

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390830** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.01.31

(22) Дата подачи заявки
2016.06.29

(51) Int. Cl. **C07K 14/705** (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

(54) **СЛИТЫЕ БЕЛКИ ВТЛА АГОНИСТЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **62/187,105**

(32) **2015.06.30**

(33) **US**

(62) **201890171; 2016.06.29**

(71) Заявитель:
**СЭНФОРД БЕРНХЕМ ПРЕБИС
МЕДИКАЛ ДИСКАВЕРИ
ИНСТИТЮТ; ПФАЙЗЕР ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Уэр Карл Ф., Седи Джон, Айвазян
Тигран, Миллер Брайан, Креллин
Наташа К. (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение основано на прорывном открытии, что слитые белки ВТЛА агонисты модулируют иммунный ответ. Конкретно, настоящее изобретение относится к слитым белкам, которые связывают ВТЛА, усиливая ВТЛА сигналинг. Настоящее изобретение дополнительно относится к способам лечения рака и иммунных и воспалительных заболеваний и расстройств с применением слитого белка ВТЛА агониста, как описано в настоящем документе.

A1

202390830

202390830

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577802EA/032

СЛИТЫЕ БЕЛКИ ВТЛА АГОНИСТЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По настоящей заявке испрашивается приоритет согласно 35 USC 119(e) к заявке на патент США No. 62/187105, поданной 30 июня 2015. Раскрытие сущности предшествующей заявки считается частью и полностью включено в качестве ссылки в раскрытие сущности данной заявки.

ГОСУДАРСТВЕННАЯ ПОДДЕРЖКА

Это изобретение частично было сделано при государственной поддержке посредством гранта No. R01CA164679, предоставленного Национальным институтом здравоохранения. Правительство США имеет определенные права на настоящее изобретение.

ВКЛЮЧЕНИЕ СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Материал в прилагаемом списке последовательностей включен в качестве ссылки в данную заявку. Прилагаемый текстовый файл со списком последовательностей, под названием BURN1680_1WO_Sequence_Listing, был создан 29 июня 2016 года, и имеет размер 19 kb. Файл можно оценить с использованием Microsoft Word на компьютере, который использует Windows OS.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение в основном относится к слитым белкам и более конкретно к разработке и применению слитых белков ВТЛА агонистов и их применению для модуляции иммунного ответа и лечения заболеваний и расстройств.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ, ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ ИЗОБРЕТЕНИЮ

Рецептор фактора некроза опухолей (TNF) медиатор проникновения вируса герпеса (HVEM; TNFRSF14) является основным центром внимания для манипуляции посредством вирусных патогенов, и при мутации при раковых опухолях и аутоиммунных заболеваниях. У людей, HVEM взаимодействует с суперсемейством цитокинов TNF, LIGHT и лимфотоксином α , и семейством иммуноглобулинов (Ig), содержащим рецепторы аттениуатора В- и Т-лимфоцитов (ВТЛА) и CD160. Связанные с мембраной LIGHT, ВТЛА и CD160, все активируют

NF- κ B нисходящий сигнальный путь HVEM после взаимодействия с рецептором, в то время как HVEM активирует рецепторы BTLA и CD160, приводя к двунаправленному сигналингу между соседними клетками. Клетки, коэкспрессирующие HVEM и BTLA или CD160, могут также образовывать мембранные комплексы этих белков, которые предотвращают доступность этих рецепторов для внеклеточных лигандов в связи со стерическим препятствием.

Было показано, что опосредованное BTLA ингибирование регулирует ряд различных клеточных сигнальных путей, включая сигналинг рецептора антигена в Т и В-клетках. В Т-клетках, впервые было показано, что BTLA вовлечен в ингибирующие пути передачи сигнала, включая активацию протеиновых тирозинфосфатаз, содержащих SH2-домен (SHP)-1 и -2. Недавно, было показано, что BTLA регулирует сигналинг Toll-подобного рецептора в дендритных клетках, и сигналинг IL-7 в $\gamma\delta$ Т-клетках. Однако, в естественных киллерных (NK) клетках человека HVEM также может стимулировать цитолитические и провоспалительные сигнальные пути посредством CD160 в качестве ответной меры хозяина по отношению к цитомегаловирусу человека (HCMV). Дополнительно, в недавней работе, описывающей CD160-дефицит у мышей, была подтверждена его провоспалительная функция в NK-клетках.

Существует большая неудовлетворенная потребность в новых методах терапии, рассчитанной на ингибирование активности Т-лимфоцитов у пациентов, страдающих от иммуноопосредованных патологий, таких как реакция «трансплантат против хозяина» и аутоиммунные заболевания. При многих типах этих заболеваний существует ограниченный набор разрешенных к применению методов лечения, и некоторые пациенты не отвечают на доступные методы лечения. Привлекательной мишенью для новых методов терапии является агонистическая активация ингибирующих рецепторов, экспрессируемых патогенными лимфоцитами, которые вызывают аутоиммунное заболевание. Попытки разработать терапию на основе антител, направленных на активацию ингибирующих рецепторов человека, в большинстве случаев столкнулись с неудачей несмотря на обнадеживающие результаты, полученные на моделях на животных.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение основано на прорывном открытии, что слитые белки BTLA агонисты модулируют иммунный ответ. Конкретно, настоящее изобретение относится к слитым белкам, которые связывают BTLA, усиливая BTLA сигналинг. Настоящее изобретение дополнительно относится к методам лечения рака и иммунных и воспалительных заболеваний и расстройств с применением слитого белка BTLA агониста, как описано в настоящем документе.

В одном из вариантов осуществления, настоящее изобретение относится к слитому белку, включая неприродный белок HVEM и Fc белок, где слитый белок включает внеклеточный домен белка HVEM и Fc белок. В одном из аспектов, слитый белок является BTLA агонистом. В другом аспекте слитый белок включает, по меньшей мере, одну мутацию в белке HVEM. В дополнительном аспекте, мутацией является S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A и их сочетание. В одном из аспектов, слитый белок дополнительно включает, по меньшей мере, одну мутацию в белке HVEM, например, S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A и их сочетание. В другом аспекте слитый белок включает, по меньшей мере, две, три, четыре и более мутаций в белке HVEM, например, S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A и их сочетание. В определенных аспектах, слитый белок включает, по меньшей мере, одну мутацию в белке HVEM, например, S58R; S58K; S58Q; L70D; L70E; L70N; L90A; S58R и L90A; S58R и G68T; S58R и L70W; S58R, L70D и L90A; S58R, G68T и L90A; S58R, L70W и L90A; S58R, G68T, L70D и L90A; и S58R, G68T, L70W и L90A. В одном из аспектов, Fc белок относится к IgA, IgG, IgD, IgE и IgM. В другом аспекте Fc белок относится к IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В конкретном аспекте, IgG Fc белок является человеческим.

В дополнительном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей слитый белок, например, неприродный белок HVEM и Fc белок и фармацевтически приемлемый носитель. В одном из аспектов, слитый белок является BTLA агонистом. В другом аспекте слитый белок включает внеклеточный домен белка HVEM и Fc белок. В другом аспекте слитый белок включает, по меньшей мере, одну мутацию в

белке HVEM. В дополнительном аспекте, мутацией является S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A и их сочетание. В дополнительном аспекте, слитый белок дополнительно включает, по меньшей мере, одну мутацию в белке HVEM, например, S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A и их сочетание. В другом аспекте слитый белок включает, по меньшей мере, две, три, четыре и более мутаций в белке HVEM, например, S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A и их сочетание. В определенных аспектах, слитый белок включает, по меньшей мере, одну мутацию в белке HVEM, например, S58R; S58K; S58Q; L70D; L70E; L70N; L90A; S58R и L90A; S58R и G68T; S58R и L70W; S58R, L70D и L90A; S58R, G68T и L90A; S58R, L70W и L90A; S58R, G68T, L70D и L90A; и S58R, G68T, L70W и L90A. В одном из аспектов, Fc белок относится к IgA, IgG, IgD, IgE и IgM. В другом аспекте Fc белок относится к IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В конкретном аспекте, IgG Fc белок является белком человека.

В одном из вариантов осуществления, настоящее изобретение относится к способу лечения расстройств, связанных с BTLA, включая введение слитого белка, например, неприродного белка HVEM и Fc белка нуждающемуся в этом индивидууму, таким образом, оказывая лечение расстройств, связанных с BTLA. В одном из аспектов, расстройством, связанным с BTLA, является рак и аутоиммунное заболевание и расстройство. В дополнительном аспекте, аутоиммунным заболеванием и расстройством является болезнь Аддисона, боковой амиотрофический склероз, болезнь Крона, синдром Кушинга, сахарный диабет 1 типа, реакция «трансплантат против хозяина», болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, красная волчанка, рассеянный склероз, псориаз, псориатический артрит, ревматоидный артрит, саркоидоз, склеродермия, системная красная волчанка, отторжение трансплантата и васкулит. В другом аспекте раковое заболевание является раком простаты, кишечника, органов брюшной полости, кости, молочной железы, пищеварительной системы, печени, поджелудочной железы, брюшины, эндокринных желез (надпочечников, паращитовидных желез, гипофиза, семенников, яичников, тимуса, щитовидной железы), глаза, головы и шеи, нервной системы

(центральной и периферической), лимфатической системы, органов таза, кожи, мягких тканей, селезенки, органов грудной клетки и мочеполовых путей. В дополнительном аспекте, VTLA сигналинг является повышенным. В другом аспекте слитый белок является VTLA агонистом.

В одном из аспектов, слитый белок включает внеклеточный домен белка HVEM и Fc белок. В дополнительном аспекте, слитый белок включает аминокислотные остатки 39-161 SEQ ID NO:2 и Fc белок. В дополнительном аспекте, Fc белок относится к IgA, IgG, IgD, IgE и IgM. В определенных аспектах, Fc белок относится к IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В конкретном аспекте, IgG Fc белок является белком человека. В одном из аспектов, слитый белок включает, по меньшей мере, одну мутацию в белке HVEM. В дополнительном аспекте, мутацией является S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A и их сочетание. В одном из аспектов, слитый белок дополнительно включает, по меньшей мере, одну мутацию в белке HVEM, например, S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A и их сочетание. В другом аспекте слитый белок включает, по меньшей мере, две, три, четыре и более мутаций в белке HVEM, например, S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A и их сочетание. В определенных аспектах, слитый белок включает, по меньшей мере, одну мутацию в белке HVEM, например, S58R; S58K; S58Q; L70D; L70E; L70N; L90A; S58R и L90A; S58R и G68T; S58R и L70W; S58R, L70D и L90A; S58R, G68T и L90A; S58R, L70W и L90A; S58R, G68T, L70D и L90A; и S58R, G68T, L70W и L90A.

В одном из аспектов, способ также включает введение модулятора иммунного ответа и химиотерапевтического средства. В другом аспекте модуляторами иммунного ответа являются эйкозаноиды, цитокины, простогландины, интерлейкины, хемокины, регуляторы контрольных точек, члены суперсемейства TNF, члены суперсемейства рецепторов TNF и/или интерфероны. В дополнительном аспекте, модулятором иммунного ответа является CXCL-8, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CXCL10, IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12, IL13, IL15,

IL17, IL17, IFN- α , IFN- β , IFN- ε , IFN- γ , G-CSF, TNF- α , CTLA4, CD20, PD1, PD1L1, PD1L2, ICOS, CD200, CD52, LT α , LT $\alpha\beta$, LIGHT, CD27L, 41BBL, FasL, O \times 40L, April, TL1A, CD30L, TRAIL, RANKL, BAFF, TWEAK, CD40L, EDA1, EDA2, APP, NGF, TNFR1, TNFR2, LT β R, HVEM, CD27, 4-1BB, Fas, O \times 40, AITR, DR3, CD30, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, BAFFR, TACI, BCMA, Fn14, CD40, EDAR, XEDAR, DR6, DcR3, NGFR-p75 и/или Та β . В определенных аспектах, модулятором иммунного ответа является тоцилизумаб (актемра), CDP870 (симзия), этанерцепт (энбрел), адалимумаб (хумира), кинерет, абатацепт (оренсия), инфликсимаб (ремикеид), ритуксимаб (ритуксан), голимумаб (симпони), авонекс, ребиф, рециген, плегриди, бетасерон, копаксон, новатрон, натализумаб (тисабри), финголимод (гиления), терифлуномид (аубаджио), BG12, текфидера и/или алемтузумаб (кэмпас, лемтрада).

