плазме мыши NOD scid.

[0190] На 96-луночные планшеты для анализа MSD Standard Bind (MSD Part #L15XA-3) наносили покрытие в течение ночи при 4°C 50 мкл 1,0 мкг/мл реагента захвата анти-BTLA клона 10D8 (APE10134). На следующий день планшет с покрытием промывали 3 раза 1X PBST и блокировали с использованием 250 мкл блокирующего буфера в течение 60-120 минут. Диапазон калибровочной кривой для sBTLA составлял 7,8-500 нг/мл с количественным диапазоном 7,8-500 нг/мл в сыворотке яванского макака и 2-1000 нг/мл как для калибровки, так и для количественного диапазона в плазме мыши CD1. Стандарты готовили с использованием серии двукратных разведений в 100% видоспецифичной матрице. Контроли качества (QC) также готовили и замораживали в 100% видоспецифичной матрице при пяти различных концентрациях, охватывающих количественный диапазон. Затем все стандарты, образцы и контроли разводили в буфере для анализа, содержащем 100 мкг/мл 6G3, при минимально необходимом разведении (MRD) 1:10 и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре на шейкере.

[0191] После блокировки планшеты промывали 1X PBST и 50 мкл разведенных стандартов, образцов и QC инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре на шейкере при 400-500 об/мин. После инкубации образцов планшеты промывали 3 раза в 1X PBST и в каждую лунку добавляли 50 мкл 0,25 мкг/мл биотинилированного антитела для детектирования клона BTLA PA5-95592 (VC2963104B) и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре на шейкере. Затем планшеты промывали 3 раза 1X PBST. Затем в каждую лунку добавляли по 50 мкл реагента для вторичного детектирования Стрептавидин-сульфо-метку с концентрацией 0,2 мкг/мл на лунку и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре на шейкере. Затем планшеты промывали в последний раз 3 раза 1X PBST. В каждую лунку добавляли по 150 мкл 2X MSD Буфера T для считывания на лунку и планшет считывали с помощью планшет-ридера MSD Quickplex. Реплики стандартов, образцов и контролей тестировали в повторах, а концентрации рассчитывали обратно на основе эталонных стандартных кривых для BTLA с использованием SoftMax Pro 7.01 и 4-параметрической аппроксимации кривой со взвешиванием $1/y^2$.

[0192] Мышам NOD Scid с трансплантированными РВМС человека (n=19) вводили дозу антитела 6G3 IgG4 (APE13308) в трех дозовых группах (1, 3 и 10 мг/кг внутрибрюшинно). Животные, которым вводили IgG4 контроля изотипа (10 мг/кг) или CTLA-4-Ig (75 мкг), служили в качестве контролей. Животным вводили дозы два раза в неделю, а образцы плазмы собирали в середине исследования посредством сердечного кровотечения. Результаты представлены на Фигуре 15. Кроме того, циркулирующие человеческие Т-клетки анализировали с помощью проточной цитометрии, чтобы охарактеризовать экспрессию BTLA, подсчитать человеческие Т-клетки и охарактеризовать маркер активации CD25. Результаты показаны на Фигуре 19. 6G3 IgG4

снижал экспрессию ВТЛА на Т-клетках человека, ингибировал экспансии Т-клеток дозозависимым образом и снижал экспрессию маркера активации CD25 при всех дозах.

[0193] Образцы крови анализировали у яванских макак из двух исследований. Первое исследование (n=180) состояло из трех групп дозирования (10 мг/кг внутривенно, 10 мг/кг подкожно и 1 мг/кг подкожно). Всем животным вводили однократную дозу 6G3 IgG4 внутривенно или подкожно, и образцы крови собирали у всех животных во всех группах до введения дозы, через 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 168, 240, 336, 504, 672, и 840 часов после введения дозы. Образцы до введения дозы и животные, получавшие контрольную дозу носителя, служили в качестве контролей. Результаты представлены на Фигуре 16.

[0194] Во втором исследовании яванским макакам (n=380) вводили 6G3 в четырех дозовых группах (10, 50 и 100 мг/кг подкожно и 100 мг/кг внутривенно). Всем животным вводили еженедельную дозу 6G3 IgG4 в дни 1, 8 и 15 либо внутривенно, либо подкожно, и образцы крови собирали у всех животных во всех группах в дни 1, 8 и 15: до введения дозы, через 3, 24, 48, 72, 96 часов после введения. Результаты представлены на Фигуре 17. Также измеряли сывороточные уровни 6G3 IgG4. Результаты представлены на Фигуре 18.

[0195] Не детектировали измеримого уровня sВТЛА в образцах мышей NOD scid с трансплантированными РВМС человека, которым вводили IgG4 контроля изотипа или СТЛА-4-Ig, или в образцах яванских макак до введения дозы или контрольного носителя из исследований на яванских макаках. Выделение sВТЛА детектировали в образцах сыворотки всех яванских макак и во всех образцах плазмы мышей NOD scid с трансплантированными РВМС человека, которым вводили 6G3 IgG4, за исключением группы с самой низкой дозой (1 мг/кг) в исследовании на мышах. Результаты позволяют предположить, что ВТЛА сбрасывается с поверхности В- и Т-клеток и что sВТЛА является фармакодинамическим маркером активности 6G3 IgG4 *in vivo*.

ПРИМЕР 18

[0196] Этот пример демонстрирует, что 6G3 IgG4 достигает занятости рецептора и снижает экспрессию ВТЛА на Т- и В-клетках у яванских макак.

[0197] Проточную цитометрию использовали для анализа периферической крови яванских макак на предмет эффектов многократных доз 6G3 IgG4 в исследовании определения диапазона доз (DRFS). Животным вводили 6G3 IgG4 в четырех различных группах обработки (10 мг/кг подкожно, 50 мг/кг подкожно, 100 мг/кг подкожно, 100 мг/кг внутривенно) и одной контрольной группе.

[0198] 6G3 IgG4 не вызывал значительных изменений абсолютного количества Т-клеток, В-клеток и NK-клеток или процентного распределения по сравнению с контрольными животными, тестируемыми с носителем. Связывание меченого флуорохромом лекарственного средства (6G3 IgG4-DyL488) прекращалось у всех животных, которым вводили 6G3 IgG4, по сравнению с контрольной группой, получавшей носитель, демонстрируя, что занятость рецептора ВТЛА 6G3 IgG4 составляет >80% для Т-клеток и ~70% для В-клеток, как показано на Фигуре 20.

[0199] У всех животных дозы 6G3 IgG4 снижали поверхностную экспрессию ВТЛА

на Т- и В-клетках при детектировании меченным флуорохромом неконкурирующим антителом против ВТЛА (клон 10D8) по сравнению с контрольными животными, получавшими носитель. Поверхностная экспрессия ВТЛА на Т- и В-клетках была снижена на ~75% и ~50% соответственно, как показано на Фигуре 20.

[0200] Было обнаружено, что существует разница в кинетике занятости рецепторов на Т- и В-клетках, которая происходит очень быстро, по сравнению с потерей экспрессии ВТЛА на Т- и В-клетках, которая происходит относительно медленно. Это предполагает, что механизм, зависящий от 6G3 IgG4, приводит к сбросу ВТЛА. У двух животных, у которых вырабатывались антилекарственные антитела (ADA), наблюдалась некоторая потеря занятости рецепторов и восстановление экспрессии ВТЛА на Т- и В-клетках.

ПРИМЕР 19

[0201] Этот пример демонстрирует, что внеклеточный домен ВТЛА (ECD) расщепляется сериновой протеазой 3 в предполагаемом сайте узнавания рядом с трансмембранным доменом.

[0202] Протеиназа 3 (PR3) представляет собой сериновую протеазу нейтрофилов, которая высвобождается во внеклеточное пространство при активации нейтрофилов. Ранее было показано, что PR3 расщепляет рецептор контрольной точки Т-клеточный иммуноглобулин и муциновый домен 3 (TIM-3), снижая уровень TIM-3 на поверхности клеток.

[0203] Шесть разных дорожек инкубировали до 60 минут с очищенным рекомбинантным PR3 и/или ВТЛА-ECD. Они состояли из (1) контроля PR3, (2) контроля PR3 60 м, (3) контроля ВТЛА, (4) PR3+ВТЛА 0 м, (5) PR3+ВТЛА 30 м и (5) PR3+ВТЛА 60 м.

[0204] После совместной инкубации растворимый ВТЛА-ECD расщеплялся на несколько более мелких фрагментов, демонстрируя, что PR3 обладает способностью расщеплять ВТЛА. Анализ последовательности предположил существование по меньшей мере одного мотива распознавания PR2 в направлении С-конца ВТЛА-ECD.

ПРИМЕР 20

[0205] Этот пример демонстрирует, что 6G3 IgG4 снижает пролиферацию Т-клеток и поверхностную экспрессию ВТЛА у здоровых контролей (НС) и доноров с atopическим дерматитом (AD).

[0206] РВМС доноров НС или AD метили 0,5 мкМ CFSE, а затем стимулировали растворимым анти-CD3 (0,5 нг/мл, Biolegend, кат. № 300332) и растворимым анти-CD28 (0,5 нг/мл, Biolegend, кат. № 302943) в присутствии или в отсутствие 100 нМ 6G3 IgG4 или контроля изотипа (IgG4-HuHel) в течение 72 часов. Пролиферирующие клетки определяли с помощью разведения CFSE.

[0207] На ФИГ. 21А представлены гистограммы CFSE доноров НС и AD, показанные как наложенные гистограммы контроля изотипа на CD3⁺ Т-клетках, обработанных 6G3 IgG4. На ФИГ. 21В показано процентное снижение пролиферации Т-клеток в отношении пролиферации (слева) и индекса деления (справа). Индекс деления

представляет собой сумму числа делений в каждом поколении, деленную на количество исходных клеток, и рассчитывается с помощью программного обеспечения NovoExpress для автоматического анализа пролиферации клеточного цикла. Уровни IFN γ в супернатанте культуры HC и AD доноров PBMC измеряли с помощью анализа Mesoscale MDS после 72-часовой стимуляции анти-CD3 и анти-CD28 в присутствии или в отсутствие 100 нМ 6G3 IgG4 или контроля изотипа. Результаты показаны на Фигуре 21C. На ФИГ. 21D показана поверхностная экспрессия BTLA (построенная как средняя интенсивность флуоресценции (MFI)) на CD3+ Т-клетках доноров HC и AD, определенная с помощью AF647-конъюгированного анти-BTLA (клон № 10D8, AnaptyBio.)

[0208] Результаты показывают, что 6G3 IgG4 снижает пролиферацию Т-клеток и поверхностную экспрессию BTLA по сравнению с контролем.

[0209] Все ссылки, включая публикации, заявки на патенты и патенты, цитируемые в настоящем описании, настоящим включены в качестве ссылки в той же степени, как если бы каждая ссылка была отдельно и специально указана для включения в качестве ссылки и представлена здесь полностью.

[0210] Использование терминов в единственном числе и «по меньшей мере один» и подобных ссылок в контексте описания изобретения (особенно в контексте последующей формулы изобретения) должно толковаться как охватывающее как единственное, так и множественное число, если иное не указано в настоящем описании или явно не противоречит контексту. Использование термина «по меньшей мере один», за которым следует список из одного или более элементов (например, «по меньшей мере один из А и В»), следует понимать как означающий один элемент, выбранный из перечисленных элементов (А или В), или любая комбинация двух или более перечисленных элементов (А и В), если иное не указано в настоящем описании или явно не противоречит контексту. Термины «содержащий», «имеющий» и «включающий» следует толковать как неограничивающие термины (т. е. означающие «включая, но не ограничиваясь»), если не указано иное. Перечисление диапазонов значений в настоящем описании просто предназначено для того, чтобы служить кратким способом индивидуальной ссылки на каждое отдельное значение, попадающее в этот диапазон, если в настоящем описании не указано иное, и каждое отдельное значение включается в описание, как если бы оно было отдельно указано в настоящем описании. Все способы, описанные в настоящем документе, могут осуществляться в любом подходящем порядке до тех пор, пока в настоящем описании не указано иное или иное очевидно не следует из контекста. Использование любых и всех примеров или примерных формулировок (например, «такой как»), представленных в настоящем описании, предназначено просто для лучшего освещения изобретения и не налагает ограничения на объем изобретения, если не заявлено иное. Никакое выражение в описании не должно рассматриваться в качестве обозначения любого не заявленного элемента, существенного для практического применения изобретения.