В дополнительном аспекте, химиотерапевтическим средством является актиномицин, азацитидин, азатиоприн, блеомицин, бортезомиб, карбоплатин, капецитабин, цисплатин, хлорамбуцил, циклофосфамид, цитарабин, даунорубицин, доцетаксел, доксифлуридин, доксорубицин, эпирубицин, эпотилон, этопозид, фторурацил, гемцитабин, гидроксимочевина, идарубицин, иматиниб, иринотекан, мехлорэтамин, меркаптопурин, метотрексат, митоксантрон, оксалиплатин, паклитаксел, пеметрексед, тенипозид, тиогуанин, топотекан, валрубицин, винбластин, винкристин, виндезин, винорелбин, панитумумаб, эрбитукс (цетуксимаб), матузумаб, IMC-IIIF 8, TheraCIM hR3, деносумаб, авастин (бевацизумаб), хумира (адалимумаб), герцептин (трастузумаб), ремикеид (инфликсимаб), ритуксимаб, синагис (паливизумаб), милотарг (гемтузумаб оксогамицин), раптива (эфализумаб), тисабри (натализумаб), зенапакс (дакликсимаб), NeutroSpec (технеций (99mTc) фанолезумаб), тоцилизумаб, ProstaScint (меченый индием-111 капромаб пендетид), бексар (тозитумомаб), зевалин (ибритумомаб тиуксетан (IDEC-Y2B8)), конъюгированный с иттрием 90), ксолар (омализумаб), мабтера (ритуксимаб), реопро (абциксимаб), мабкампат (алемтузумаб), симулект (базиликсимаб), лейкоскан (сулезумаб), СЕА-скан (арцитумомаб), верлума

(нофетумаб), панорекс (эдреколомаб), алемтузумаб, CDP 870 и/или натализумаб. В одном из аспектов, фосфорилирование ERK1/2 и/или ZAP70/Syk понижено. В другом аспекте общее клеточное фосфорилирование и фосфорилирование SHP2 повышено.

В дополнительном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к способу модуляции иммунного ответа у индивидуума, включая введение слитого белка, например, неприродного белка HVEM и Fc белка индивидууму, таким образом, модулируя иммунный ответ. В одном из аспектов, слитый белок является BTLA агонистом. В другом аспекте слитый белок включает внеклеточный домен белка HVEM и Fc белок. В другом аспекте слитый белок включает, по меньшей мере, одну мутацию в белке HVEM. В дополнительном аспекте, мутацией является S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A и их сочетание. В дополнительном аспекте, слитый белок дополнительно включает, по меньшей мере, одну мутацию в белке HVEM, например, S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A и их сочетание. В другом аспекте слитый белок включает, по меньшей мере, две, три, четыре и более мутаций в белке HVEM, например, S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A и их сочетание. В определенных аспектах, слитый белок включает, по меньшей мере, одну мутацию в белке HVEM, например, S58R; S58K; S58Q; L70D; L70E; L70N; L90A; S58R и L90A; S58R и G68T; S58R и L70W; S58R, L70D и L90A; S58R, G68T и L90A; S58R, L70W и L90A; S58R, G68T, L70D и L90A; и S58R, G68T, L70W и L90A. В одном из аспектов, Fc белок относится к IgA, IgG, IgD, IgE и IgM. В другом аспекте Fc белок относится к IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В конкретном аспекте, IgG Fc белок является белком человека. В одном из аспектов, BTLA сигналинг является повышенным. В другом аспекте фосфорилирование ERK1/2 и/или ZAP70/Syk понижено. В дополнительном аспекте, общее клеточное фосфорилирование и фосфорилирование SHP2 является индуцированным. В дополнительном аспекте, индивидуум имеет заболевание и расстройство, связанные с BTLA. В определенных аспектах, заболеванием, связанным с BTLA, является рак и аутоиммунное заболевание и расстройство.

В одном из вариантов осуществления, настоящее изобретение

относится к способу модулирования BTLA сигналинга в клетке, включая контактирование клетки, экспрессирующей BTLA, со слитым белком, например, неприродным белком HVEM и Fc белком, таким образом, модулируя BTLA сигналинг. В одном из вариантов BTLA сигналинг является повышенным. В другом аспекте слитый белок включает внеклеточный домен белка HVEM и Fc белок. В другом аспекте слитый белок включает, по меньшей мере, одну мутацию в белке HVEM. В дополнительном аспекте, мутацией является S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A и их сочетание. В дополнительном аспекте, слитый белок дополнительно включает, по меньшей мере, одну мутацию в белке HVEM, например, S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A и их сочетание. В другом аспекте слитый белок включает, по меньшей мере, две, три, четыре и более мутаций в белке HVEM, например, S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A и их сочетание. В определенных аспектах, слитый белок включает, по меньшей мере, одну мутацию в белке HVEM, например, S58R; S58K; S58Q; L70D; L70E; L70N; L90A; S58R и L90A; S58R, L70D и L90A; S58R и G68T; S58R и L70W; S58R, G68T и L90A; S58R, L70W и L90A; S58R, G68T, L70D и L90A; и S58R, G68T, L70W и L90A. В одном из аспектов, Fc белок относится к IgA, IgG, IgD, IgE и IgM. В другом аспекте Fc белок относится к IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В конкретном аспекте, IgG Fc белок является белком человека. В одном из аспектов, фосфорилирование ERK1/2 и/или ZAP70/Syk понижено. В другом аспекте общее клеточное фосфорилирование и фосфорилирование SHP2 является индуцированным.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

На **фигурах 1A-C** показана идентификация BTLA связывающей поверхности UL144. На **фигуре 1A** представлены изображения CMV UL144 человека с указанием мутированных поверхностных остатков. На **фигуре 1B** представлены кривые связывания для указанных UL144 мутантов. На **фигуре 1C** представлены K_d связывания BTLA-Fc с белками UL144.

На **фигурах 2A-H** показана идентификация HVEM-лиганд связывающих мутантов в лимфоме человека. На **фигуре 2A** представлены изображения HVEM человека с указанием мутированных

поверхностных остатков. На фигуре **2B** показано HVEM связывание в клетках, трансдуцированных LIGHT. На фигуре **2C** показано HVEM связывание в клетках, трансдуцированных BTLA-Fc. На фигуре **2D** показано HVEM связывание в клетках, трансдуцированных CD160-Fc. На фигуре **2E** показана Kd связывания LIGHT с HVEM мутантными белками. На фигуре **2F** показана Kd связывания BTLA-Fc с HVEM мутантными белками. На фигуре **2G** показана Kd связывания CD160-Fc с HVEM мутантными белками. На фигуре **2H** показан ряд индивидуальных DLBCL биопсий, где каждая колонка представляет один образец DLBCL.

На фигурах **3A-E** показано, что HVEM и UL144 связывают одну и ту же поверхность BTLA. На фигуре **3A** показаны два изображения BTLA. На фигуре **3B** показаны типичные кривые после инъекции HVEM-Fc человека. На фигуре **3C** показаны типичные кривые после инъекции CMV UL144-Fc человека. На фигуре **3D** показаны VJAB клетки, трансдуцированные BTLA, инкубированные с анти-BTLA, а затем окрашенные HVEM-Fc. На фигуре **3E** показаны VJAB клетки, трансдуцированные BTLA, инкубированные с анти-BTLA, а затем окрашенные CMV UL144-Fc человека.

На фигурах **4A-C** показано, что CD160 ограничивает HVEM активацию BTLA. На фигурах **4A-C** показаны JTA γ клетки, трансдуцированные указанными HVEM лигандами и культивированные с микросферами, соединенными с анти-CD3 с и без Fc-белков. На фигуре **4A** показаны клетки, окрашенные на фосфо-ERK1/2 (T202/Y204). На фигуре **4B** показаны клетки, окрашенные на фосфо-ZAP70/Syk (Y319/Y352). На фигуре **4C** показаны клетки, окрашенные на фосфотирозин.

На фигурах **5A-B** показано, что селективные BTLA агонисты ингибируют IL-2 сигналинг. На фигуре **5A** показаны вестерн-блоты цельноклеточных экстрактов фосфо-JAK1, фосфо-STAT5 и актина. На фигуре **5B** представлены графики, показывающие количественный анализ интенсивности полос, нормализованных к актину.

На фигурах **6A-C** показано, что de novo мутантный HVEM ингибирует ZAP70/Syk активацию. На фигурах **6A-C** показаны JTA γ клетки, трансдуцированные HVEM лигандами, культивированные с микросферами, соединенными с анти-CD3 с и без Fc белков. На

фигуре **6A** показано окрашивание на фосфо-ERK1/2 (T202/Y204). На фигуре **6B** показано окрашивание на фосфо-ZAP70/Syk (Y319/Y352). На фигуре **6C** показано окрашивание на фосфо-SHP2 (Y542).

На фигурах **7A-E** показаны мутации, которые действуют на связывание UL144 с BTLA. На фигуре **7A** показаны внеклеточные домены HVEM человека и CMV UL144 человека. На фигуре **7B** показаны гистограммы клеток 293T, трансдуцированные мутированными и дикого типа CMV UL144 человека, окрашенных анти-UL144 (2F11). На фигуре **7C** показаны клетки 293T, трансдуцированные мутированными и дикого типа CMV UL144 человека или HVEM, окрашенные LIGHT. На фигуре **7D** показаны клетки 293T, трансдуцированные мутированными и дикого типа CMV UL144 человека или HVEM, окрашенные BTLA-Fc. На фигуре **7E** показаны клетки 293T, трансдуцированные мутированными и дикого типа CMV UL144 человека или HVEM, окрашенные CD160-Fc.

На фигурах **8A-B** показана идентификация HVEM-лиганд связывающих мутантов в лимфоме человека. На фигуре **8A** показано краткое описание TNFRSF14 мутаций (точек), наблюдаемых в биопсиях FL и DLBCL человека. На фигуре **8B** показаны клетки 293T, трансдуцированные мутированными и HVEM дикого типа человека, окрашенные анти-HVEM.

На фигурах **9A-F** показано, что HVEM и UL144 связывают одну и ту же поверхность BTLA. На фигуре **9A** показано специфическое MFI окрашивание 6F4, J168 или MIN26 с применением анти-BTLA. На фигуре **9B** показано специфическое MFI окрашивание с применением HVEM-Fc или UL144-Fc. На фигуре **9C** показаны клетки 293T, трансфицированные BTLA в отдельности или вместе с HVEM или CMV UL144 человека, окрашенные HVEM-Fc. На фигуре **9D** показаны клетки 293T, трансфицированные BTLA в отдельности или вместе с HVEM или CMV UL144 человека, окрашенные CMV UL144-Fc. На фигуре **9E** показаны клетки 293T, трансфицированные HVEM, окрашенные BTLA-Fc. На фигуре **9F** показаны клетки 293T, трансфицированные HVEM или CMV UL144 человека, окрашенные BTLA-Fc.

На фигурах **10A-B** показано, что CD160 ограничивает HVEM активацию BTLA. На фигуре **10A** показаны JTAg клетки, трансдуцированные указанными HVEM лигандами или контрольным

вектором, окрашенные анти-VTLA человека (верх), анти-CD160 человека (середина) или HVEM-Fc с последующим окрашиванием видоспецифичными вторичными антителами (низ). На фигуре **10B** показаны VJAB клетки, культивированные с микросферами, соединенными с анти-IgM с или без титрованных Fc белков, перед внутриклеточным окрашиванием.

На фигурах **11 A-C** показано, что селективные VTLA агонисты ингибируют IL-2 сигналинг. На фигуре **11A** представлены графики, показывающие процент CD69 экспрессии в CD19+ В-клетках, CD4+ и CD8+ Т-клетках, CD3+CD56+ клетках, CD56неярких и CD56ярких NK-клетках в PBMC, предварительно обработанных указанными Fc белками. На фигуре **11B** показаны вестерн-блоты NK92 клеток, стимулированных с применением титрованного IL-2. На фигуре **11C** показаны вестерн-блоты NK92 клеток, стимулированных с применением титрованного IFN- β .

На фигурах **12 A-B** показано, что *de novo* мутантный HVEM ингибирует ZAP70/Syk активацию. На фигурах **12A-B** показаны JTAg клетки, трансдуцированные указанными HVEM лигандами, культивированные с микросферами, соединенными с анти-CD3 с или без Fc белков. На фигуре **12A** показано окрашивание на фосфо-NF- κ B. На фигуре **12B** показано окрашивание на фосфотирозин.

На фигурах **13 A-G** показано, что различные патоген-ассоциированные и сконструированные *de novo* биоинженерным способом HVEM мутеиновые VTLA агонисты ингибируют Т-клеточную сигнализацию. JTAg клетки, трансдуцированные указанными HVEM лигандами, культивировали с микросферами, соединенными с анти-CD3 с или без Fc белков. На фигурах **13A-B** показано окрашивание на фосфо-ERK1/2 (T202/Y204). На фигуре **13C** показано окрашивание на фосфо-NF- κ B p65 (S529). На фигуре **13D** показано окрашивание на фосфо-VTK/ITK (Y551/Y511). На фигуре **13E** показано окрашивание на фосфо-PLC γ 1 (Y783). На фигуре **13F** показано окрашивание на фосфо-ZAP70/Syk (Y319/Y352). На фигуре **13G** показано окрашивание на фосфотирозин.

На фигурах **14A-B** показано, что VTLA агонисты ингибируют В-клеточную сигнализацию. VJAB клетки культивировали с

микросферами, соединенными с анти-IgM с или без титрованных Fc белков. На фигуре **14A** показано культивирование в течение 10 минут. На фигуре **14B** показано культивирование в течение 60 минут.

На **фигурах 15A-D** показано, что BTLA агонисты ингибируют активацию В-клеток посредством интерферона. В-клетки человека стимулировали интерфероном- β в присутствии микросфер, соединенных с контрольным иммуноглобулином или слитыми белками BTLA агонистов. На фигуре **15A** показан HVEM-Fc, соединенный с микросферами. На фигуре **15B** показан UL144 Fc, соединенный с микросферами. На фигуре **15C** показан HVEM^{R109w} Fc, соединенный с микросферами. На фигуре **15D** показан HVEM^{RTWA} Fc, соединенный с микросферами.

На **фигурах 16A-B** показано, что селективные BTLA агонисты ограничивают IL-2 сигналинг в NK-клетках. На фигуре **16A** показаны вестерн-блоты цельноклеточных экстрактов фосфо-JAK1, фосфо-STAT5 и актина. На фигуре **16B** показаны графики количественной оценки интенсивности полос, нормализованной к актину.

На **фигурах 17A-C** показана идентификация селективности лиганда в HVEM мыши. HVEM-Fc мутеины, включая варианты, которые или блокировали связывание с LIGHT (BTLA/CD160-sp), или и BTLA, и CD160 (LIGHT-sp), титровали на 293T клетки. На фигуре **17A** показаны клетки, трансфицированные CD160. На фигуре **17B** показаны клетки, трансфицированные BTLA мыши. На фигуре **17C** показаны клетки, трансфицированные LIGHT мыши.

На **фигурах 18A-C** показано, что селективный HVEM-Fc ингибирует воспаление кожи *in vivo*. Мутеины HVEM-Fc мыши инъецировали интраперитонеально в животных, получавших имиквимод, в качестве модели воспаления кожи. На фигуре **18A** показан гистологический анализ. На **фигурах 18B-C** показано уплотнение эпидермиса.

На **фигурах 19A-B** показана последовательность нуклеиновой кислоты и аминокислотная последовательность для HVEM человека. На фигуре **19A** показана последовательность нуклеиновой кислоты для HVEM человека. На фигуре **19B** показана аминокислотная

последовательность для НВЕМ человека.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение основано на прорывном открытии, что слитые белки ВТЛА агонистов модулируют иммунный ответ. Конкретно, настоящее изобретение относится к слитым белкам, которые связывают ВТЛА, усиливая ВТЛА сигналинг. Настоящее изобретение дополнительно относится к способам лечения рака и иммунных и воспалительных заболеваний и расстройств с применением слитого белка ВТЛА агониста, как описано в настоящем документе.

До ознакомления с описанием настоящих композиций и способов, следует понимать, что это изобретение не ограничено конкретными описанными композициями, способами и экспериментальными условиями, таким образом, композиции, способы и условия могут варьировать. Также следует понимать, что терминология, применяемая в данном документе, служит только для описания конкретных вариантов осуществления, и не предназначена быть ограничивающей, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только в прилагаемой формуле изобретения.

Если не определено иначе, все технические и научные термины, применяемые в настоящем документе, имеют то же самое значение, которое обычно понимают специалисты в данной области, к которой принадлежит данное изобретение. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, можно использовать в практическом осуществлении или тестировании изобретения, предпочитаемые способы и материалы описаны ниже. Нижеизложенные определения предназначены для понимания описания изобретения, но их не следует рассматривать в качестве замены понимания терминов, присущего специалистам в данной области.

Как применяют в данном описании и приложенной формуле изобретения, формы единственного числа "a", "an" и "the" включают множественные упоминания, если из контекста явно не следует иначе. Таким образом, например, ссылки на "способ" включают один или более способов и/или этапов типа, описываемого в настоящем

документе, которые станут очевидны специалистам в данной области при чтении этого изобретения и так далее.

Антитела являются, как правило, гетеротетрамерными гликопротеинами с массой приблизительно 150000 дальтон, состоящими из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью посредством одной ковалентной дисульфидной связи, в то время как число дисульфидных связей варьирует среди тяжелых цепей различных изоформ иммуноглобулинов. Каждая тяжелая и легкая цепь также имеет равномерно распределенные внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь имеет на одном конце переменный домен (V_H) с последующим рядом константных доменов. Каждая легкая цепь имеет переменный домен на одном конце (V_L) и константный домен на своем другом конце; константный домен легкой цепи сопоставлен с первым константным доменом тяжелой цепи, и переменный домен легкой цепи сопоставлен с переменным доменом тяжелой цепи. Полагают, что конкретные аминокислотные остатки образуют границу между переменными доменами легкой и тяжелой цепи. Каждая переменная область включает три сегмента, которые называются определяющие комплементарность области (CDRs) или гиперпеременные области, и более высоко консервативные части переменных доменов, называемые каркасная область (FR). Переменные домены тяжелой и легкой цепей каждая включает четыре FR области, в основном принимающие конфигурацию β -листа, соединенные посредством трех CDRs, которые образуют петлевое соединение, и в некоторых случаях составляют часть структуры β -листа. CDRs в каждой цепи скреплены в непосредственной близости посредством FRs и, с CDRs из другой цепи, способствуя образованию антигенсвязывающего участка антител. Константные домены не вовлечены напрямую в связывание антитела с антигеном, но демонстрируют разнообразные эффекторные функции, такие как участие антитела в антитело-зависимой клеточной цитотоксичности.

В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей, иммуноглобулины могут

относиться к различным классам. Существуют пять главных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG, и IgM, и несколько из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые относятся к различным классам иммуноглобулинов называются α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Структуры субъединиц и пространственные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

Fc область антитела является хвостовой областью антитела, которая взаимодействует с рецепторами клеточной поверхности и некоторыми белками системы комплемента. Эта особенность позволяет антителам активировать иммунную систему. В изотипах антител IgG, IgA и IgD Fc область состоит из двух идентичных белковых фрагментов, происходящих из второго и третьего константных доменов двух тяжелых цепей антител; Fc области IgM и IgE содержат три константных домена тяжелой цепи (CH домены 2-4) в каждой полипептидной цепи. Fc области IgGs несут высококонсервативный N-участок гликозилирования. Гликозилирование Fc фрагмента необходимо для Fc рецептор-опосредованной активности. N-гликаны, прикрепленные к этому сайту, представляют собой преимущественно диантеннальные структуры с фукозилированным ядром комплексного типа. Кроме того, небольшие количества этих N-гликанов также несут бисектный GlcNAc и α -2,6-связанные остатки сиаловых кислот.

Термин "антитело", как применяют в настоящем документе, относится к интактным моноклональным антителам, поликлональным антителам, полиспецифическим антителам (например, биспецифическим антителам), образованным из, по меньшей мере, двух интактных антител, и фрагментам антител при условии, что они проявляют желательную биологическую активность.

"Фрагменты антител" включают часть интактного антитела, предпочтительно антиген связывающую или переменную область интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают Fc, Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv фрагменты; диатела, триотела и т.п.; линейные антитела; одноцепочечные молекулы антител; и

полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Термин "моноклональное антитело", как применяют в настоящем документе, относится к антителу, полученному из совокупности по существу гомогенных антител, т.е. индивидуальных антител, включая совокупность идентичных антител, за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, будучи направленными против единичного антигенного сайта. Кроме того, каждое моноклональное антитело направлено против единичной детерминанты на антигене. Вдобавок к их специфичности, моноклональные антитела представляют интерес в том плане, что их синтезируют посредством гибридомы, не загрязненной другими иммуноглобулинами. Например, моноклональные антитела, предназначенные для использования в соответствии с настоящим изобретением, могут быть сделаны посредством гибридомы, посредством технологий рекомбинантных ДНК, или выделены из фаговых библиотек антител.

Термины "слитая молекула" и "слитый белок" используются взаимозаменяемо и предназначены для обозначения биологически активного полипептида, например, HVEM или антитела или его фрагмента (например, Fc область), с или без дополнительной эффекторной молекулы, как правило, белка или пептидной последовательности, ковалентно связанной (т.е. слитой) посредством рекомбинантного, химического или другого подходящего метода. При желании, слитая молекула может быть слитой в одном или нескольких сайтах посредством пептидной линкерной последовательности. Альтернативно, пептидный линкер можно использовать для содействия в конструировании слитой молекулы. Особенно предпочтительными слитыми молекулами являются слитые белки. Как правило, слитая молекула также может включать конъюгированные молекулы.

Fc-слитые белки (также известные как Fc химерный слитый белок, Fc-Ig, химерный слитый белок на основе Ig и белок с Fc-меткой) состоят из Fc домена IgG, генетически связанного с пептидом или белком, представляющими интерес. Fc-слитые белки

стали ценными реагентами для *in vivo* и *in vitro* исследований.

Fc-слитый партнер по связыванию может представлять собой единственный пептид, лиганд, который активируется при связывании с рецептором клеточной поверхности, сигнальные молекулы, внеклеточный домен рецептора, который активируется при димеризации, или белок-приманку, который применяют для идентификации партнеров по связыванию в белковом микрочипе.

Одной из наиболее ценных характеристик Fc домена *in vivo* является то, что он может существенным образом продлевать период полувыведения из плазмы белка, представляющего интерес, что в случае биотерапевтических препаратов приводит к улучшенной терапевтической эффективности; параметр, который сделал Fc-слитые белки привлекательными биотерапевтическими средствами.

Fc слитый белок может быть частью фармацевтической композиции, включающей Fc слитый белок и фармацевтически приемлемые эксципиенты или носитель. Фармацевтически приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы хорошо известны в данной области (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)). Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозировках и концентрациях, и могут включать буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензил хлорид аммония; гексаметоний хлорид; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутил или бензиловый спирт; алкил парабены, такие как метил или пропил парабен; катехин; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и *m*-крезол); низкомолекулярные (менее чем приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие средства, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексные соединения с

металлами (например, Zn-белковые комплексы); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, ПЛЮРОНИКИ™ или полиэтиленгликоль (PEG).

Как применяют в настоящем документе, термин "модулирование иммунного ответа" относится или к усилению, или к ингибированию иммунного ответа. В некоторых аспектах, слитые белки по настоящему изобретению ингибируют или ослабляют иммунный ответ.

Как применяют в настоящем документе, термин "модулирование ВТЛА сигналинга" относится или к повышению или снижению ВТЛА сигналинга. В некоторых аспектах, слитые белки по настоящему изобретению повышают ВТЛА сигналинг.

Как применяют в настоящем документе, термины "проведение лечения" или "лечение" или "облегчение симптомов" относятся к терапевтическому лечению, профилактическим и/или превентивным мерам, где объект предназначен для предотвращения или приостановления (облегчения) определенного патологического состояния или расстройства. Они в случае необходимости лечения включают те, которые уже с расстройством, а также те, которые предрасположены иметь расстройство, или те, у кого расстройство должно быть предотвращено.

Термин "терапевтическое средство", как применяют в настоящем документе, включает химическое соединение или композицию, способную индуцировать желаемый терапевтический эффект при введении пациенту или индивидууму. Примером терапевтического средства по настоящему изобретению является слитый белок ВТЛА агониста.

Как применяют в настоящем документе, термины "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" лекарственного препарата, применяемое для лечения заболевания, является количеством, которое может уменьшить тяжесть заболевания, уменьшить тяжесть одного или более симптомов, связанных с заболеванием или его лечением, или отложить возникновение более серьезных симптомов или более серьезного заболевания, что может происходить с некоторой частотой после

состояния, потребовавшего лечение. "Эффективное количество" можно определять эмпирически и в рамках общепринятой практики, в зависимости от заявленного предназначения.

Терапевтическое средство можно вводить посредством любых подходящих средств, включая местное, парентеральное, подкожное, интраперитонеальное, внутрилегочное, интраназальное, внутривенное и/или внутриочаговое введение в целях лечения индивидуума. Однако, в иллюстративных вариантах осуществления терапевтическое средство формулируют для местного применения, как например, в форме жидкости, крема, геля, мази, распыляемой пены или тому подобного.

Как применяют в настоящем документе, термины "расстройство, связанное с ВТЛА" или "заболевание, связанное с ВТЛА" относятся к любому состоянию, которое подвергается эффективному лечению при применении слитого белка ВТЛА агониста. Примеры заболеваний и расстройств, которые подвержены эффективному лечению при применении слитого белка ВТЛА агониста, включают рак, иммунные, аутоиммунные и воспалительные заболевания и расстройства.