[0211] В настоящем документе описаны предпочтительные варианты

осуществления настоящего изобретения, включая наилучший способ осуществления изобретения, известный авторам изобретения. Вариации этих предпочтительных вариантов осуществления могут стать очевидными для специалистов в данной области техники после прочтения вышеприведенного описания. Авторы изобретения ожидают, что квалифицированные специалисты будут использовать такие варианты в зависимости от обстоятельств, и авторы изобретения предполагают, что изобретение будет реализовано на практике иначе, чем конкретно описано в данном документе. Соответственно, настоящее изобретение включает все модификации и эквиваленты объекта изобретения, приведенного в прилагаемой формуле изобретения, согласно разрешению применимого законодательства. Кроме того, любая комбинация вышеописанных элементов во всех возможных их вариантах охвачена изобретением, если иное не указано в настоящем описании или иное явно не противоречит контексту.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. BTLA-связывающий агент, содержащий:

вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую:

(a) CDRH1, содержащую X^1SX^2MN (SEQ ID NO: 195), где X^1 представляет собой N или T, и X^2 представляет собой W, F, H, G, P, R, K, D, S, L, V, N или Y

(b) CDRH2, содержащую $RIYPX^1GX^2X^3DTNYX^4GKFK$ (SEQ ID NO: 196), где:

X^1 отсутствует или представляет собой A;

X^2 представляет собой D, Y, Q, G, L, F, H, S, P, R или T;

X^3 представляет собой G, Y, A, F, S, D, V, T, E, K или R; и

X^4 представляет собой N, V, Q, R, A, F, Y, S, G, P или T;

и

(c) CDRH3, содержащую $X^1SGTFX^2X^3GNYX^4X^5YFDV$ (SEQ ID NO: 197), где:

X^1 представляет собой K или R;

X^2 представляет собой N или D;

X^3 представляет собой D, S, F, Y, F, V, S, G, T, R, I, L или E;

X^4 представляет собой R или H; и

X^5 представляет собой W, R, F, L, N, Y, P, I, V, A, S, G, R или K;

или содержащую вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина любой из SEQ ID NO: 43-156 или по меньшей мере ее CDR; или аминокислотную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90% идентичности последовательности;

и

вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина, содержащую:

(a) CDRL1, содержащую $RX^1SENIYX^2X^3LA$ (SEQ ID NO: 198), где

X^1 представляет собой A или V;

X^2 представляет собой S или N; и

X^3 представляет собой H, N или Y;

(b) CDRL2, содержащую $X^1AX^2NLAX^3$ (SEQ ID NO: 199), где

X^1 представляет собой A или N;

X^2 представляет собой T или K; и

X^3 представляет собой N, L, Q, G, F, V, K, S, R, T, H или P; и

(c) CDRL3, содержащую QX^1FX^2GPPLT (SEQ ID NO: 200), где

X^1 представляет собой L или H; и

X^2 представляет собой W, F, Y, P, N, V, K, M, L, G или S;

или содержащую вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина любой из SEQ ID NO: 157-192 или по меньшей мере ее CDR; или аминокислотную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90% идентичности последовательности;

или BTLA-связывающий агент как указано в Таблице 3.

2. BTLA-связывающий агент по п. 1, где полипептид тяжелой цепи

X¹⁰ представляет собой F или Y;

X¹¹ представляет собой L или H;

X¹² представляет собой W, F, Y, P, N, V, K, M, L, G, S.

5. BTLA-связывающий агент по любому из пп. 1-4, где полипептид легкой цепи иммуноглобулина содержит любую из SEQ ID NO: 157-192 или по меньшей мере ее CDR; или аминокислотную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90% идентичности последовательности.

6. BTLA-связывающий агент по любому из пп. 1-5, содержащий

(a) CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 201;

(b) CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 202;

(c) CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 203;

(d) CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 204;

(e) CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 205; и

(f) CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 206.

7. BTLA-связывающий агент по любому из пп. 1-5, содержащий переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 144 или по меньшей мере ее CDR; и переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 174 или по меньшей мере ее CDR; или содержащий переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющую 90% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 144, и переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 174.

8. BTLA-связывающий агент, содержащий:

переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую:

(a) CDRH1, содержащую AspTyrThrIleHis (SEQ ID NO: 27),

(b) CDRH2, содержащую TrpIleTyrProGlySerGlyAsnThrLysTyrAsnAspLysPheLysXaa (SEQ ID NO: 30), где Xaa представляет собой аспарагиновую кислоту (Asp) или валин (Val);

(c) CDRH3, содержащую ArgXaa1Xaa2TyrXaa3MetXaa4Tyr (SEQ ID NO: 32), где:

Xaa1 представляет собой аспарагин (Asn) или серин (Ser),

Xaa2 представляет собой тирозин (Tyr) или гистидин (His),

Xaa3 представляет собой аланин (Ala) или валин (Val), и

Xaa4 представляет собой глутаминовую кислоту (Glu) или аспарагиновую кислоту (Asp);

или содержащую переменную область тяжелой цепи, содержащую любую из SEQ ID NO: 1-15, 207, 208, 217 или 218, или по меньшей мере ее CDR, или аминокислотную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90% идентичности последовательности;

и

переменную область легкой цепи иммуноглобулина, содержащую:

(a) CDRL1, содержащую LysAlaSerGlnAsnValPheThrAsnValAla (SEQ ID NO: 36);

(b) CDRL2, содержащую SerAlaSerTyrArgXaaSer (SEQ ID NO: 39), где Xaa

представляет собой тирозин (Tyr) или серин (Ser); и

(с) CDRL3, содержащую GlnGlnTyrXaa1Xaa2TyrProTyrThr (SEQ ID NO: 41), где:

Xaa1 представляет собой серин (Ser) или аспарагин (Asn), и

Xaa2 представляет собой треонин (Thr) или серин (Ser);

или содержащую переменную область легкой цепи, содержащую любую из SEQ ID NO: 16-25, 209, 210, 219 или 220, или по меньшей мере ее CDR, или аминокислотную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90% идентичности последовательности;

или

ВТЛА-связывающий агент, как указано в Таблице 2.

9. ВТЛА-связывающий агент по п. 87, где CDRH2 содержит SEQ ID NO: 31; и CDRH3 содержит SEQ ID NO: 33 или 34.

10. ВТЛА-связывающий агент по любому из пп. 8 или 9, где CDRL2 содержит SEQ ID NO: 40; и CDRL3 содержит SEQ ID NO: 42.

11. ВТЛА-связывающий агент по любому из пп. 8-10, где связывающий агент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Xaa1 Thr Xaa2 Thr Asp Tyr Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Asp Lys Phe Lys Xaa3 Arg Val Thr Ile Thr Xaa4 Asp Xaa5 Ser Xaa6 Xaa7 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Xaa8 Cys Ala Arg Arg Xaa9 Xaa10 Tyr Xaa11 Met Xaa12 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala (SEQ ID NO: 26), где:

Xaa1 представляет собой фенилаланин (Phe) или тирозин (Tyr),

Xaa2 представляет собой фенилаланин (Phe) или лейцин (Leu),

Xaa3 представляет собой аспарагиновую кислоту (Asp) или валин (Val),

Xaa4 представляет собой аланин (Ala) или аргинин (Arg),

Xaa5 представляет собой лизин (Lys) или треонин (Thr),

Xaa6 представляет собой аланин (Ala) или серин (Ser),

Xaa7 представляет собой серин (Ser) или треонин (Thr),

Xaa8 представляет собой тирозин (Tyr) или фенилаланин (Phe),

Xaa9 представляет собой аспарагин (Asn) или серин (Ser),

Xaa10 представляет собой тирозин (Tyr) или гистидин (His),

Xaa11 представляет собой аланин (Ala) или валин (Val), и

Xaa12 представляет собой глутаминовую кислоту (Glu) или аспарагиновую кислоту (Asp).

12. ВТЛА-связывающий агент по любому из пп. 8-11, где связывающий агент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую любую из SEQ ID NO: 1-15, 207, 208, 217 или 218, или по меньшей мере ее CDR, или аминокислотную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90% идентичности последовательности.

13. BTLA-связывающий агент по любому из пп. 8-12, где связывающий агент содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Phe Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Xaa Pro Lys Xaa Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Xaa Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Xaa Cys Gln Gln Tyr Xaa Xaa Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg (SEQ ID NO: 35), где

Хaa1 представляет собой серин (Ser) или пролин (Pro),

Хaa2 представляет собой пролин (Pro) или лейцин (Leu),

Хaa3 представляет собой тирозин (Tyr) или серин (Ser),

Хaa4 представляет собой тирозин (Tyr) или фенилаланин (Phe),

Хaa5 представляет собой серин (Ser) или аспарагин (Asn), и

Хaa6 представляет собой треонин (Thr) или серин (Ser).

14. BTLA-связывающий агент по любому из пп. 8-13, где связывающий агент содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую любую из SEQ ID NO: 16-25, 209, 210, 219 или 220, или по меньшей мере ее CDR, или аминокислотную последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90% идентичности последовательности.

15. BTLA-связывающий агент по любому из пп. 1-14, который представляет собой антитело, конъюгат антитела или его антигенсвязывающий фрагмент, необязательно антитело IgG1 или IgG4.

16. BTLA-связывающий агент по п. 15, который представляет собой фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fab', фрагмент Fab, фрагмент Fv, фрагмент scFv, фрагмент dsFv, фрагмент dAb или одноцепочечный связывающий полипептид.

17. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид тяжелой цепи и/или легкой цепи иммуноглобулина BTLA-связывающего агента по любому из пп. 1-16, необязательно в векторе.

18. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 17.

19. Композиция, содержащая (а) BTLA-связывающий агент по любому из пп. 1-16 или нуклеиновую кислоту, кодирующую его, и (б) фармацевтически приемлемый носитель.

20. Способ модулирования передачи сигналов BTLA у млекопитающего, включающий введение млекопитающему BTLA-связывающего агента по любому из пп. 1-16, нуклеиновой кислоты, кодирующей его, или содержащей его композиции.

21. Способ по п. 20, где у млекопитающего имеется расстройство, которое реагирует на модулирование BTLA, и таким образом расстройство подвергается лечению.

22. Способ по п. 21, где расстройство представляет собой аутоиммунное или воспалительное заболевание.

23. Способ по п. 21 или 22, где заболевание представляет собой ревматоидный

артрит, болезнь «трансплантат против хозяина», псориаз или воспалительное заболевание кишечника.

24. Способ получения ВТЛА-связывающего агента по любому из пп. 1-16, включающий экспрессию нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина, и нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи иммуноглобулина, в клетке.

25. Способ детектирования растворимого ВТЛА в крови, плазме, сыворотке или ткани, включающий контакт образца крови, плазмы, сыворотки или ткани с антителом по любому из пп. 8-14, необязательно где растворимый ВТЛА в образце крови, плазмы, сыворотки или ткани связан с антителом по любому из пп. 1-7, или где образец крови, плазмы, сыворотки или ткани контактирует с антителом по любому из пп. 8-14 и антителом по любому из пп. 1-7.

26. Способ детектирования, измерения или мониторинга фармакологической активности ВТЛА-связывающего агента у пациента или выбора пациента для лечения с использованием ВТЛА-связывающего агента, включающий детектирование растворимого ВТЛА (sВТЛА) в образце крови, плазмы, сыворотки или ткани пациента, которому был введен ВТЛА-связывающий агент.

27. Способ по п. 26, где ВТЛА-связывающий агент представляет собой антитело против ВТЛА.

28. Способ по п. 26 или 27, где ВТЛА-связывающий агент представляет собой антитело против ВТЛА, которое связывается с ВТЛА без существенного ингибирования связывания ВТЛА с HVEM, или которое связывается с ВТЛА и усиливает передачу сигналов ВТЛА.

29. Способ по любому из пп. 26-28, где ВТЛА-связывающий агент представляет собой ВТЛА-связывающий агент по любому из пп. 1-7.

30. Способ по любому из пп. 26-29, где способ включает детектирование sВТЛА в образце крови, плазмы, сыворотки или ткани путем контакта образца крови, плазмы, сыворотки или ткани или их фракции с захватывающим антителом против ВТЛА, которое связывается с sВТЛА.

31. Способ по п. 30, где захватывающее антитело против ВТЛА представляет собой антитело по любому из пп. 8-14.

32. Способ по любому из пп. 26-31, где способ дополнительно включает сравнение концентрации sВТЛА в образце крови, плазмы, сыворотки или ткани с эталонной концентрацией sВТЛА.