Иммунное заболевание или расстройство является нарушением функционирования иммунной системы. Эти расстройства могут быть охарактеризованы несколькими различными способами: посредством вовлеченных компонентов иммунной системы; посредством того, является ли иммунная система гиперактивной или гипоактивной, и посредством того, является ли состояние врожденным или приобретенным. Аутоиммунные заболевания возникают вследствие аномального иммунного ответа организма против веществ и тканей, в норме присутствующих в организме (аутоиммунитет). Главное понимание механизмов, лежащих в основе патофизиологии аутоиммунных заболеваний, было достигнуто посредством применения сканов полногеномного анализа, которые выявили поразительную степень генетического наследования среди аутоиммунных заболеваний.

К аутоиммунным нарушениям в качестве неограничивающих примеров относятся острый диссеминированный энцефаломиелит (ADEM), заболевание Аддисона, агаммаглобулинемия, очаговая

алопеция, боковой амиотрофический склероз (болезнь Лу Герига), анкилозирующий спондилит, антифосфолипидный синдром, антисинтеазный синдром, атопическая аллергия, атопический дерматит, аутоиммунная апластическая анемия, аутоиммунная кардиомиопатия, аутоиммунная энтеропатия, аутоиммунная гемолитическая анемия, аутоиммунный гепатит, аутоиммунное заболевание внутреннего уха, аутоиммунный лимфопролиферативный синдром, аутоиммунный панкреатит, аутоиммунная периферическая нейропатия, аутоиммунный полиэндокринный синдром, аутоиммунный прогестероновый дерматит, аутоиммунная тромбоцитопеническая пурпура, аутоиммунная уртикарная сыпь, аутоиммунный увеит, болезнь Бало/концентрический склероз Бало, болезнь Бехчета, болезнь Бергера, энцефалит Бикерстаффа, синдром Блау, буллезный пемфигоид, рак, болезнь Кастлемана, глютеиновая болезнь, болезнь Шагаса, хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия, хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия, хроническое обструктивное заболевание легких, хронический рецидивирующий множественный остеомиелит, синдром Черджа-Стросса, рубцующийся пемфигоид, синдром Когана, болезнь холодových агглютининов, дефицит компонента системы комплемента 2, контактный дерматит, краниальный артериит, CREST-синдром, болезнь Крона, синдром Кушинга, кожный лейкоцитокластический васкулит, болезнь Дега, болезнь Деркума, герпетиформный дерматит, дерматомиозит, сахарный диабет тип 1, диффузный кожный системный склероз, дискоидная красная волчанка, синдром Дресслера, лекарственная волчанка, экзема, эндометриоз, эозинофильный фасциит, эозинофильный гастроэнтерит, эозинофильная пневмония, приобретенный буллезный эпидермолиз, узловая эритема, гемолитическая желтуха новорожденных, первичная криоглобулинемия смешанного типа, синдром Эванса, прогрессирующая оссифицирующая фибродисплазия, фиброзирующий альвеолит (или идиопатический легочный фиброз), гастрит, желудочно-кишечный пемфигоид, гломерулонефрит, синдром Гудпасчера, реакция «трансплантат против хозяина», болезнь Грэйвса, синдром Гийена-Барре, энцефалопатия Хашимото, тиреоидит Хашимото, пурпура Шенлейна-Геноха, гестационный герпес, также известный

как гестационный пемфигоид, гнойный гидраденит, синдром Хьюза-Стовина, гипогаммаглобулинемия, идиопатические воспалительные демиелинизирующие заболевания, идиопатический легочный фиброз, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, IgA нефропатия, миозит с тельцами включения, интерстициальный цистит, ювенильный идиопатический артрит также известный, как юношеский ревматоидный артрит, болезнь Кавасаки, миастенический синдром Ламберта-Итона, лейкоцитокластический васкулит, красный плоский лишай, склерозирующий лишай, IgA-зависимый линейный дерматоз, волчаночный гепатит также известный, как аутоиммунный гепатит, красная волчанка, синдром Маджида, микроскопический колит, микроскопический полиангиит, синдром Миллера-Фишера, смешанное заболевание соединительной ткани, ограниченная склеродермия, болезнь Муха-Габермана также известная, как острый лихеноидный и вариолиформный параспориоз, рассеянный склероз, тяжелая миастения, миозит, болезнь Меньера, нарколепсия, нейромиелит зрительного нерва, нейромиотония, рубцующийся пемфигоид глаз, опсо-миоклональный синдром, тиреоидит Орда, палиндромный ревматизм, PANDAS (педиатрические аутоиммунные нейропсихиатрические расстройства, связанные со стрептококковой инфекцией), паранеопластическая дегенерация мозжечка, пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH), синдром Парри-Ромберга, парспланит, синдром Персонейджа-Тернера, обыкновенная пузырьчатка, перивенозный энцефаломиелит, пернициозная анемия, ROEMS-синдром, узелковый периартериит, ревматическая полимиалгия, полимиозит, первичный биллиарный цирроз, первичный склерозирующий холангит, прогрессирующая воспалительная нейропатия, псориаз, псориатический артрит, истинная эритроцитарная аплазия, гангренозная пиодермия, энцефалит Расмуссена, феномен Рейно, синдром Рейтера, рецидивирующий полихондрит, синдром беспокойных ног, ретроперитонеальный фиброз, ревматическая атака, ревматоидный артрит, саркоидоз, шизофрения, синдром Шмидта, синдром Шницлера, склерит, склеродермия, сывороточная болезнь, синдром Шегрена, спондилоартропатия, синдром мышечной скованности, болезнь Стилла, подострый бактериальный эндокардит (SBE), синдром

Сусака, синдром Свита, хорей Сиденгама, симпатическая офтальмия, системная красная волчанка, синдром Такаясу, височный артериит, тромбоцитопения, синдром Толоса-Ханта, поперечный миелит, язвенный колит, недифференцированная спондилоартропатия, уртикарный васкулит, васкулит, витилиго, гранулематоз Вегенера.

Термин "иммуномодулятор" как применяют в настоящем документе относится к любому терапевтическому средству, которое модулирует иммунную систему. Примеры иммуномодуляторов включают эйкозаноиды, цитокины, простагландины, интерлейкины, хемокины, регуляторы контрольных точек, члены суперсемейства TNF, члены суперсемейства рецепторов TNF и интерфероны. Специфические примеры иммуномодуляторов включают PGI₂, PGE₂, PGF₂, CCL14, CCL19, CCL20, CCL21, CCL25, CCL27, CXCL12, CXCL13, CXCL-8, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CXCL10, IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12, IL13, IL15, IL17, INF- α , INF- β , INF- ϵ , INF- γ , G-CSF, TNF- α , CTLA, CD20, PD1, PD1L1, PD1L2, ICOS, CD200, CD52, LT α , LT $\alpha\beta$, LIGHT, CD27L, 41BBL, FasL, O \times 40L, April, TL1A, CD30L, TRAIL, RANKL, BAFF, TWEAK, CD40L, EDA1, EDA2, APP, NGF, TNFR1, TNFR2, LT β R, HVEM, CD27, 4-1BB, Fas, O \times 40, AITR, DR3, CD30, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, BAFFR, TACI, BCMA, Fn14, CD40, EDAR XEDAR, DR6, DcR3, NGFR-p75 и Taj. Другие примеры иммуномодуляторов включают тоцилизумаб (актепра), CDP870 (симзия), этанерцепт (энбрел), адалимумаб (хумира), кинерет, абатацепт (оренсия), инфликсимаб (ремикейд), ритуксимаб (ритуксан), голимумаб (симпони), авонекс, ребиф, рециген, плегриди, бетасерон, копаксон, новатрон, натализумаб (тисабри), финголимод (гиления), терифлуномид (абаджио), BG12, текфидера и алектузумаб (кэмпас, лемтрада).

Рак представляет собой группу заболеваний, характеризующихся аномальным клеточным ростом и потенциалом к инвазии или метастазированию в другие части организма. Приводимые в качестве примера раковые заболевания, описанные национальным институтом рака включают: острый лимфобластный лейкоз у взрослых; острый лимфобластный лейкоз у детей; острый миелолейкоз у взрослых; аденокарцинома;

адренкортикальная карцинома у детей; AIDS-связанная лимфома; AIDS-связанные злокачественные новообразования; анальный рак; мозжечковая астроцитома у детей; церебральная астроцитома у детей; рак желчного протока, внепеченочный; рак мочевого пузыря; рак мочевого пузыря у детей; рак кости, остеосаркома/злокачественная фиброзная гистиоцитома; глиома ствола мозга у детей; опухоль головного мозга у взрослых; опухоль головного мозга, глиома ствола мозга у детей; опухоль головного мозга, мозжечковая астроцитома у детей; опухоль головного мозга, церебральная астроцитома/злокачественная глиома у детей; опухоль головного мозга, эпендимома у детей; опухоль головного мозга, медуллобластома у детей; опухоль головного мозга, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли у детей; опухоль головного мозга, Глиома зрительного пути и гипоталамуса у детей; опухоль головного мозга у детей (другие); рак молочной железы; рак молочной железы и беременность; рак молочной железы у детей; рак молочной железы у мужчин; бронхиальные аденомы/карциноиды у детей: карциноидная опухоль у детей; карциноидная опухоль желудочно-кишечного тракта; адренкортикальная карцинома; карцинома островковых клеток; карцинома с неизвестным первичным очагом; первичная лимфома центральной нервной системы; мозжечковая астроцитома у детей; церебральная астроцитома/злокачественная глиома у детей; рак шейки матки; раковые заболевания у детей; хронический лимфоцитарный лейкоз; хронический миелогенный лейкоз; хронические миелопролиферативные нарушения; светлоклеточная саркома сухожильного влагалища; рак толстого кишечника; колоректальный рак у детей; Т-клеточная лимфома кожи; рак эндометрия; эпендимома у детей; эпителиальный рак яичника; рак пищевода; рак пищевода у детей; семейство опухолей Юинга; экстракраниальная герминогенная опухоль у детей; экстрагонадная герминогенная опухоль; внепеченочный рак желчного протока; рак глаза, интраокулярная меланома; рак глаза, ретинобластома; рак желчного пузыря; рак желудка; рак желудка у детей; карциноидная опухоль желудочно-кишечного тракта; герминогенная опухоль, экстракраниальная у детей; герминогенная опухоль,

экстрагонадная; герминогенная опухоль яичника; гестационная трофобластическая опухоль; глиома ствола мозга у детей; глиома зрительного пути и гипоталамуса у детей; волосатоклеточный лейкоз; рак головы и шеи; гепатоцеллюлярный рак (рак печени) у взрослых (первичный); гепатоцеллюлярный рак (рак печени) у детей (первичный); лимфома Ходжкина у взрослых; лимфома Ходжкина у детей; лимфома Ходжкина во время беременности; гипоталамический рак; глиома гипоталамуса и зрительного пути у детей; интраокулярная меланома; карцинома островковых клеток (эндокринных поджелудочной железы); саркома Капоши; рак почки; рак гортани; рак гортани у детей; лейкемия, острая лимфобластная у взрослых; лейкемия, острая лимфобластная у детей; лейкемия, острая миелоидная у взрослых; лейкемия, острая миелоидная у детей; лейкемия, хроническая лимфоцитарная; лейкемия, хроническая миелогенная; лейкемия, волосатоклеточная; рак губ и ротовой полости; рак печени у взрослых (первичный); рак печени у детей (первичный); рак легких, немелкоклеточный; рак легких, мелкоклеточный; лимфобластная лейкемия у взрослых острая; лимфобластная лейкемия у детей острая; лимфоцитарная лейкемия, хроническая; лимфома, AIDS-связанная; лимфома центральной нервной системы (первичная); лимфома, кожная Т-клеточная; лимфома Ходжкина у взрослых; лимфома Ходжкина у детей; лимфома Ходжкина во время беременности; лимфома, неходжкинская у взрослых; лимфома неходжкинская у детей; лимфома, неходжкинская во время беременности; лимфома центральной нервной системы, первичная; макроглобулинемия, Вальденстрема; рак молочной железы у мужчин; злокачественная мезотелиома у взрослых; злокачественная мезотелиома у детей; злокачественная тимома; медуллобластома у детей; меланома; меланома, интраокулярная; карцинома клеток Меркеля; мезотелиома, злокачественная; метастатический плоскоклеточный рак шеи с первичным очагом неизвестного происхождения; синдром множественной эндокринной неоплазии у детей; множественная миелома/неоплазия плазматических клеток; фунгоидный микоз; миелодиспластические синдромы; миелогенная лейкемия, хроническая; миелолейкоз у детей, острый; миелома, множественная; миелопролиферативные

нарушения, хронические; рак носовой полости и околоносовых пазух; носоглоточный рак; носоглоточный рак у детей; нейробластома; неходжкинская лимфома у взрослых; неходжкинская лимфома у детей; неходжкинская лимфома во время беременности; немелкоклеточный рак легких; рак ротовой полости у детей; рак ротовой полости и губ; ротоглоточный рак; остеосаркома/злокачественная фиброзная гистиоцитома кости; рак яичников у детей; эпителиальный рак яичников; герминогенная опухоль яичников; опухоль яичников с низким потенциалом злокачественности; рак поджелудочной железы; рак поджелудочной железы у детей, рак поджелудочной железы, островковые клетки; рак носовой полости и околоносовых пазух; рак паращитовидной железы; пениальный рак; феохромоцитома; пинеальные и супратентореальные примитивные нейроэктодермальные опухоли у детей; опухоль гипофиза; неоплазия плазматических клеток/множественная миелома; плевроролечная бластома; беременность и рак молочной железы; беременность и лимфома Ходжкина; беременность и неходжкинская лимфома; первичная лимфома центральной нервной системы; первичный рак печени у взрослых; первичный рак печени у детей; рак предстательной железы; рак прямой кишки; почечно-клеточный рак (рк почек); почечно-клеточный рак у детей; переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника; ретинобластома; рабдомиосаркома у детей; рак слюнной железы; рак слюнной железы у детей; семейство опухолей типа саркомы Юинга; саркома Капоши; саркома (остеосаркома)/злокачественная фиброзная гистиоцитома кости; саркома, рабдомиосаркома у детей; саркома мягких тканей у взрослых; саркома мягких тканей у детей; синдром Сезари; рак кожи; рак кожи у детей; рак кожи (меланома); карцинома кожи, клетки Меркеля; мелкоклеточный рак легких; рак тонкого кишечника; саркома мягких тканей у взрослых; саркома мягких тканей у детей; плоскоклеточный рак шеи с первичным очагом неизвестного происхождения, метастатический; рак желудка; рак желудка у детей; супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли у детей; Т-клеточная лимфома, кожная; рак яичка; тимома у детей; тимома, злокачественная; рак

щитовидной железы; рак щитовидной железы у детей; переходноклеточный рак почечной лоханки и мочеточника; трофобластическая опухоль, гестационная; рак у детей с неизвестным первичным очагом; необычные раковые заболевания у детей; переходноклеточный рак мочеточника и почечной лоханки; уретральный рак; саркома матки; рак влагалища; глиома зрительного пути и гипоталамуса у детей; рак вульвы; макроглобулинемия Вальденстрема; и опухоль Вильмса.

Термин "химиотерапевтическое средство", как применяют в настоящем документе, относится к любому терапевтическому средству, применяемому для лечения рака. Примеры химиотерапевтическ средства в качестве неограничивающих примеров включают, актиномицин, азацитидин, азатиоприн, блеомицин, бортезомиб, карбоплатин, капецитабин, цисплатин, хлорамбуцил, циклофосфамид, цитарабин, даунорубицин, доцетаксел, доксифлуридин, доксорубицин, эпирубицин, эпотилон, этопозид, фторурацил, гемцитабин, гидроксимочевина, идарубицин, иматиниб, иринотекан, мехлоретамин, меркаптопурин, метотрексат, митоксантрон, оксалиплатин, паклитаксел, пеметрексед, тенипозид, тиогуанин, топотекан, валрубицин, винбластин, винкристин, виндезин, винорелбин, панитумумаб, эрбитукс (цетуксимаб), матузумаб, IMC-IIIF 8, TheraCIM hR3, деносумаб, авастин (бевацизумаб), хумира (адалимумаб), герцептин (трастузумаб), ремикейд (инфликсимаб), ритуксимаб, синегис (паливизумаб), милотарг (гемтузумаб озогамин), раптива (эфализумаб), тисабри (натализумаб), зенапакс (даклизумаб), NeutroSpec (технеций (99mTc) фанолезумаб), тоцилизумаб, ProstaScint (меченый индием-111 капромаб пендетид), бексар (тозитумомаб), зевалин (ибритумомаб тиуксетан (IDEC-Y2B8), конъюгированный с иттрием 90), ксолар (омализумаб), мабтера (ритуксимаб), реопро (абциксимаб), мабкэмпас (алемтузумаб), симулект (базиликсимаб), лейкоскан (сулезумаб), СЕА-скан (арцитумомаб), верлума (нофетумомаб), панорекс (эдреколомаб), алемтузумаб, CDP 870 и натализумаб.

Слитый белок по изобретению можно использовать в

комбинации, например, с иммуномодулятором или химиотерапевтическим средством. Лечение с применением слитого белка по изобретению включает введение перед, после или по существу в то же время, что и другие препараты, такие как, например, иммуномодуляторы или химиотерапевтические средства.

Иммунная система является системой биологических структур и процессов внутри организма, которая защищает против заболевания. Эта система является диффузной, сложной сетью взаимодействующих клеток, клеточных продуктов и формирующих клетки тканей, которые защищают тело от патогенов и других чужеродных веществ, разрушает инфицированные и злокачественные клетки и удаляет клеточный дебрис: система включает тимус, селезенку, лимфоузлы и лимфатическую ткань, стволовые клетки, лейкоциты, антитела и лимфокины. В-клетки или В-лимфоциты представляют собой тип лимфоцитов, задействованных в гуморальном иммунитете адаптивной иммунной системы и важны для иммунного надзора. Т-клетки или Т-лимфоциты представляют собой тип лимфоцитов, которые играют центральную роль в клеточном иммунитете. Существуют два основных подтипа Т-клеток: Т-киллерные клетки и Т-хелперные клетки. Кроме того, существуют Т-супрессорные клетки, которые играют роль в модулирующем иммунном ответе. Т-киллерные клетки распознают только антигены, соединенные с МНС молекулами I класса, в то время как Т-хелперные клетки распознают только антигены, соединенные с молекулами МНС II класса. Эти два механизма презентации антигена отражают различные роли двух типов Т-клеток. Третьим минорным подтипом являются $\gamma\delta$ Т-клетки, которые распознают интактные антигены, которые не связаны с МНС рецепторы. В противоположность этому, В-клеточный антиген-специфический рецептор является молекулой антитела на В-клеточной поверхности, и распознает целые патогены без какой-либо необходимости в процессинге антигена. Каждая линия дифференцировки В-клеток экспрессирует различное антитело, таким образом, полный набор В-клеточных антигенных рецепторов представляет все антитела, которые тело может производить.

В- и Т-клеточный аттенватор (BTLA или CD272) является

неотъемлемой частью иммунной системы. ВТЛА экспрессия индуцируется во время активации Т-клеток, и экспрессия ВТЛА сохраняется на Th1-клетках, но не Th2-клетках. Подобно белку программируемой гибели клеток 1 (PD1) и цитотоксическому Т-лимфоцит ассоциированному белку 4 (CTLA4), ВТЛА активирует ингибирующие сигнальные пути, регулирующие Т-клеточную активацию. Однако, в отличие от PD-1 и CTLA-4, ВТЛА демонстрирует Т-клеточное ингибирование через взаимодействие с рецепторами семейства факторов некроза опухоли (TNF-R), а не семейства рецепторов клеточной поверхности B7. ВТЛА является лигандом для члена 14 (TNFRSF14) суперсемейства факторов некроза опухоли (рецептор), также известного как медиатор проникновения вируса герпеса (HVEM). ВТЛА-HVEM комплексы отрицательно регулируют Т-клеточные иммунные ответы.

Член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF) медиатор проникновения вируса герпеса (HVEM) (TNFRSF14) связывает канонические TNF-связанные лиганды, лимфотоксин- α (LT- α) и LIGHT; однако, отличительной особенностью HVEM является взаимодействие с членами суперсемейства иммуноглобулинов, аттенуатором В- и Т-лимфоцитов (ВТЛА) и CD160. Способность HVEM взаимодействовать с множеством лигандов в различных конфигурациях создает функционально различный набор присущих и двунаправленных путей передачи сигнала. Способность связывать эти различные лиганды свойственна двум различным топографическим областям во внеклеточном домене HVEM. Эти различные сайты придают HVEM возможность активировать и провоспалительные, и ингибирующие пути. Учитывая взаимосвязь HVEM с несколькими путями передачи сигнала, неудивительно, что он играет важные роли в иммунной системе, такие как костимуляция Т-клеток, регуляция гомеостаза дендритных клеток (DC), аутоиммунно-опосредованные воспалительные ответы, а также ответ хозяина против патогенов. HVEM может также играть значительные роли вне иммунной системы, в регуляции развития сенсорных нейронов и метаболизме адипоцитов. Белок HVEM человека имеет 283 аминокислоты (SEQ ID NO:2). Внеклеточный домен включает 164

аминокислотных остатка, например аминокислоты 39-202. Слитый белок по настоящему изобретению включает, по меньшей мере, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 180, 190 или больше остатков HVEM белка (SEQ ID NO:2). Слитый белок по настоящему изобретению может включать, например, аминокислотные остатки 1-283, 1-202, 1-184, 1-161, 39-202 или 39-161 HVEM белка (SEQ ID NO:2).

Как применяют в настоящем документе, термин "неприродный HVEM белок" относится к HVEM белку (SEQ ID NO:2, фигура 19B), содержащему, по меньшей мере, одну или более мутаций. Слитый белок по настоящему изобретению включает, по меньшей мере, одну мутацию, например, S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A или их сочетание. Слитый белок по настоящему изобретению включает, по меньшей мере, одну дополнительную мутацию в HVEM белке, например, S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A или их сочетание. Слитый белок по настоящему изобретению может включать, по меньшей мере, два, три, четыре или больше мутаций в HVEM белке, например, S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A или их сочетание. Слитый белок по настоящему изобретению включает, по меньшей мере, одну мутацию в HVEM белке, такую как S58R; S58K; S58Q; G68T; L70D; L70E; L70N; L70W; L90A; S58R и L90A; S58R, L70D и L90A; S58R, G68T и L90A; S58R, L70W и L90A; S58R, G68T, L70D и L90A; или S58R, G68T, L70W и L90A.

BTLA использует особую поверхность для взаимодействия с HVEM. BTLA/HVEM путь играет важную роль в поддержании иммунологической толерантности и предотвращении аутоиммунных заболеваний. У BTLA-дефицитных мышей развивается ревматоидный артрит, лимфоцитарная инфильтрация, заболевания, подобные аутоиммунному гепатиту (AIH) и EAE. У HVEM-дефицитных мышей продемонстрирована подверженность EAE, индуцированной MOG пептидом, и повышенной Т-клеточной пролиферации и продукции цитокинов. Антагонистический HVEM-Ig усугубляет аутоиммунную реакцию при коллаген-индуцированном артрит в мышях с DBA1

генетическим фоном. Таким образом, усиленная экспрессия BTLA в активированных Т-клетках была бы многообещающей стратегией для лечения аутоиммунных заболеваний.

В отношении противоопухолевого иммунитета, CD8⁺ Т-клетки, специфичные для опухолевых антигенов, начинают постоянно экспрессировать BTLA. Было опубликовано, что CpG вакцинация частично подавляет экспрессию BTLA в CD8⁺ Т-клетках, специфичных для опухолевых антигенов, и блокирует BTLA/HVEM-опосредованный ингибирующий сигнал. Хотя блокирование BTLA/HVEM пути выглядит уместным в качестве средства для усиления функций эффекторных Т-клеток, особое внимание необходимо уделить сложности HVEM-взаимодействующих молекул. CD160, IgSF ингибирующий рецептор, также связывает HVEM. Кроме того, LIGHT, член семейства TNF, передает костимулирующий сигнал при взаимодействии с HVEM. Эти множественные пути создают для нас сложность при установлении новых терапевтических воздействий на злокачественные новообразования.

Управление BTLA/HVEM путем может стать многообещающей стратегией лечения пациентов с инфекциями. BTLA является индуцированным во время *P. berghei* ANKA инфекции у мышей, и анти-BTLA антагонистический mAb значительно сокращает частоту церебральной малярии, вызванной простейшими. Таким образом, патогены, искажающие BTLA/HVEM путь, могут представлять собой идеальные мишени для анти-BTLA mAb иммунотерапии.