33. Способ по п. 32, где эталонная концентрация sВТЛА представляет собой концентрацию sВТЛА в образце крови, плазмы, сыворотки или ткани того же пациента до введения ВТЛА-связывающего агента; или концентрацию sВТЛА в крови, плазме, сыворотке или ткани другого нормального, не больного пациента того же типа, которому не вводили ВТЛА-связывающий агент, или эталонную концентрацию sВТЛА, установленную статистическим анализом концентрации sВТЛА в крови, плазме,

сыворотке или ткани популяции таких пациентов.

34. Способ по любому из пп. 26-33, дополнительно включающий стадию введения пациенту BTLA-связывающего агента.

35. Способ по любому из пп. 26-34, где способ включает сравнение концентрации sBTLA в образце крови, плазмы, сыворотки или ткани пациента, которому вводили BTLA-связывающий агент, с концентрацией sBTLA в образце крови, плазмы, сыворотки или ткани того же пациента в другой момент времени либо до, либо после введения пациенту BTLA-связывающего агента.

36. Способ по любому из пп. 26-36, где sBTLA, детектированный в образце крови, плазмы, сыворотки или ткани пациента, представляет собой sBTLA, связанный с BTLA-связывающим агентом.

37. Способ по п. 32, где эталонная концентрация sBTLA устанавливается способом, включающим контакт образца крови, плазмы, сыворотки или ткани пациента или образцов крови, плазмы, сыворотки или ткани популяции пациентов с BTLA-связывающим агентом по любому из пп. 1-7 и захватывающим антителом по любому из пп. 8-14.

38. Композиция, содержащая BTLA-связывающий агент по любому из пп. 1-7, BTLA-связывающий агент по любому из пп. 8-14 или их оба, для применения в способе по любому из пп. 20-37.

39. BTLA-связывающий агент по любому из пп. 8-14 для лечения расстройства, которое реагирует на модулирование BTLA у млекопитающего.

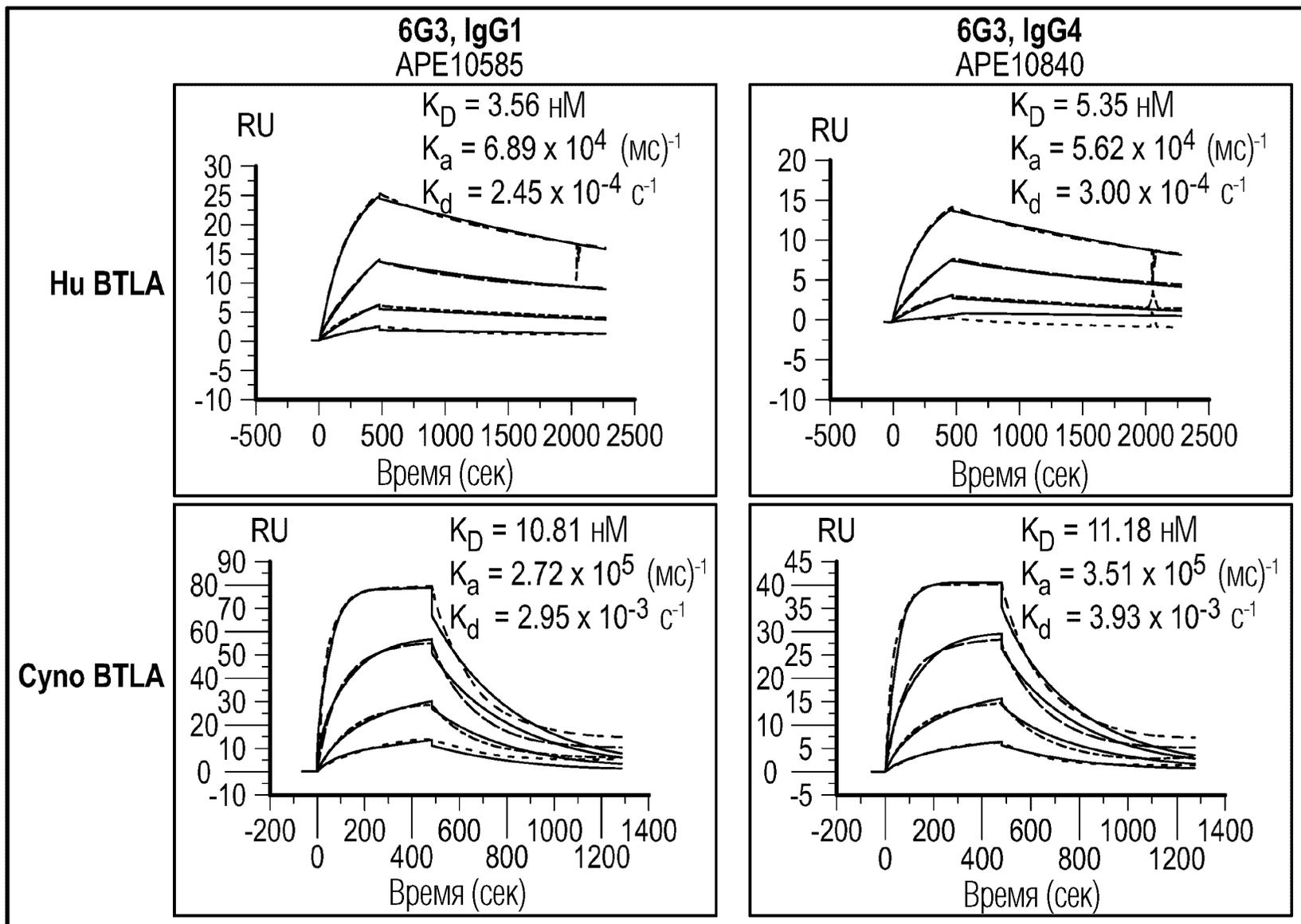
40. BTLA-связывающий агент по любому из пп. 1-7 для лечения расстройства, которое реагирует на модулирование BTLA у млекопитающего.

41. BTLA-связывающий агент по п. 40, где BTLA-связывающий агент содержит переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 144 или по меньшей мере ее CDR; и переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 174 или, по меньшей мере, ее CDR; или содержит переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющую 90% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 144, и переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 174.

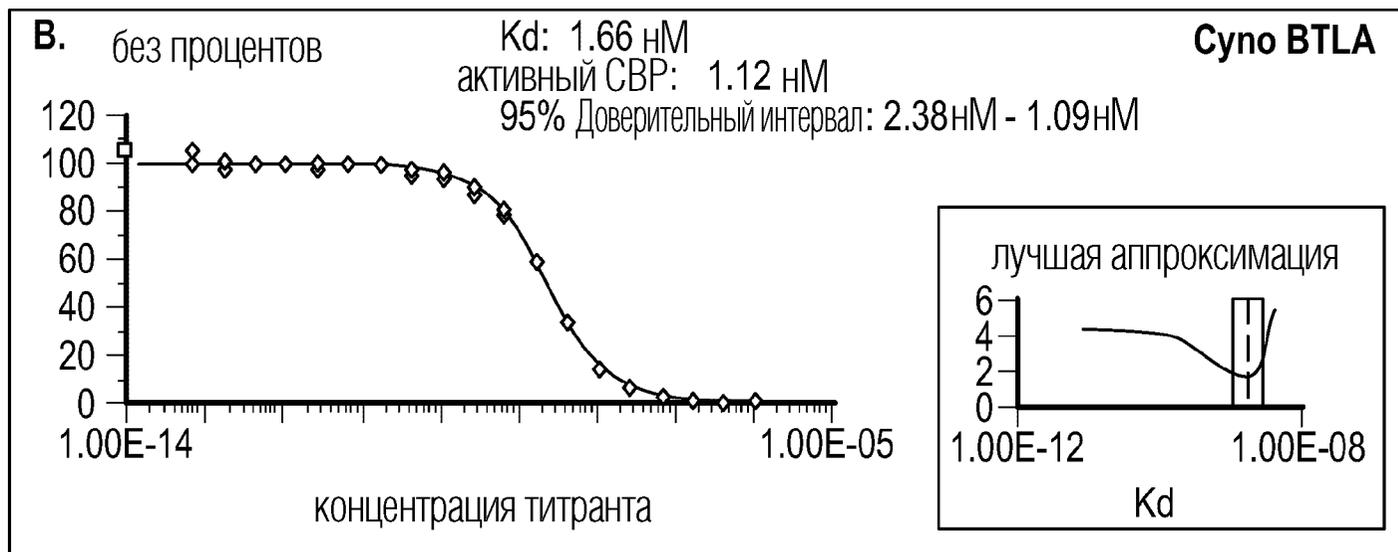
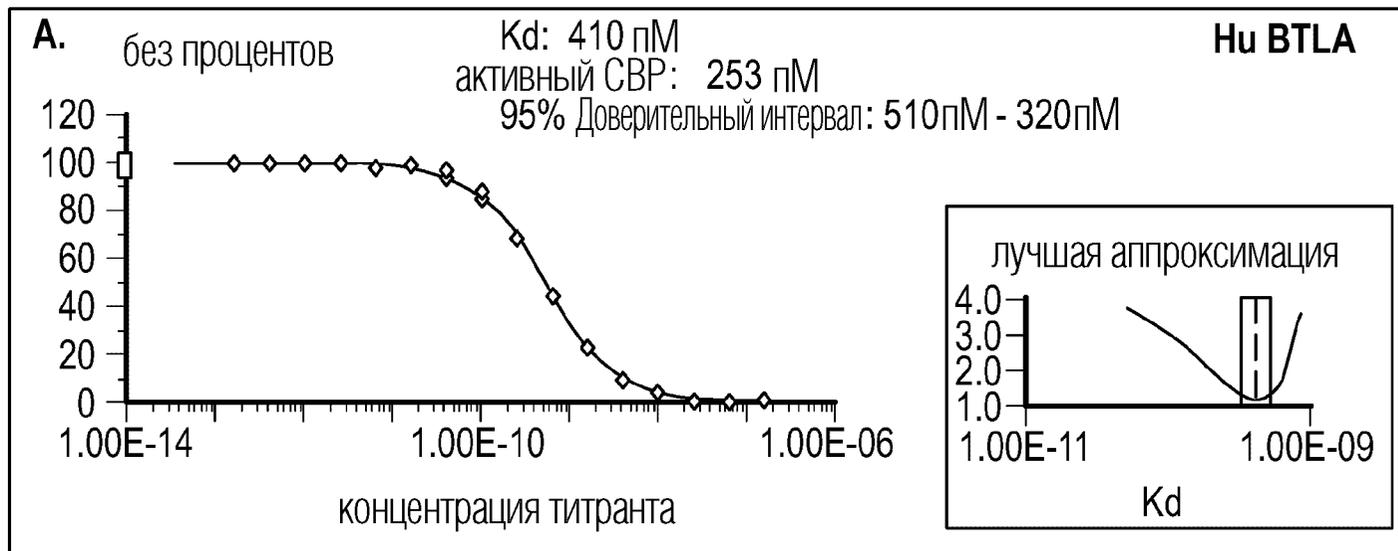
42. Способ по любому из пп. 39-41, где расстройство представляет собой аутоиммунное или воспалительное заболевание.

43. Способ по любому из пп. 39-41, где заболевание представляет собой ревматоидный артрит, болезнь «трансплантат против хозяина», псориаз или воспалительное заболевание кишечника.