Успешная активация сигналинга ингибирующего рецептора зависит от способности агонистов рецепторов вступать во взаимодействие с конфигурациями ингибирующего рецептора в активированном состоянии, подобно активированной конфигурации рецептор-лиганд. Агонист рецептора в форме антитела будет вступать во взаимодействие с конкретными эпитопами ингибирующих рецепторов, таких как аттенуатор В и Т-лимфоцитов (BTLA), что может стимулировать эту активированную конфигурацию, приводя к усиленному BTLA сигналингу. Эпитоп этих антител не будет перекрываться с участком связывания BTLA рецептора медиатора проникновения вируса герпеса (HVEM). Функция этих антител будет заключаться в усилении сигналинга посредством активации

фосфорилирования цитоплазматического домена VTLA, и вовлечении и фосфорилировании ассоциированных белков, включая SHP1 и 2, другие сигнальные белки, вовлеченные цитоплазматическим доменом VTLA в качестве маркера активации. Ожидается, что активация ингибирующего нисходящего пути сигналинга VTLA отрицательно регулирует нормальные пути передачи сигнала нисходящего пути T-клеточного рецептора в T-клетках, и B-клеточного рецептора в B-клетках. Дополнительно, VTLA ингибирующий сигналинг отрицательно регулирует сигналинг цитокинов IL-7 и интерферон I типа в присущих клетках, таких как $\gamma\delta$ T-клетки и клетки естественные киллеры (NK).

Большая часть генома β -герпесвируса цитомегаловируса (CMV) предназначена для уклонения от иммунной ответа хозяина, и многие из этих генов используются при прогрессировании вируса в направлении установления состояния латентной инфекции. CMV экспрессирует имитатор HVEM (ORF UL144), который связывает VTLA и ингибирует T-клеточную пролиферацию в большей степени, чем HVEM. Недавно было показано, что UL144 не связывает HVEM рецептор CD160, предотвращая активацию NK-клеток. Активация цитолитических клеток также является критичной при иммунных ответах на раковые заболевания, и опухоли с мутациями в сигнальных путях, связанных с иммунологическим распознаванием, ассоциированы с более агрессивным разрастанием опухоли и смертностью. В фолликулярной лимфоме (FL) человека наиболее распространенная вторичная мутация происходит в TNFRSF14, в то время как в диффузной B-крупноклеточной лимфоме (DLBCL) TNFRSF14 также часто является мутированным, что приводит к генной делеции или потере экспрессии. Однако, для субпопуляции лимфом было предсказано несколько мутаций, которые влияют на связывание HVEM лиганда. Остается неясным, как эти мутации или измененные взаимодействия лиганда могут влиять на приспособляемость лимфомы внутри опухолевого микроокружения.

Подобно вирусному UL144 белку, несколько лимфом HVEM мутантов демонстрируют отбор лиганда для VTLA, без связывания CD160. Экспрессия CD160 сдерживает вступление в контакт HVEM

дикого типа с BTLA и ингибирование сигналинга T-клеточного рецептора. В противоположность этому, BTLA активация, запускаемая посредством вирусного и мутантного HVEM является стерически незатрудненной посредством CD160 экспрессии. В конечном итоге, выявлено, что активирование BTLA ингибирует фосфорилирование индуцированного цитокинами переносчика сигнала и активатора транскрипции (STAT) в CD160-экспрессирующих NK-клетках, и что вирусный UL144 белок более эффективно ингибирует цитокиновый сигналинг, чем HVEM дикого типа. Таким образом, конкуренция лигандов мешает HVEM равномерно вступать в контакт с ингибирующими сигналами, в то время как селективность лиганда обеспечивает возможность вирусного и мутантного HVEM запускать уникально ингибирующую функцию, указывая на путь в направлении разработки BTLA-селективного агониста. Вместе эти данные указывают на потенциальное селективное давление для эволюции UL144 в CMV и для приобретения соматических TNFRSF14 мутаций в лимфоме, стимулируя ингибирующий и лимитирующий воспалительный сигналинг при инфекции и раке.

В одном из вариантов осуществления, настоящее изобретение относится к слитому белку, включая неприродный HVEM белок и Fc белок, где слитый белок включает внеклеточный домен HVEM белка и Fc белка. В одном из аспектов, слитый белок является BTLA агонистом. В другом аспекте слитый белок включает, по меньшей мере, одну мутацию в HVEM белке. В дополнительном аспекте, мутация представляет собой S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A или их сочетание. В одном из аспектов, слитый белок дополнительно включает, по меньшей мере, одну мутацию в HVEM белке, например, S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A или их сочетание. В другом аспекте слитый белок включает, по меньшей мере, две, три, четыре или более мутаций в HVEM белке, например, S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A или их сочетание. В определенных аспектах, слитый белок включает, по меньшей мере, одну мутацию в HVEM белке, такую как S58R; S58K; S58Q; L70D; L70E; L70N; L90A; S58R и L90A; S58R и G68T; S58R и L70W; S58R, L70D и L90A; S58R, G68T и L90A; S58R, L70W и L90A; S58R, G68T, L70D и L90A; или S58R, G68T, L70W

и L90A. В одном из аспектов, Fc белок представляет собой IgA, IgG, IgD, IgE или IgM. В другом аспекте Fc белок представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В конкретном аспекте, IgG Fc белок является человеческим.

В дополнительном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей слитый белок, такой как неприродный HVEM белок и Fc белок, и фармацевтически приемлемый носитель. В одном из аспектов, слитый белок является BTLA агонистом. В другом аспекте слитый белок включает внеклеточный домен HVEM белка и Fc белок. В другом аспекте слитый белок включает, по меньшей мере, одну мутацию в HVEM белке. В дополнительном аспекте, мутацией является S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A или их сочетание. В дополнительном аспекте, слитый белок дополнительно включает, по меньшей мере, одну мутацию в HVEM белке, например, S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A или их сочетание. В другом аспекте слитый белок включает, по меньшей мере, две, три, четыре или более мутаций в HVEM белке, например, S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A или их сочетание. В определенных аспектах, слитый белок включает, по меньшей мере, одну мутацию в HVEM белке, такую как S58R; S58K; S58Q; L70D; L70E; L70N; L90A; S58R и L90A; S58R и G68T; S58R и L70W; S58R, L70D и L90A; S58R, G68T и L90A; S58R, L70W и L90A; S58R, G68T, L70D и L90A; или S58R, G68T, L70W и L90A. В одном из аспектов, Fc белок представляет собой IgA, IgG, IgD, IgE или IgM. В другом аспекте Fc белок представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В конкретном аспекте, IgG Fc белок является человеческим.

В одном из вариантов осуществления, настоящее изобретение относится к способу лечения связанного с BTLA расстройства, включая введение слитого белка, такого как неприродный HVEM белок и Fc белок, нуждающемуся в этом индивидууму, таким образом, оказывая лечение связанного с BTLA расстройства. В одном из аспектов, связанным с BTLA расстройством является рак или аутоиммунное заболевание или расстройство. В дополнительном аспекте, аутоиммунным заболеванием или расстройством является болезнь Аддисона, боковой амиотрофический склероз, болезнь

Крона, синдром Кушинга, сахарный диабет тип 1, реакция «трансплантат против хозяина», болезнь Грэйвса, синдром Гийена-Барре, красная волчанка, рассеянный склероз, псориаз, псориатический артрит, ревматоидный артрит, саркоидоз, склеродермия, системная красная волчанка, отторжение трансплантата или васкулит. В другом аспекте раковым заболеванием является рак простаты, кишечника, живота, кости, молочной железы, пищеварительной системы, печени, поджелудочной железы, перитонеальной полости, эндокринных желез (надпочечников, паращитовидных желез, гипофиза, семенников, яичника, тимуса, щитовидной железы), глаза, головы и шеи, нервной системы (центральной и периферической), лимфатической системы, органов таза, кожи, мягких тканей, селезенки, органов грудной клетки, или мочеполовых путей. В дополнительном аспекте, BTLA сигналинг является повышенным. В другом аспекте слитый белок является BTLA агонистом.

В одном из аспектов, слитый белок включает внеклеточный домен HVEM белка и Fc белок. В дополнительном аспекте, слитый белок включает аминокислотные остатки 39-161 SEQ ID NO:2 и Fc белок. В дополнительном аспекте, Fc белок представляет собой IgA, IgG, IgD, IgE или IgM. В определенных аспектах, Fc белок представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В конкретном аспекте, IgG Fc белок является человеческим. В одном из аспектов, слитый белок включает, по меньшей мере, одну мутацию в HVEM белке. В дополнительном аспекте, мутацией является S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A или их сочетание. В одном из аспектов, слитый белок дополнительно включает, по меньшей мере, одну мутацию в HVEM белке, например, S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A или их сочетание. В другом аспекте слитый белок включает, по меньшей мере, две, три, четыре или более мутаций в HVEM белке, например, S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A или их сочетание. В определенных аспектах, слитый белок включает, по меньшей мере, одну мутацию в HVEM белке, такую как S58R; S58K; S58Q; L70D; L70E; L70N; L90A; S58R и L90A; S58R и G68T; S58R и L70W; S58R, L70D и L90A; S58R, G68T и L90A; S58R, L70W и L90A; S58R, G68T,

L70D и L90A; или S58R, G68T, L70W и L90A.

В одном из аспектов, способ также включает введение модулятора иммунного ответа или химиотерапевтического средства. В другом аспекте модулятором иммунного ответа являются эйкозаноиды, цитокины, простагландины, интерлейкины, хемокины, регуляторы контрольных точек, члены суперсемейства TNF, члены суперсемейства рецепторов TNF и/или интерфероны. В дополнительном аспекте, модулятором иммунного ответа является CXCL-8, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CXCL10, IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12, IL13, IL15, IL17, IL17, IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- γ , G-CSF, TNF- α , CTLA4, CD20, PD1, PD1L1, PD1L2, ICOS, CD200, CD52, LT α , LT $\alpha\beta$, LIGHT, CD27L, 41BBL, FasL, O \times 40L, April, TL1A, CD30L, TRAIL, RANKL, BAFF, TWEAK, CD40L, EDA1, EDA2, APP, NGF, TNFR1, TNFR2, LT β R, HVEM, CD27, 4-1BB, Fas, O \times 40, AITR, DR3, CD30, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, BAFFR, TACI, BCMA, Fn14, CD40, EDAR XEDAR, DR6, DcR3, NGFR-p75 и/или Та β . В определенных аспектах, модулятором иммунного ответа является тоцилизумаб (актемра), CDP870 (симзия), этанерцепт (энбрел), адалимумаб (хумира), кинерет, абатацепт (оренсия), инфликсимаб (ремикеид), ритуксимаб (ритуксан), голимумаб (симпони), авонекс, ребиф, рециген, плегриди, бетасерон, копаксон, новатрон, натализумаб (тисабри), финголимод (гиления), терифлуномид (абаджио), BG12, текфидера и/или алемтузумаб (кэмпас, лемтрада).

В дополнительном аспекте, химиотерапевтическим средством является актиномицин, азацитидин, азатиоприн, блеомицин, бортезомиб, карбоплатин, капецитабин, цисплатин, хлорамбуцил, циклофосфамид, цитарабин, даунорубицин, доцетаксел, доксифлуридин, доксорубицин, эпирубицин, эпотилон, этопозид, фторурацил, гемцитабин, гидроксимочевина, идарубицин, иматиниб, иринотекан, мехлоретамин, меркаптопурин, метотрексат, митоксантрон, оксалиплатин, паклитаксел, пеметрексед, тенипозид, тиогуанин, топотекан, валрубицин, винбластин, винкристин, виндезин, винорелбин, панитумумаб, эрбитукс (цетуксимаб), матузумаб, IMC-IIIF 8, TheraCIM hR3, деносумаб, авастин

(бевацизумаб), хумира (адалимумаб), герцептин (трастузумаб), ремикейд (инфликсимаб), ритуксимаб, синагис (паливизумаб), милотарг (гемтузумаб озогамицин), раптива (эфализумаб), тисабри (натализумаб), зенапакс (даклизумаб), NeutroSpec (технеций (99mTc) фанолезумаб), тоцилизумаб, ProstaScint (меченый индием-111 капромаб пендетид), бексар (тозитумомаб), зевалин (ибритумомаб тиуксетан (IDEC-Y2B8) конъюгированный с иттрием 90), ксолар (омализумаб), мабтера (ритуксимаб), реопро (абциксимаб), мабкэмпас (алемтузумаб), симулект (базиликсимаб), лейкоскан (сулезумаб), СЕА-скан (арцитумомаб), верлума (нофетумомаб), панорекс (эдреколомаб), алемтузумаб, CDP 870 и/или натализумаб. В одном из аспектов, фосфорилирование ERK1/2 и/или ZAP70/Syk является сниженным. В другом аспекте общее клеточное фосфорилирование и фосфорилирование SHP2 является индуцированным.