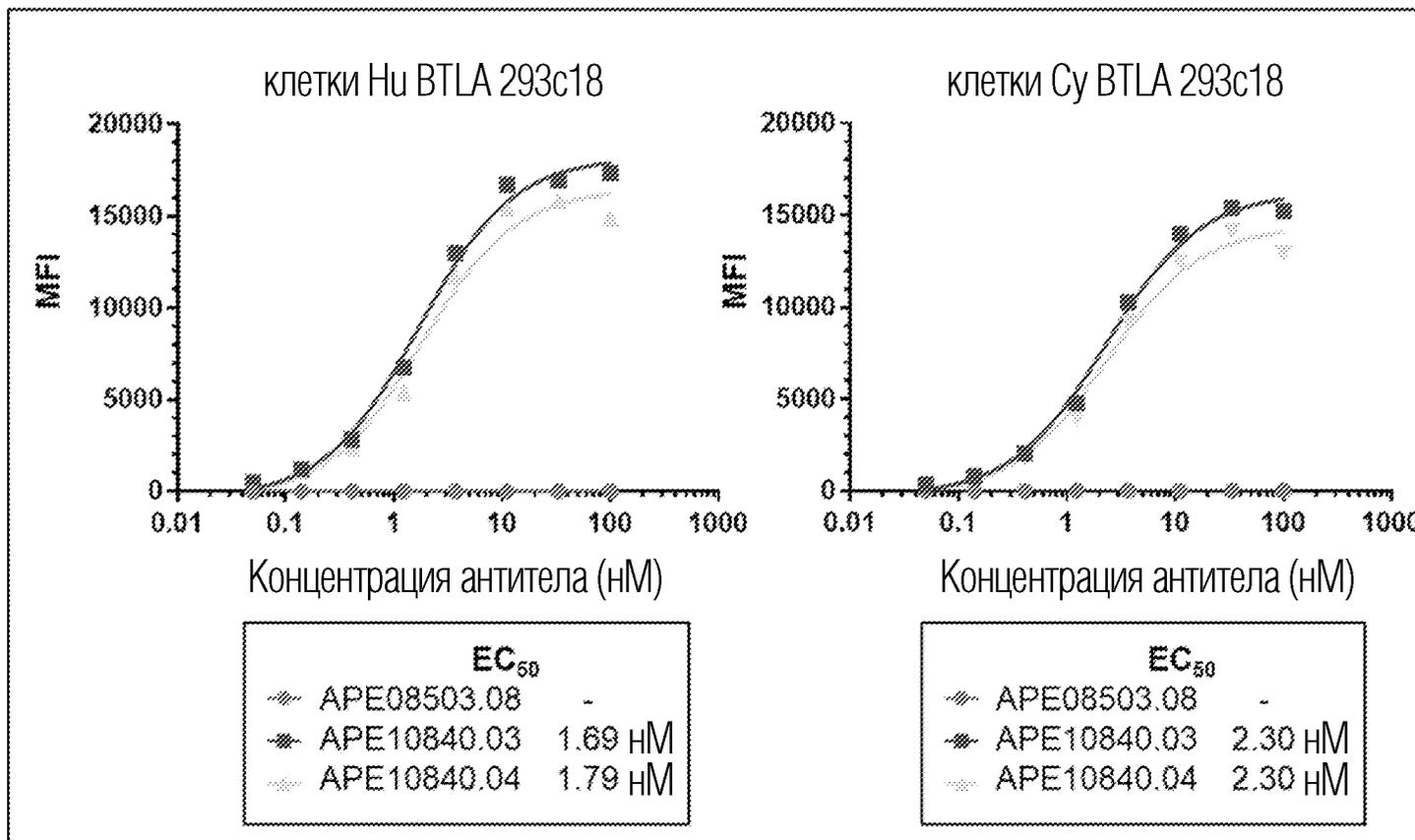
По доверенности



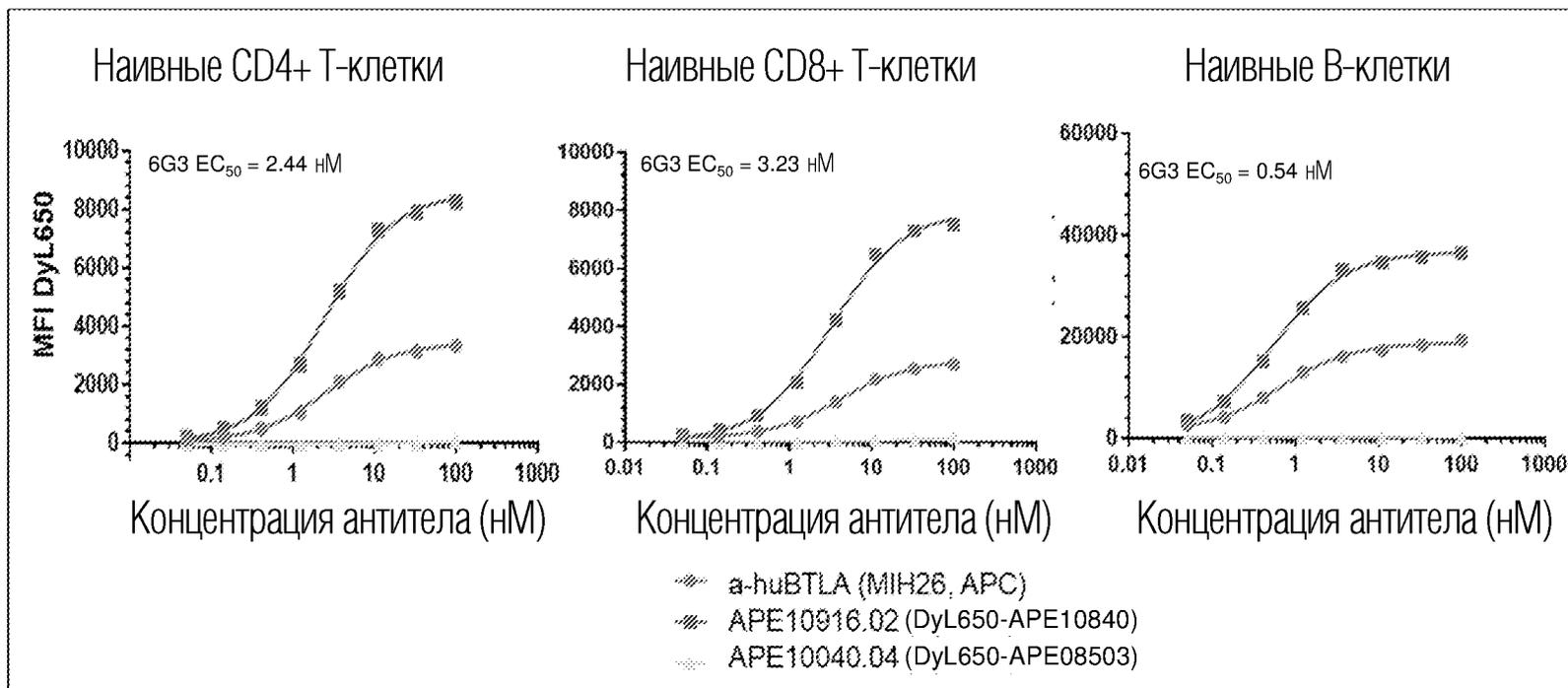
ФИГ. 1



ФИГ. 2

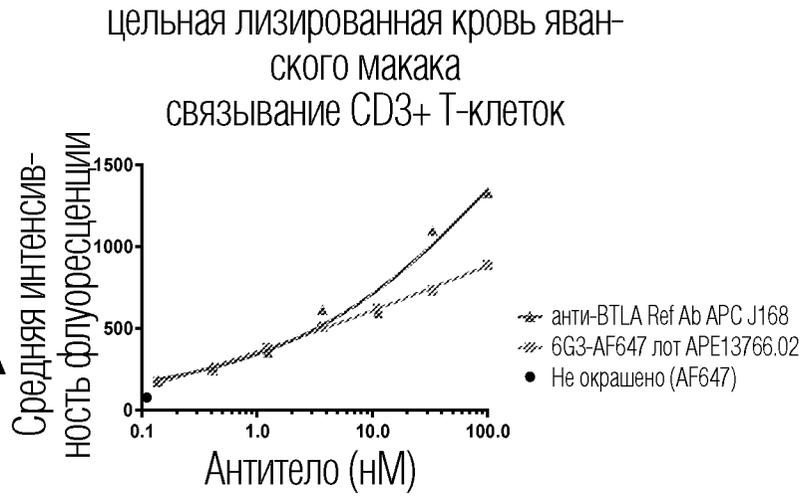


ФИГ. 3

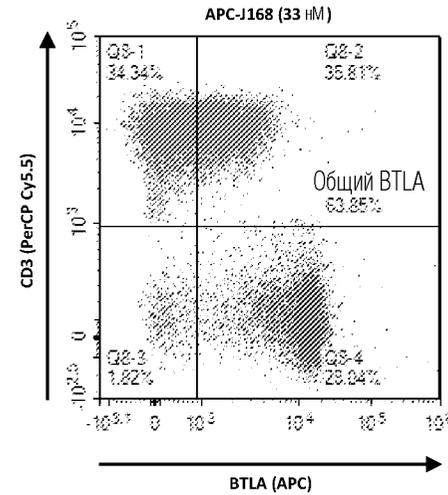
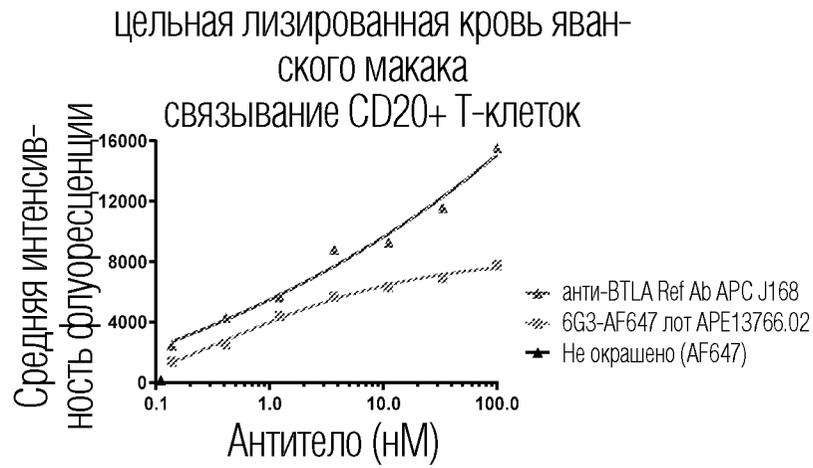


ФИГ. 4

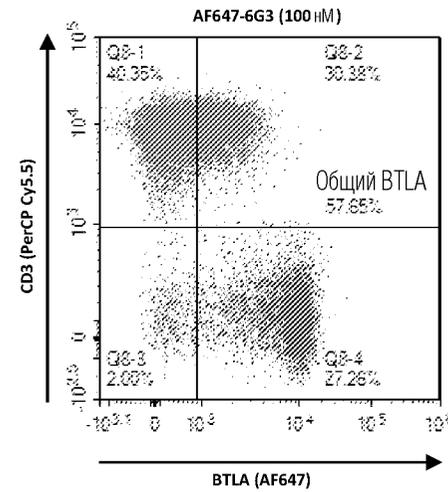
ФИГ. 5А



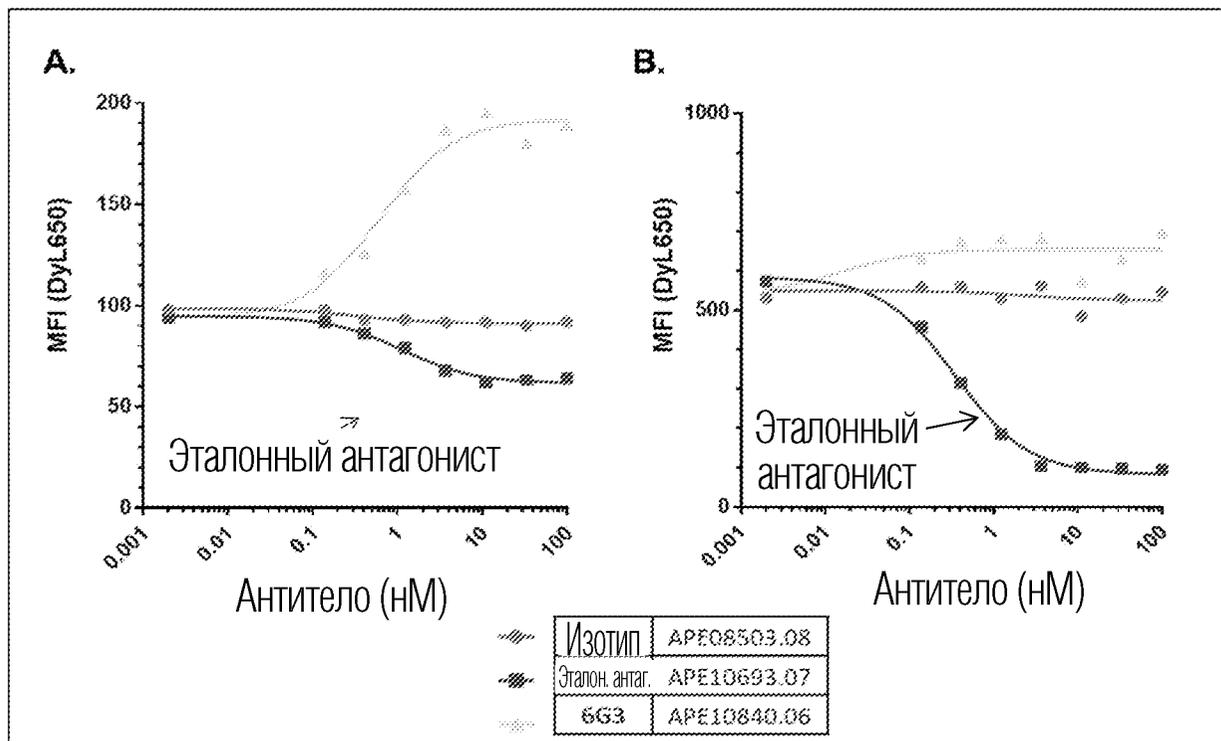
ФИГ. 5В



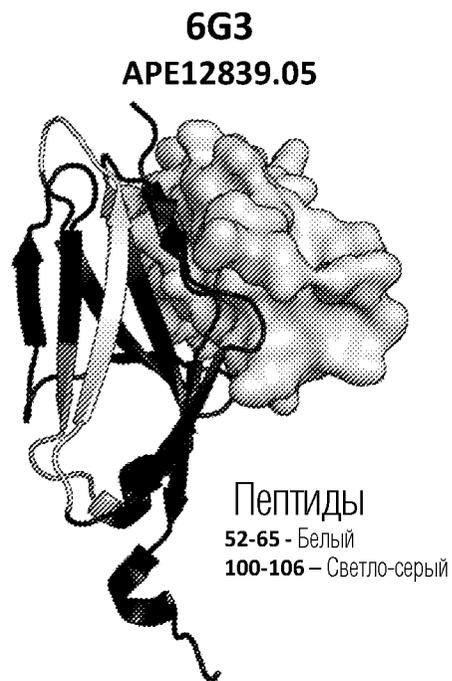
ФИГ. 5С



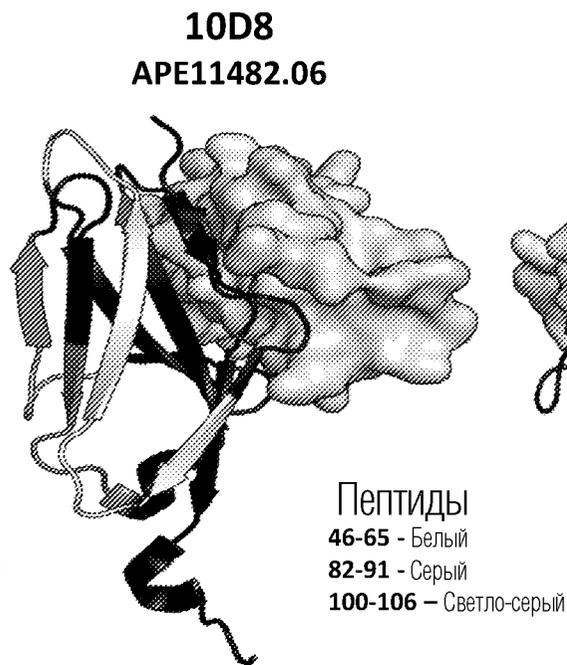
ФИГ. 5D



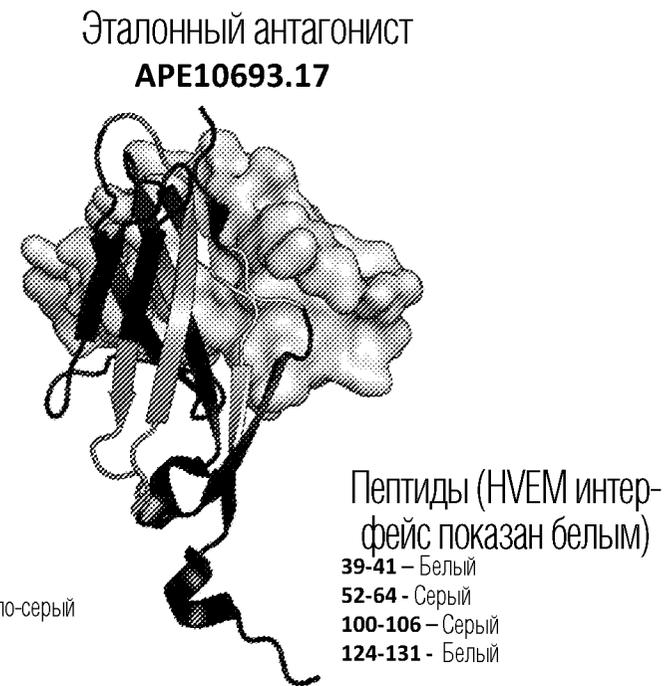
ФИГ. 6



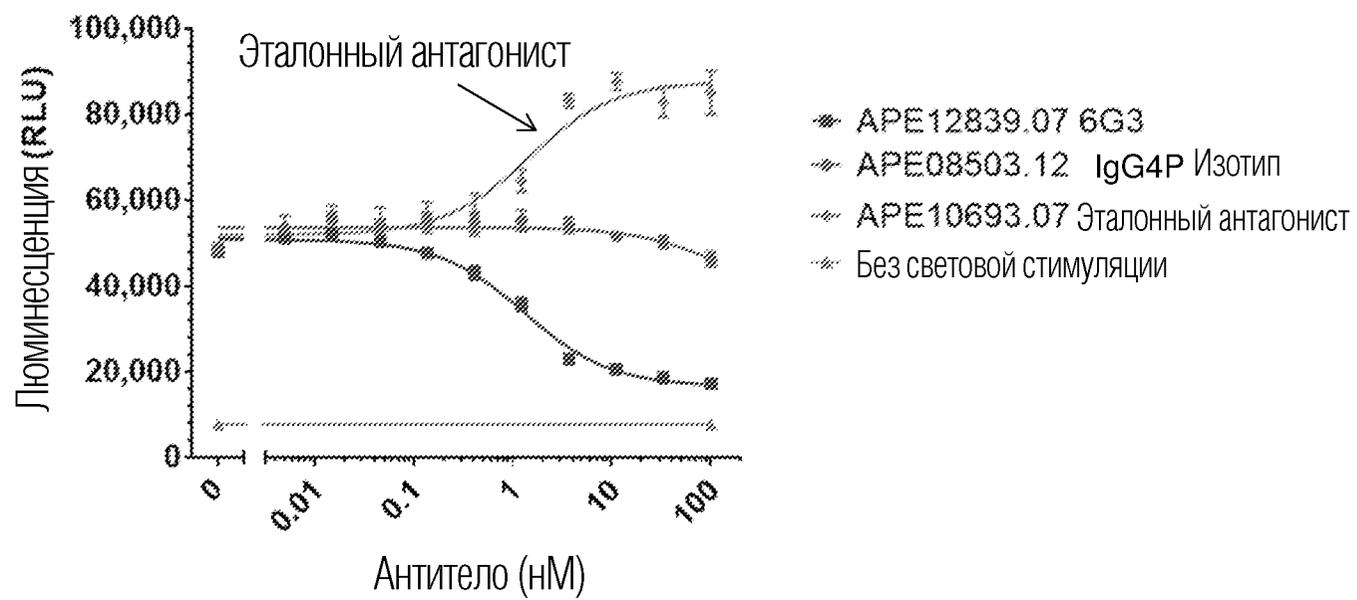
ФИГ. 7А



ФИГ. 7В

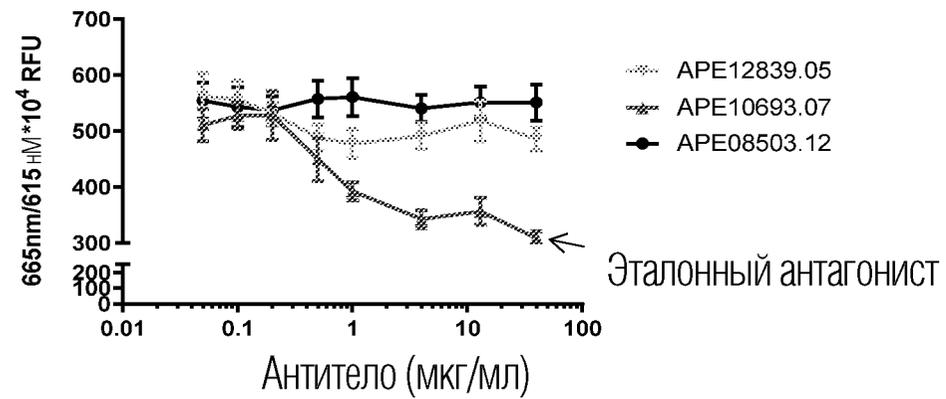


ФИГ. 7С

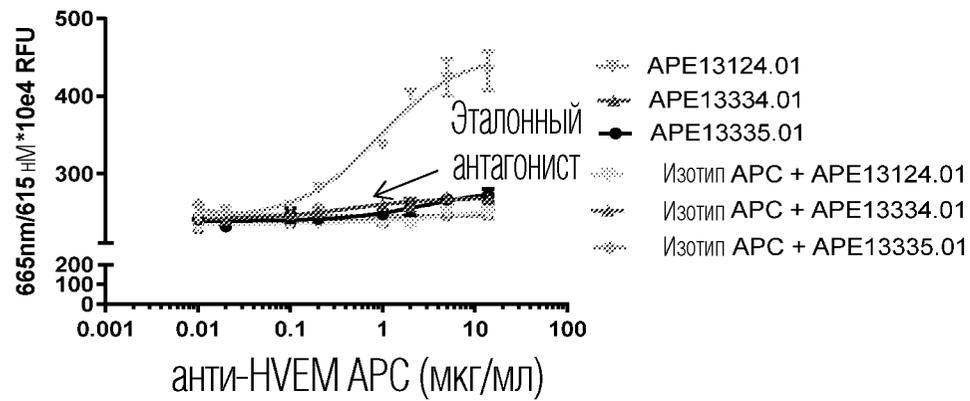


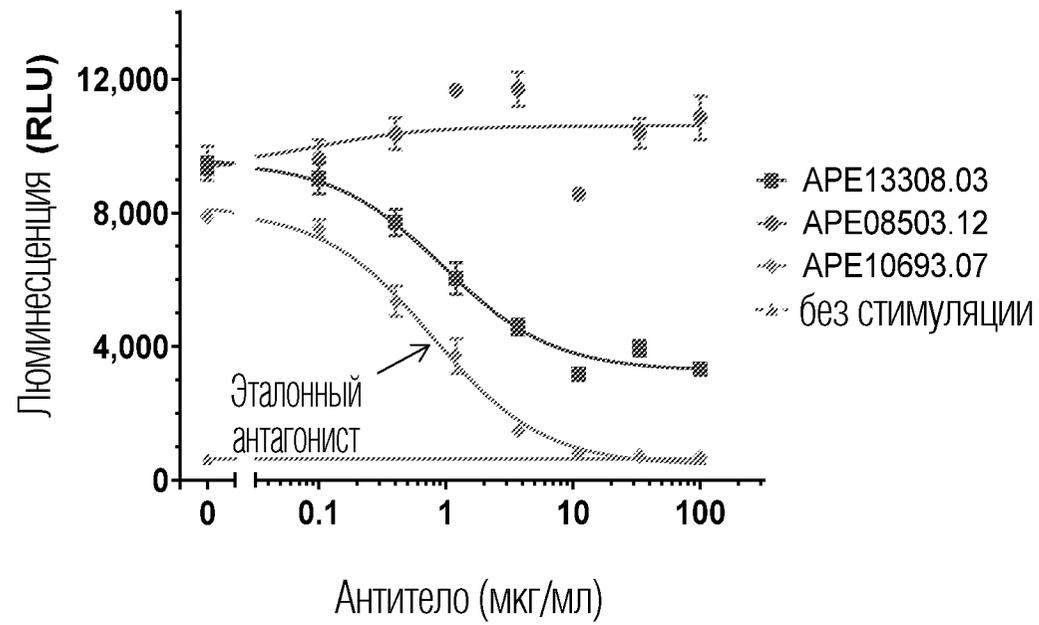
ФИГ. 8

ФИГ. 9А

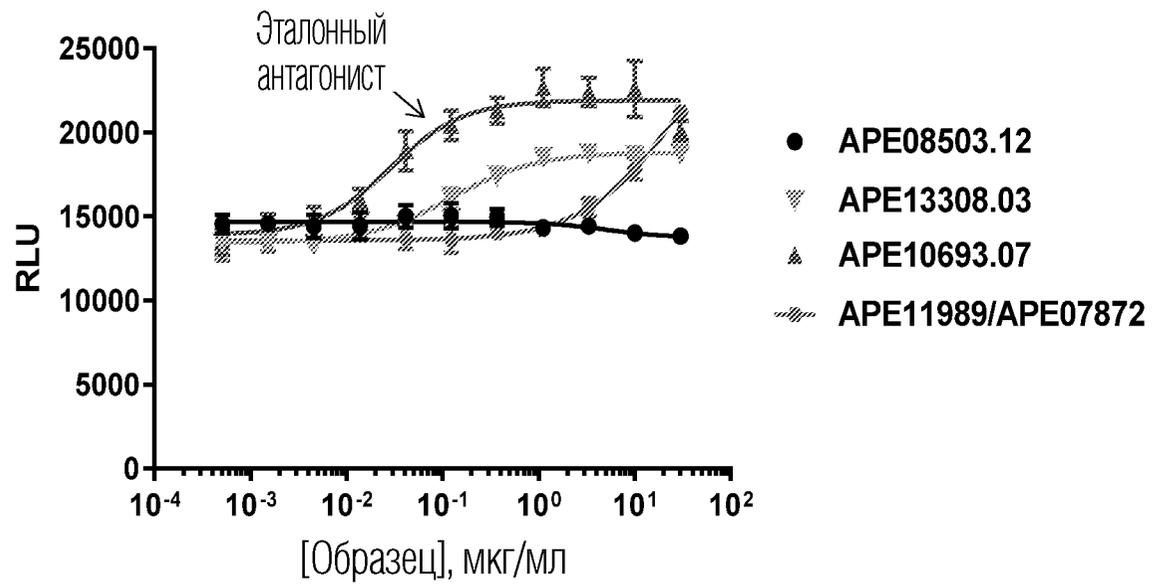


ФИГ. 9В