В дополнительном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к способу модулирования иммунного ответа у индивидуума, включая введение слитого белка, такого как неприродный HVEM белок и Fc белок, индивидууму, таким образом, модулируя иммунный ответ. В одном из аспектов, слитый белок является BTLA агонистом. В другом аспекте слитый белок включает внеклеточный домен HVEM белка и Fc белок. В другом аспекте слитый белок включает, по меньшей мере, одну мутацию в HVEM белке. В дополнительном аспекте, мутацией является S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A или их сочетание. В дополнительном аспекте, слитый белок дополнительно включает, по меньшей мере, одну мутацию в HVEM белке, например, S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A или их сочетание. В другом аспекте слитый белок включает, по меньшей мере, две, три, четыре или более мутаций в HVEM белке, например, S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A или их сочетание. В определенных аспектах, слитый белок включает, по меньшей мере, одну мутацию в HVEM белке, такую как S58R; S58K; S58Q; L70D; L70E; L70N; L90A; S58R и L90A; S58R и G68T; S58R и L70W; S58R, L70D и L90A; S58R, G68T и L90A; S58R, L70W и L90A; S58R, G68T, L70D и L90A; или S58R, G68T, L70W и L90A. В одном из аспектов,

Fc белок представляет собой IgA, IgG, IgD, IgE или IgM. В другом аспекте Fc белок представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В конкретном аспекте, IgG Fc белок является человеческим. В одном из аспектов, BTLA сигналинг является повышенным. В другом аспекте фосфорилирование ERK1/2 и/или ZAP70/Syk является сниженным. В дополнительном аспекте, общее клеточное фосфорилирование и фосфорилирование SHP2 является индуцированным. В дополнительном аспекте, индивидуум имеет связанное с BTLA заболевание или расстройство. В определенных аспектах, связанным с BTLA заболеванием является рак или аутоиммунное заболевание или расстройство.

В одном из вариантов осуществления, настоящее изобретение относится к способу модулирования BTLA сигналинга в клетке, включая контактирование BTLA экспрессирующей клетки со слитым белком, таким как неприродный HVEM белок и Fc белок, таким образом, модулируя BTLA сигналинг. В одном из вариантов, BTLA сигналинг является повышенным. В другом аспекте слитый белок включает внеклеточный домен HVEM белка и Fc белок. В другом аспекте слитый белок включает, по меньшей мере, одну мутацию в HVEM белке. В дополнительном аспекте, мутацией является S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A или их сочетание. В дополнительном аспекте, слитый белок дополнительно включает, по меньшей мере, одну мутацию в HVEM белке, например, S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A или их сочетание. В другом аспекте слитый белок включает, по меньшей мере, две, три, четыре или более мутаций в HVEM белке, например, S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A или их сочетание. В определенных аспектах, слитый белок включает, по меньшей мере, одну мутацию в HVEM белке, такую как S58R; S58K; S58Q; L70D; L70E; L70N; L90A; S58R и L90A; S58R и G68T; S58R и L70W; S58R, L70D и L90A; S58R, G68T и L90A; S58R, L70W и L90A; S58R, G68T, L70D и L90A; или S58R, G68T, L70W и L90A. В одном из аспектов, Fc белок представляет собой IgA, IgG, IgD, IgE или IgM. В другом аспекте Fc белок представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В конкретном аспекте, IgG Fc белок является человеческим. В одном из аспектов, фосфорилирование ERK1/2 и/или ZAP70/Syk является

сниженным. В другом аспекте общее клеточное фосфорилирование и фосфорилирование SHP2 является индуцированным.

Изобретение с учетом всех этих аспектов проиллюстрировано дополнительно в следующих примерах. Примеры, однако, не ограничивают объем изобретения, которое определяется приложенной формулой изобретения.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1

UL144 остатки, гомологичные HVEM, необходимы для связывания с BTLA

Кодируемый CMV человека UL144 селективно связывает BTLA, но не CD160, и ингибирует T-клеточную пролиферацию, активированную посредством сигналинга T-клеточного рецептора, в большей степени, чем HVEM белки. Чтобы определить, является ли выбор BTLA посредством UL144 результатом уникального взаимодействия между поверхностями этих двух белков, структура BTLA контактной поверхности UL144 была смоделирована на HVEM-BTLA сокристалле с предварительно определенной структурой (фигура 1A). Затем, нацеливались на поверхностные остатки UL144, которые отличались от HVEM, посредством аланин- и гомология-сканирующего мутагенеза для скрининга потенциальных BTLA связывающих поверхностей (фигура 1). Наблюдали, что мутация в нескольких UL144 остатках нарушала или снижала связывание BTLA, что определяет поверхность, центрированную на одной стороне CRD1 области подобно BTLA связывающей поверхности HVEM. Наиболее критические мутации, которые достоверно экспрессируются на поверхности, происходят в Gly41 и Tyr42, гомологичных Gly60 и Tyr61 в HVEM (фигура 7). Ни для одной из гомология-сканирующих мутаций в UL144 не было выявлено дополнительного связывания лиганда с CD160 или с TNFSF лигандом, LIGHT, хотя G46K и N61A мутанты усиливали связывание с BTLA (фигура 1B, C и фигура 7). Таким образом, ни одна единичная мутация не восстанавливает CD160 связывание с UL144 белком, что указывает на то, что CMV вероятно сформировал UL144 для отбора BTLA связывания посредством множественных генетических модификаций. Специфические остатки влияют на BTLA связывание: Glu²⁷, Gln³³, Pro³⁶, Gly⁴¹, Tyr⁴², Thr⁵², Leu⁶⁸ по-видимому являются

необходимыми; Arg⁴³, Thr⁴⁵ обладают пониженным связыванием; Asn³², Gln⁴⁷, Gly⁴⁹, Gln⁵⁰ по-видимому не оказывают эффект; Gly⁴⁶, Asn⁶¹ повышают связывание.

Клетки и экспрессия поверхностных белков: EL4 и 293Т клетки культивировали в DMEM с 10% инактивированной нагреванием FBS, антибиотиками, L-глутамином и 50 μ M 2-ME. NK92 клетки культивировали в RPMI с 8% инактивированной нагреванием FBS, 8% лошадиной сыворотки, антибиотиками, L-глутамином и 50 μ M 2-ME с добавлением 100 U/ml IL-2. VJAB и Jurkat TAg (JTAg) клетки культивировали в RPMI с 10% инактивированной нагреванием FBS, антибиотиками, L-глутамином и 50 μ M 2-ME. EL4 клетки и VJAB клетки, трансдуцированные ретровирусами, содержащими дикий тип и мутантный BTLA человека (Watanabe et al. (2003); Nat Immunol 4:670) сортировали по GFP экспрессии для увеличения частоты BTLA экспрессирующих клеток. Псевдотипированный ретровирус для единичного заражения получали посредством котрансфекции ретровирусной плазмиды, рCG VSVg белка оболочки и Hit60 gag-pol, как описано ранее (Sedy et al. (2005), Nat Immunol 6:90). UL144 и BTLA мутанты получали посредством round-the-world PCR мутагенеза. Для исследований Fc связывания применяли 293Т клетки, трансдуцированные посредством кальций-фосфатной трансфекции с применением рND вектора, содержащего мутантный или дикого типа UL144. Все олигонуклеотиды, применяемые для PCR амплификации и сайт-специфического мутагенеза, перечислены в таблице 1. Для транзитной экспрессии HVEM лигандов в JTAg, клетки электропорировали с применением 10 μ g указанных DNA конструкций с контрольным вектором при 230V в течение 65 ms с применением T820 квадратно-волнового электропоратора.

Антитела и Fc слитые белки: Анти-HVEM человека приобретали в BD Biosciences. Антитела анти-BTLA человека, клоны MIN26 и J168, получали из eBioscience и BD Biosciences. Анти-BTLA человека, клон 6F4 и анти-UL144 клон 2F11, получали, как описано ранее (Cheung et al. (2005), Proc Natl Acad Sci 102:11318; Cheung et al. (2009a), J Immunol 183:7286). Ослиные анти-Fc γ и анти-Fc μ F(ab')₂ человека получали из Jackson Immunoresearch.

Антитела для идентификации популяции PBMC человека включают CD19 FITC, CD56 PE-Cy7, CD8 PE, CD3 PE 610, CD4 eFluor450 и CD69 PerCP-Cy5.5. Фосфо-специфические антитела включают фосфотирозин PE, фосфо-Akt (S473) PE и фосфо-SHP-2 (Y542) Alexa647, фосфо-ERK1/2 (pT202/pY204) PerCP-e710 и фосфо-NF-κB p65 (S529) PE. Fc слитые белки были сконструированы и получены следующим образом: эктодомен (остатки 1-184), включающий природную сигнальную последовательность HVEM человека, был слит на 3' конце с последовательностью IgG Fc человека. Для BTLA и CMV UL144 человека, остатки 26-150 и 19-132, соответственно, были слиты на 5' конце с сигнальной последовательностью Ig человека и на 3' конце с областями IgG Fc человека. Fc слитые белки получали в трансфицированных 293Т клетках, выращенных на бессывороточной среде CellGro Free и очищенных посредством аффинной хроматографии на колонках protein A. Контрольный белок IgG1 человека получали из Sigma-Aldrich. BTLA селективные HVEM мутантные белки конструировали *de novo* посредством трех раундов мутагенеза следующим образом: во-первых, аланин-мутагенез поверхностно-расположенных остатков для идентификации лиганд-связывающих горячих точек; во-вторых, насыщающий мутагенез в горячих точках для оптимизации воздействия на связывание лиганда; в-третьих, комбинаторный мутагенез для достижения BTLA-селективности и усиления аффинности.

Анализ связывания: Анализ связывания методом проточной цитометрии проводили, как описано ранее (Sedy et al., 2013). В кратком изложении, клетки инкубировали с Fc лигандами в течение 30 минут на льду в буфере (PBS с 2% FBS), дважды отмывали, инкубировали с анти-Fc вторичными антителами в течение 15 минут на льду в буфере, дважды отмывали и анализировали. Специфическую среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) рассчитывали посредством вычитания экспериментальной клеточной MFI из контрольной клеточной MFI.

Кинетический анализ аффинности методом поверхностного плазмонного резонанса: BTLA-Fc лиганд человека иммобилизовали на CM5 сенсорном чипе до 150 единиц ответа с использованием

сцепления аминов. Сенсограммы собирали при скорости потока 30 $\mu\text{l}/\text{min}$, 25 °C. Специфическое связывание определяли посредством вычитания контрольного канала из канала лиганда. Указанные концентрации аналита инъецировали из пробирок, охлажденных до 7 °C. Сбор данных включает 3 минуты 90 μl аналита с последующими 15 минутами дизассоциации. Регенерацию после каждого цикла проводили с применением 30 секунд вброса 15 μl 10 mM глицина pH 2.5. Первые 10 секунд после инъекции аналита и дизассоциации применяли для измерений аффинности с использованием и Langmuir, и Bivalent моделей в модуле кинетического анализа BIAevaluation software (версия 4.1).

Фосфопоточный анализ клеток, активированных микросферами:

Альдегид/сульфат латексные микросферы (5 μm) были ковалентно соединены с 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ анти-Fc μ F(ab')₂ в отдельности или с указанными концентрациями IgG1 человека, HVEM-Fc, или UL144-Fc, как описано ранее (Sperling et al. (1998), J immunol 161:6459). В кратком изложении, микросферы отмывали в PBS, инкубировали с указанными белками при 37°C в течение 90 min, блокировали в буфере (PBS с 1% BSA и 0.1% глицина), дважды отмывали, ресуспендировали в среде, и подсчитывали. Микросферы применяли для стимуляции JTA γ и VJAB клеток в соотношении 3:1. Микросферы добавляли сначала в 96-луночные плоскодонные планшеты с последующим отмыванием клеток в PBS и ресуспендированием до концентрации $1,5 \times 10^6$ клеток/ml. Планшеты быстро открутили и инкубировали в течение указанного времени при 37°C с последующей фиксацией с 2% параформальдегидом в PBS и дополнительной инкубацией при 37°C в течение 10 min. Клетки отмывали в буфере (PBS с 2% FBS) и пермеабелизовали в Perm III Buffer (BD Bioscience) в течение 30 min на льду, дважды отмывали, инкубировали с фосфо-специфическими антителами в течение 30 min на льду, дважды отмывали и анализировали.

Вестерн-блоттинг: IL-2-зависимая NK92 модельная клеточная линия была активирована с использованием указанных концентраций IL-2 или интерферона- β . В экспериментах, тестирующих IL-2 ответы,

NK92 клетки культивировали в течение ночи без IL-2 для восстановления основного сигналинга. В экспериментах с использованием слитых белков и антител, NK92 клетки покрывали контрольным IgG1, HVEM-Fc или UL144-Fc человека или контрольным IgG2a мыши или анти-BTLA в течение, по меньшей мере, 15 минут на льду перед активацией. NK92 клетки разделяли на аликвоты до 2×10^6 клеток на состояние в 100 μ l и активировали при 37°C в течение указанного времени, блокировали с применением ледяного PBS и лизировали в RIPA буфере при 4°C в течение 20 минут с последующим центрифугированием при 14.000 rpm, 4 °C. Экстракты нагревали в SDS загрузочном буфере, содержащем 1% β -меркаптоэтанол в течение 5 минут и разделяли посредством SDS-PAGE на 10% Bis-Tris гелях. Белки переносили с использованием резервуарного способа на PVDF мембрану и блокировали с применением 1% овальбумина в TBS-T буфере, и метили антителами против фосфо-JAK1, фосфо-STAT5, фосфо-STAT1, фосфо-Akt (S473) и общего актина, с последующим окрашиванием анти-HRP кролика или анти-HRP мыши и визуализировали посредством усиленной хемилюминесценции.