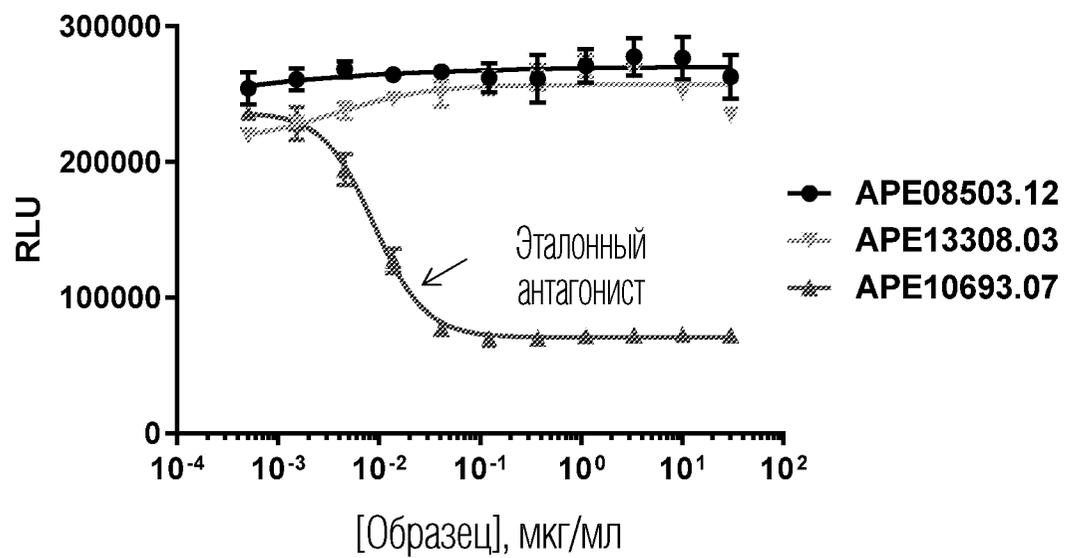




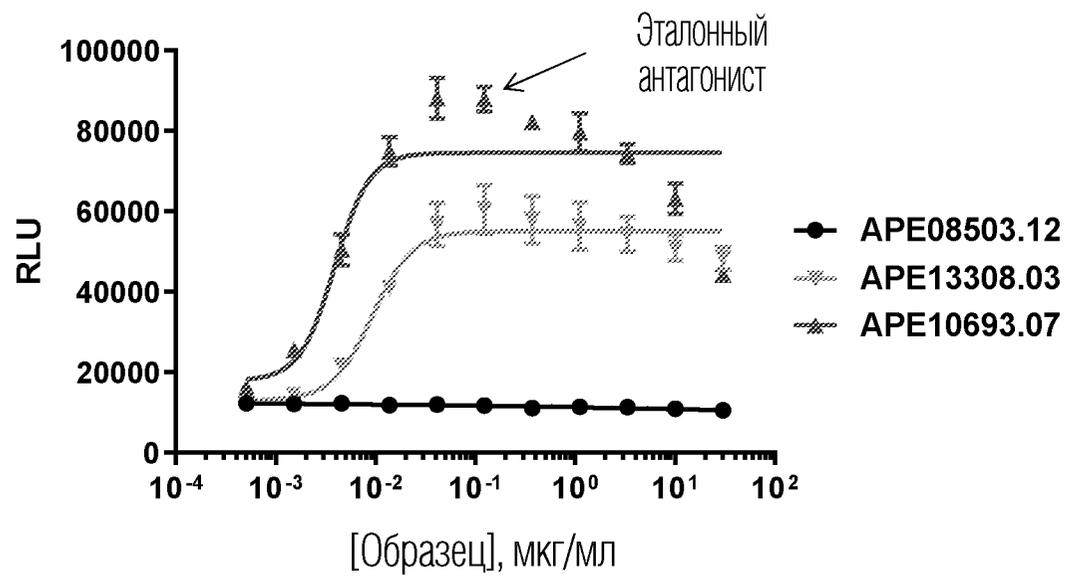
ФИГ. 10



ФИГ. 11

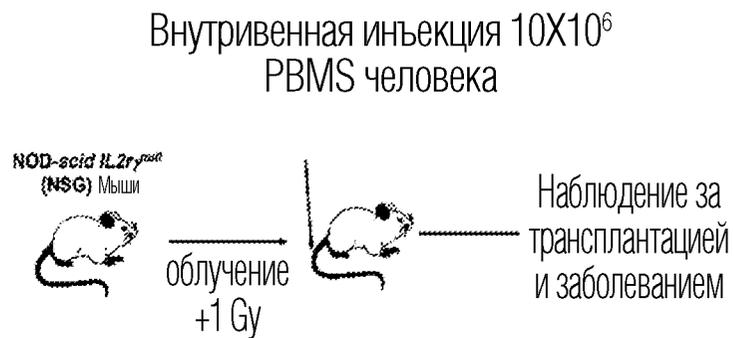


ФИГ. 12



ФИГ. 13

Трансплантат
против хозяина
Модель заболе-
вания

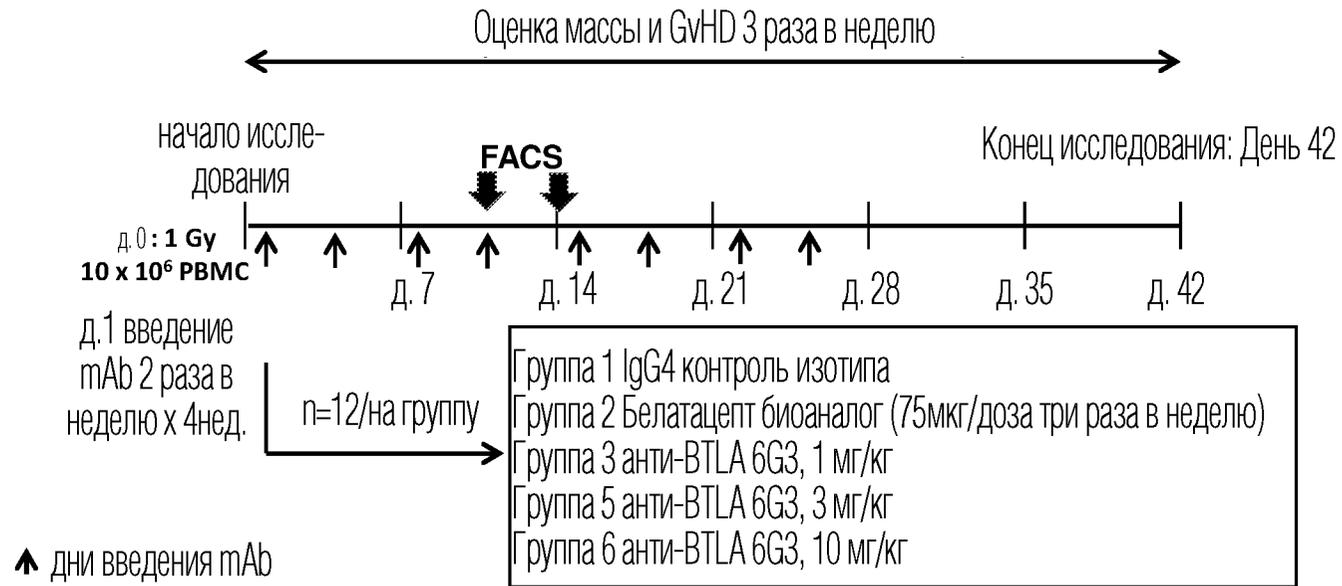


Конечные точки

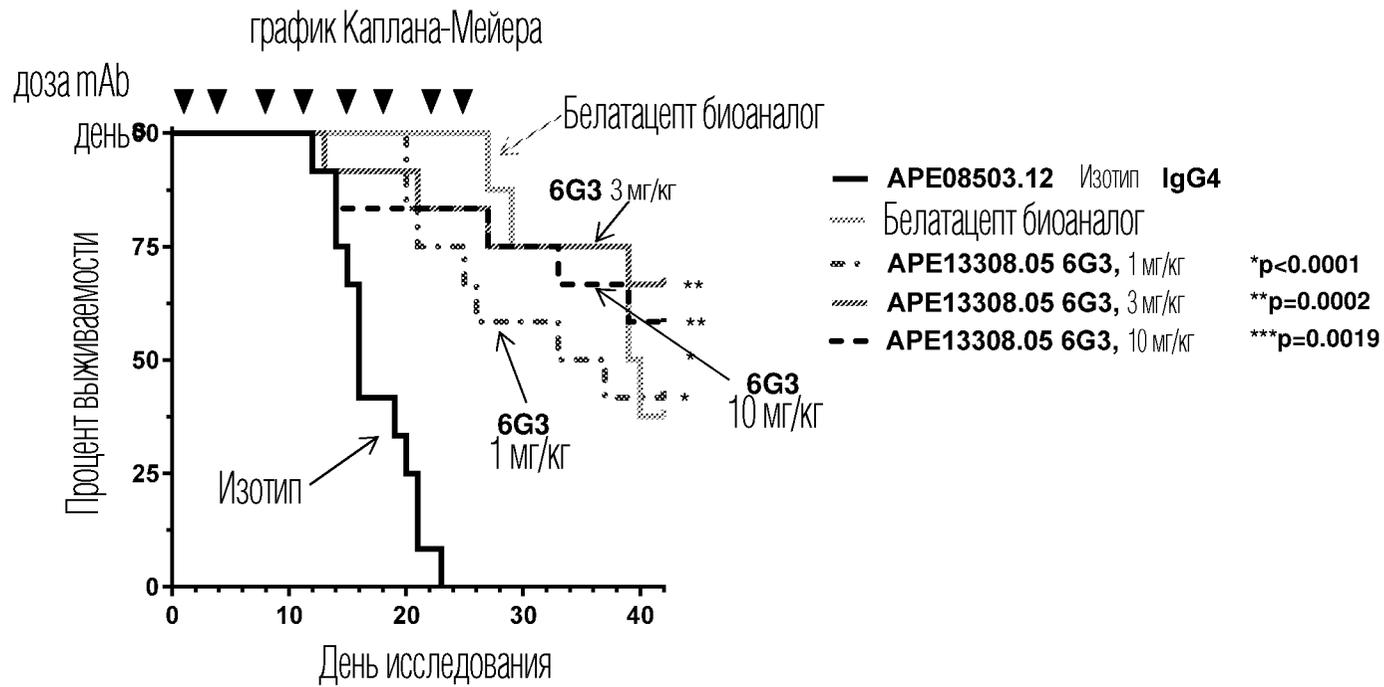
- Потеря массы
- Смерть
- оценки GvHD: потеря массы, актив-
ность, текстура меха, бледность,
положение тела

ФИГ. 14А

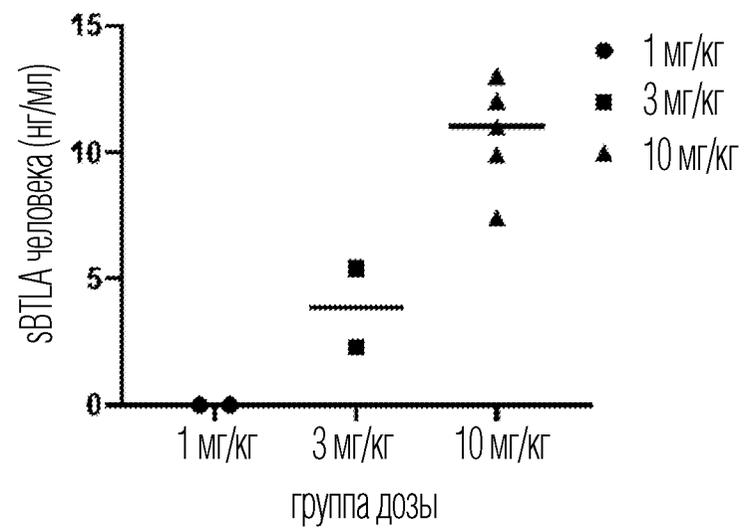
Дизайн исследования модели заболевания «трансплантат против хозяина»



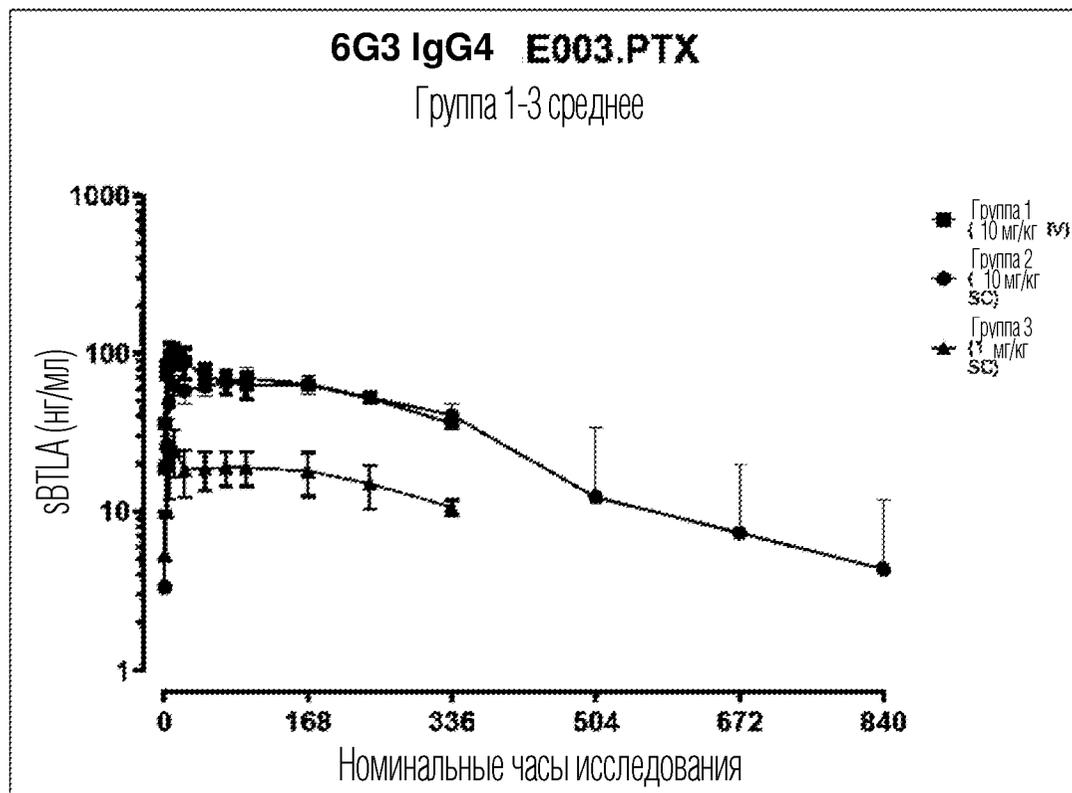
ФИГ. 14В



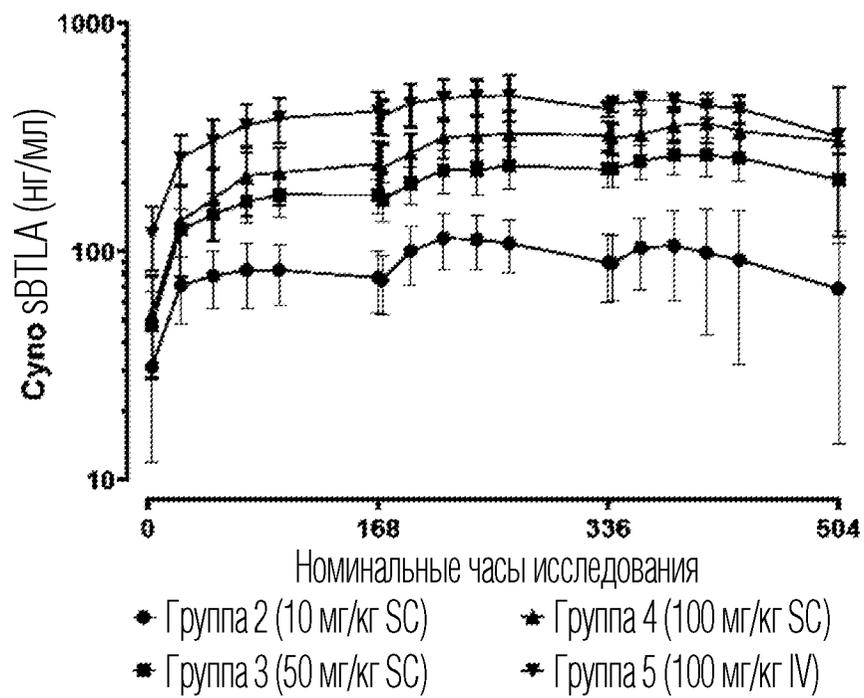
ФИГ. 14С



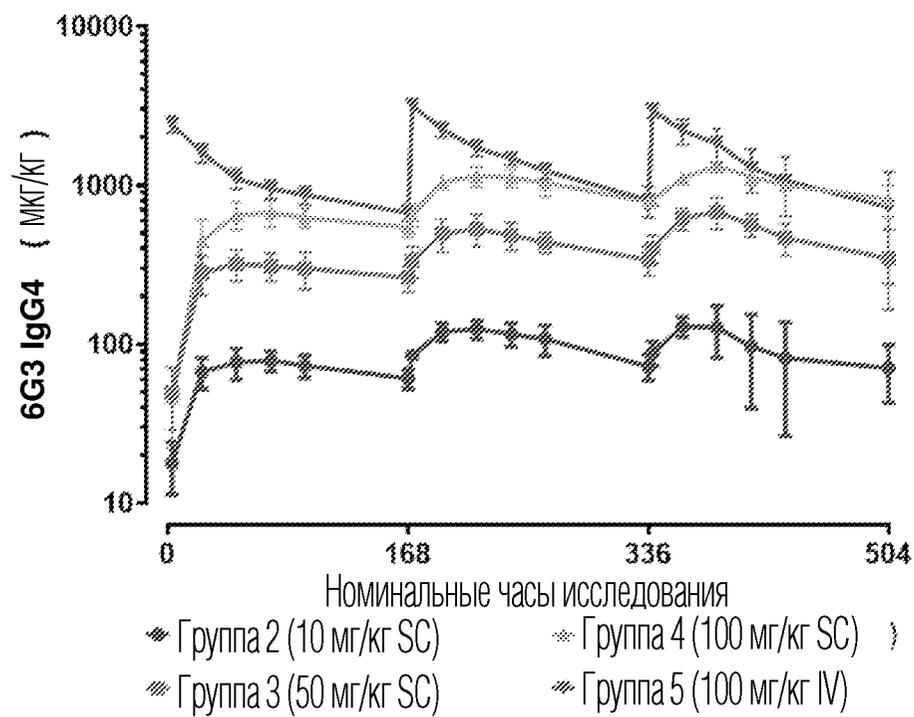
ФИГ. 15



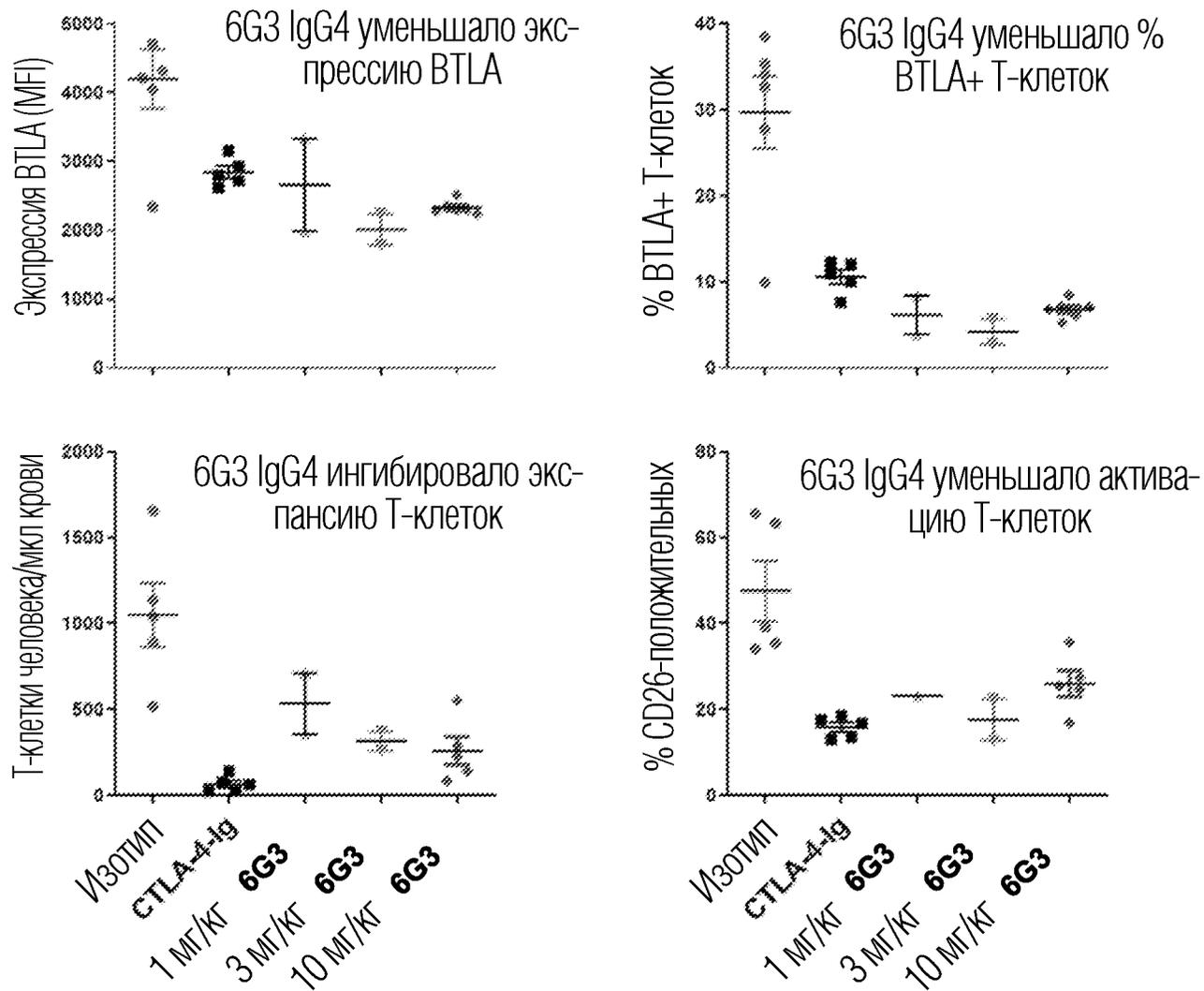
ФИГ. 16



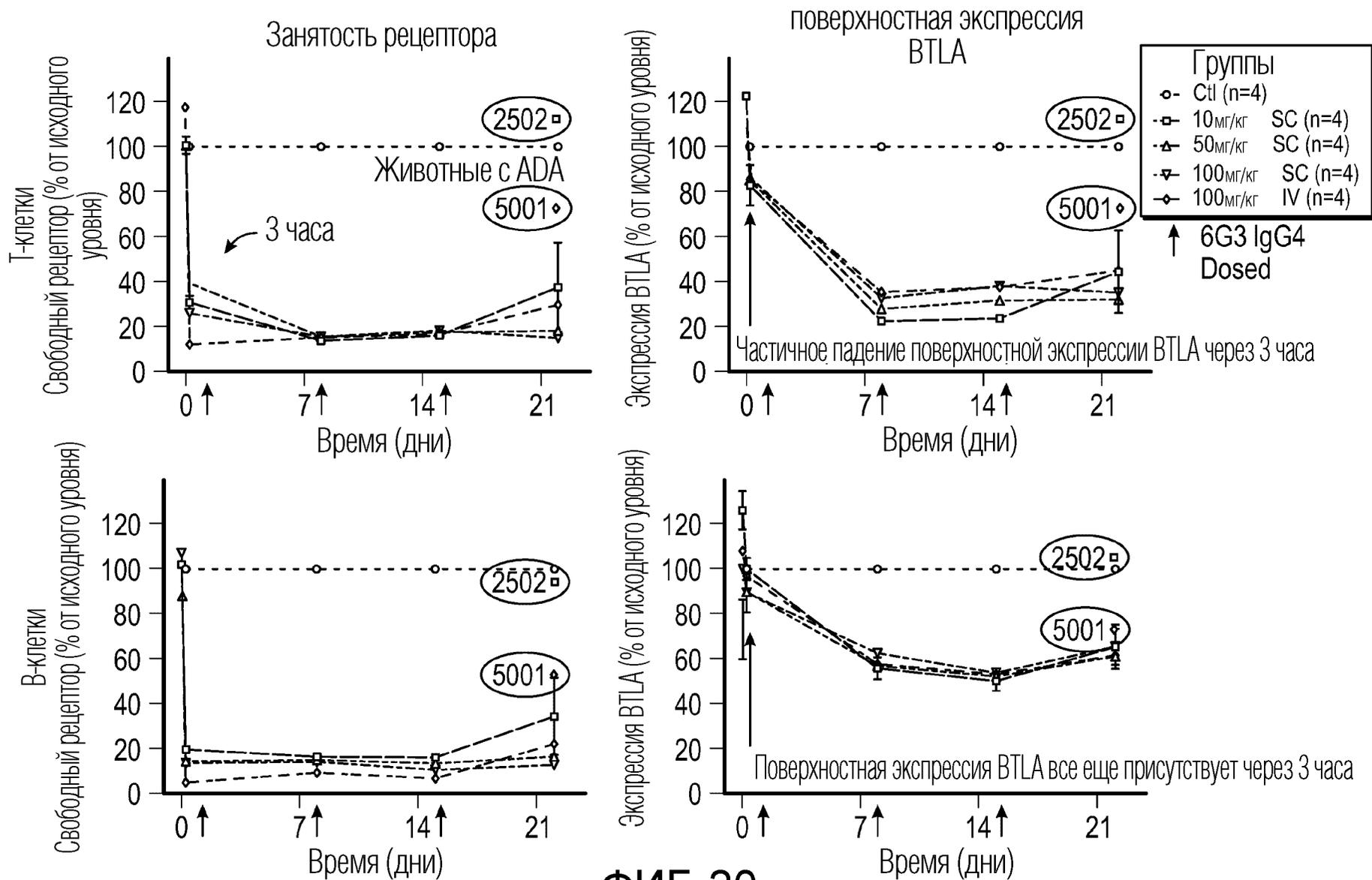
ФИГ. 17



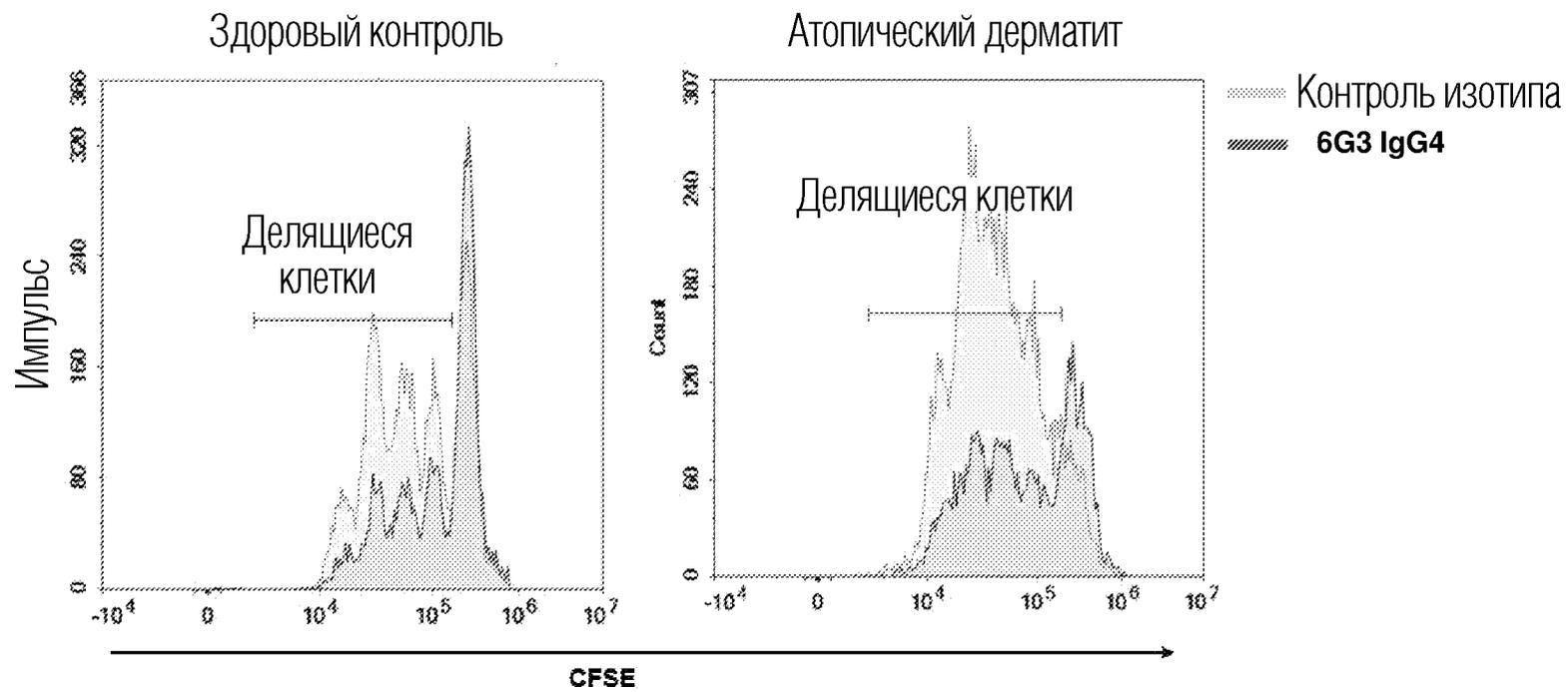
ФИГ. 18



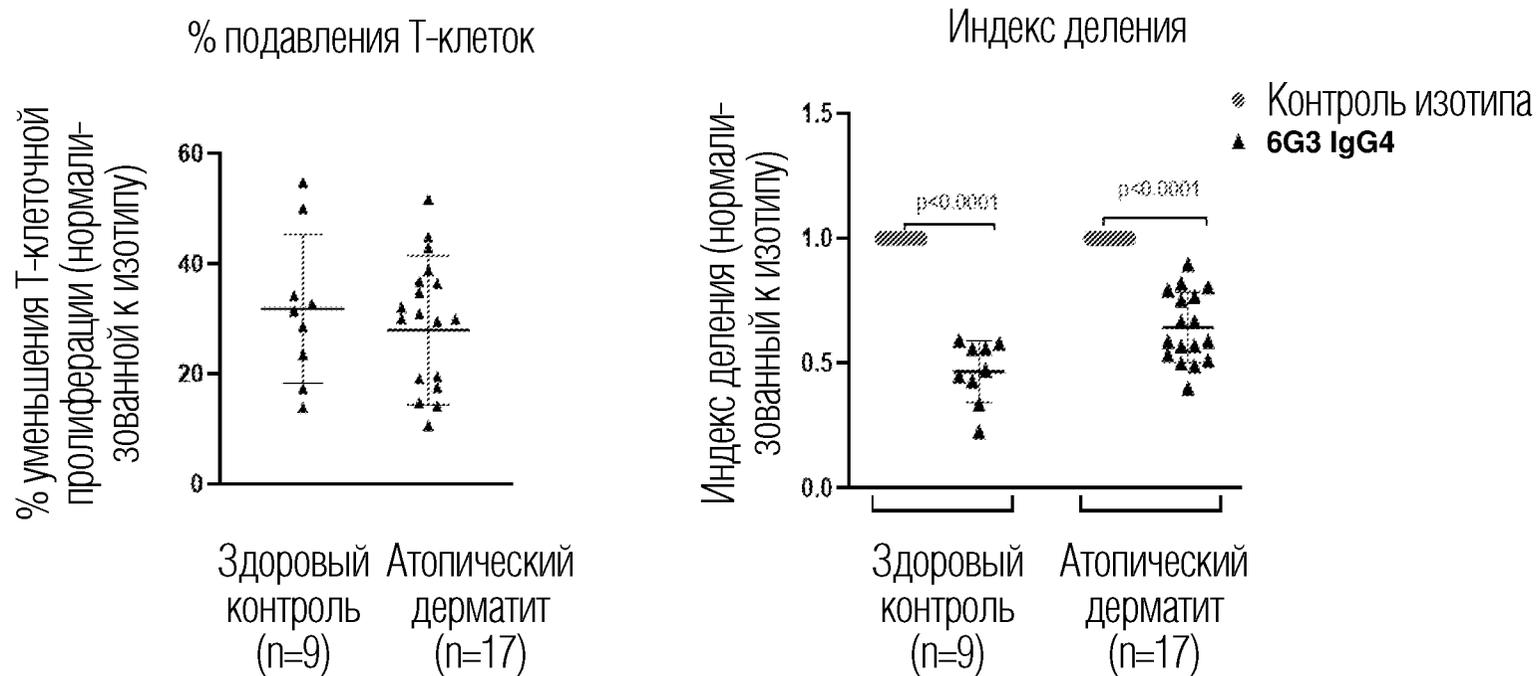
ФИГ. 19



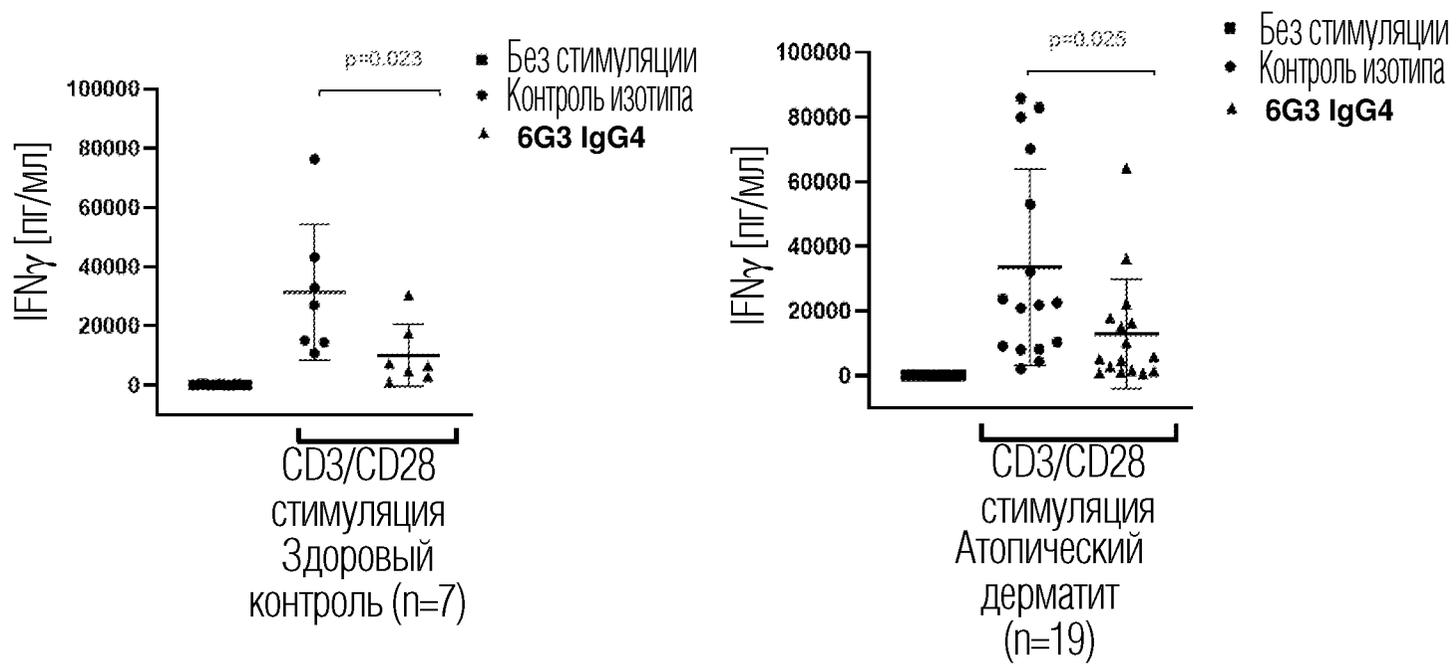
ФИГ. 20



ФИГ. 21А



ФИГ. 21В



ФИГ. 21С



ФИГ. 21D