Цитокиновая активаци PBMC человека: Свежую кровь человека собирали и получали от здоровых доноров, как описано ранее (Sedy et al., 2013). В кратком изложении, PBMC выделяли из лейкоцитарного слоя в градиенте фиколла, инкубировали в концентрации 10^6 клеток/ml с указанными Fc белками на льду в течение 15 min, с последующим перекрестным связыванием с 5 μ g/ml анти-Fc γ F(ab')₂ человека в течение 6 часов перед анализом методом проточной цитометрии.

ПРИМЕР 2

Соматические TNFRSF14 мутации при связывании таргетного лиганда в лимфоме

Было замечено, что соматические TNFRSF14 мутации, приобретенные FL и DLBCL, обладают потенциалом нарушать консервативные HVEM взаимодействия с его лигандами, и последующее функционирование (фигура 8). Выбирали лимфома-ассоциированные мутации, для которых не было предсказано

нарушение HVEM структуры, и оценивали связывание мутантного рецептора с BTLA, CD160 и LIGHT. HVEM мутанты, которые достоверно экспрессировались на поверхности, могли быть классифицированы на три группы в соответствии с их эффектами на связывание лиганда (фигура 8). Мутации, содержащие P59S, A102P или R109W, нарушали взаимодействия с CD160 в отдельности. Y61C и G72D мутации отменяли взаимодействия и с BTLA, и с CD160, но не оказали большого влияния на связывание LIGHT. В конечном итоге, мутанты G60D и T82P, или вставка Ile между Ser91 и Lys92 нарушали все взаимодействия лигандов (фигура 2). HVEM Tyr61 был идентифицирован как критический для связывания и BTLA, и CD160. Вместе, эти соматические мутации определяют иерархию связывания лиганда с предпочтительной потерей взаимодействий с CD160 и BTLA, и либо незатронутыми, либо также подвергнутыми изменениям взаимодействиями с LIGHT. Генетические изменения в TNFSF14 были дополнительно подтверждены в дополнительной когорте DLBCL, и идентифицированы дополнительные опухоли с делециями в BTLA или TNFSF14 (фигура 2H). Наличие множественных генетических повреждений HVEM сети в FL и DLBCL человека указывает, что эти пути могут вносить значительный вклад в клеточный отбор внутри микроокружения опухоли. Специфические остатки важны для связывания лиганда: Pro⁵⁹, Ala¹⁰², Arg¹⁰⁹ – нет связывания с CD160; Tyr⁶¹ и Gly⁷² нет связывания с BTLA или CD160; Gly⁶⁰, Thr⁸², и ins91I (indicated at Ser⁹¹ и Lys⁹²) – нет связывания с LIGHT, BTLA или CD160 (фигура 2C-H).

ПРИМЕР 3

HVEM и UL144 связывают перекрывающиеся поверхности BTLA

Чтобы определить, была ли измененная BTLA активность вирусного UL144 или мутантного HVEM вызвана вступлением в контакт различных поверхностей, сравнивали BTLA остатки в контактных поверхностях для этих агонистов. Выявлено, что связывание анти-BTLA mAb (клон M1H26), который как ранее было показано, обладает агонистической активностью, было нарушено посредством мутации или в Glu57, или в Pro59, в то время как связывание конкурирующего анти-BTLA mAb (клон J168) было нарушено посредством мутации в Arg42 (фигура 3A и фигура 9A). А

именно, MIN26-связывающий остаток Glu57 является гомологичным Gln63 в BTLA мышах, который содержится внутри эпитопа агонистического анти-BTLA mAb (клон 6A6). Для сравнения, подобные требования наблюдали при связывании и HVEM-Fc, и UL144-Fc с Gln37, Arg42, Pro59 и His127, с учетом предшествующих исследований BTLA человека и мыши. Сходные аффинности для BTLA к HVEM или UL144 подтверждали с использованием поверхностного плазмонного резонанса (фигура 3B, C). Авидность (KD, 1:1 модель связывания) UL144-Fc для BTLA (295 nM) была немного меньше, чем HVEM-Fc (177 nM) (таблица 2). В то время как между HVEM и UL144 наблюдали малозаметную авидность и различия связывания, в общем CMV UL144 человека полностью имитирует HVEM связывание с BTLA. На фигурах 9A-B показаны EL4 клетки, трансдуцированные дикого типа или мутантным BTLA человека, окрашенные с применением поликлональных или моноклональных антител анти-BTLA человека или с применением HVEM-Fc или CMV UL144-Fc человека, с последующим окрашиванием видоспецифическими вторичными антителами. От верха до низа графиков показано специфическое MFI окрашивание 6F4, J168 или MIN26 анти-BTLA (A), или HVEM-Fc или UL144-Fc (B) окрашивание на клетках, включенных в гейт GFP-экспрессии.

Козэкспрессия HVEM и BTLA в лимфоцитах ведет к образованию характерного комплекса в цис-конфигурации, расположенного на клеточной поверхности, который конкурентно блокирует активацию посредством внешних лигандов в транс-конфигурации. Определяли, формировал ли UL144 коэкспрессируемый с BTLA, комплексы в цис-конфигурации для предотвращения доступа к лиганду в транс-положении, или UL144 лигирование BTLA в транс-конфигурации вероятно обходит стерическое препятствие BTLA доступа посредством HVEM. И HVEM, и UL144, коэкспрессируемые с BTLA, блокировали связывание и с HVEM-Fc, и UL144-Fc, указывая что HVEM и UL144 образуют сходные комплексы с BTLA в цис-конфигурации, и что UL144 не может обойти сформированный BTLA цис-комплекс на клеточных поверхностях (фигура 9C, D). Однако, коэкспрессия BTLA R42D мутанта предотвращала связывание цис-экспрессируемого HVEM, но не UL144, с BTLA-Fc в транс-конфигурации, указывая, что единичной мутации может быть

недостаточно для разрыва BTLA-UL144 цис-комплекса (фигура 9E, F).

Эпитопы антитела, распознаваемые mAb J168 и MIN26, перекрываются с поверхностью BTLA, закрытой HVEM молекулами в тетрамерной ассиметричной структуре, и, как было предсказано, блокируют HVEM связывание с BTLA (фигура 3A). В то время как титрование обоих этих анти-BTLA клонов препятствовало связыванию HVEM-Fc и UL144-Fc с BTLA, третий анти-BTLA mAb (клон 6F4) усиливал связывание HVEM-Fc с BTLA, но не влиял на связывание UL144-Fc (фигура 3D, E). Его эпитоп не был идентифицирован с использованием этих BTLA мутантов, и этот клон не демонстрирует какую-либо реактивность в отношении HVEM. Вместе, эти данные указывают, что в то время как та же поверхность BTLA по всей видимости используется для связывания HVEM и UL144, могут быть дополнительные структурные элементы, которые вносят свой вклад в связывание лиганда. Дополнительно, картирование эпитопов BTLA антител указывает, что агонистическая активность связана с Glu57 или Pro59 на BTLA человека (для клона MIN26) и Gln63 на BTLA мыши (для клона 6A6). На фигуре 3, левое изображение, специфические остатки указывают требования к связыванию антитела: Glu45, Glu57, Pro59 необходимы для MIN26 связывания, Arg42 необходим для J168 связывания. На фигуре 3, правое изображение, специфические остатки указывают HVEM/UL144 эпитоп связывания: Gln37, Arg42, Pro59, His127 по всей видимости необходим для HVEM/UL144 связывания, Glu45, Glu57, Phe119, Ser121 по всей видимости не нужны для HVEM/UL144 связывания.

ПРИМЕР 4

CD160 ограничивает BTLA-опосредованное ингибирование посредством конкуренции за HVEM

Экспрессия CD160 и LIGHT в различных субпопуляциях лимфоцитов может влиять на способность вирусного и ракового мутантного HVEM участвовать в BTLA ингибирующем сигналинге. Чтобы оценить, влияло ли воздействие на экспрессию HVEM лигандов на BTLA агонизм, Jurkat Т-клетки, экспрессирующие эктопические изоформы BTLA или CD160, были активированы (фигура 4 и фигура 10A). Контрольные клетки, активированные с применением

иммобилизованных анти-CD3 антител, индуцировали фосфорилирование регулируемой внеклеточными сигналами киназы (ERK) 1/2, zeta-цепь ассоциированной протеинкиназы 70 kD (ZAP70)/Syk, и общего клеточного тирозина, в то время как ERK1/2 фосфорилирование было снижено в клетках, активированных с применением соиммобилизованных анти-CD3 и HVEM или UL144-Fc (~50-70% снижение). Эктопическая BTLA экспрессия усиливала способность HVEM и UL144 ингибировать ERK1/2 фосфорилирование до фоновых уровней, коррелируя со значительно сниженным ZAP70/Syk фосфорилированием (~15-25%) (фигура 4А, В). Фосфорилирование тирозина было повышено после стимуляции с применением HVEM или UL144, отражая активацию BTLA и ассоциированных сигнальных белков (фигура 4С). Важно, в клетках, экспрессирующих эктопический CD160 (гликофосфоинозитидные или трансмембранные изоформы), HVEM был неспособен ингибировать ERK1/2 фосфорилирование до тех пор, пока BTLA был дополнительно представлен. В противоположность этому, UL144 ингибировал ERK1/2 фосфорилирование несмотря на экспрессию CD160 изоформы. Агонистическую активность HVEM и UL144 подтверждали в неходжкинской лимфоме человека, B₂20, которая экспрессирует высокие уровни BTLA человека в отсутствие других HVEM лигандов и активирует Syk-зависимое ERK и Akt фосфорилирование в ответ на IgM стимуляцию (фигура 10В). Конкретно, в клетках, активированных с применением соиммобилизованных анти-IgM и титрованного HVEM или UL144-Fc, приблизительно наблюдали 50% снижения в фосфорилировании ERK, Akt, и клеточных фосфотирозинов по сравнению с контрольными клетками. Совместно, эти результаты иллюстрируют, что способность HVEM активировать BTLA сигналинг зависит от относительного отношения BTLA к CD160, и что селективность рецептора имитатора вируса приводит к стерически незатрудненному BTLA агонизму.

ПРИМЕР 5

Активация BTLA агониста ингибирует провоспалительную цитокиновую стимуляцию

Ранее было показано, что в РВМС, культивированных с цитокинами, или CMV инфицированных фибробластах *in vitro*,

растворимый HVEM-Fc, но не UL144-Fc, уникальным образом костимулировал активацию CD160-экспрессирующих NK-клеток. В параллельных исследованиях, наблюдали, что ингибирование IL-2-индуцированной CD69 экспрессии посредством HVEM и UL144-Fc в различных субпопуляциях PBMC коррелировало с экспрессией BTLA (фигура 11A). Способность клеточного и вирусного HVEM ингибировать IL-2 сигналинг в присутствии CD160 была дополнительно проверена (фигура 5). NK-клеточная линия человека NK92 отвечает на IL-2 в титруемой манере посредством фосфорилирования киназы JAK1, что приводит к активации STAT5, Akt и ERK путей. В клетках, обработанных IL-2, наблюдали снижение фосфорилирования JAK1, STAT5 и Akt белков после активации BTLA с UL144-Fc или анти-BTLA mAb (клон MIN26), но не HVEM-Fc, указывая, что направленное действие BTLA на UL144 являлось стерически незатрудненным посредством присутствия избытка CD160 (фигура 5A, 5B и фигура 11B). Дополнительно было протестировано регулирует ли BTLA сигналинг интерферона типа I, поскольку этот путь также регулируется посредством SHP-1 ингибирования. Анти-BTLA mAb (клон MIN26) снижал величину STAT1 фосфорилирования в раннее и позднее время воздействия, показывая, что в SHP-1 чувствительных цитокиновых путях передачи сигнала, BTLA демонстрирует широкую ингибирующую функцию (фигура 11C). Дополнительно, CD160 ограничивал HVEM, но не его вирусный имитатор, от связывания и активирования BTLA. На фигуре 11 показаны PBMC, предварительно обработанные указанными Fc белками и стимулированные с применением указанных концентраций IL-2 в течение 6 часов перед окрашиванием на CD69 экспрессию внутри клеточных субпопуляций. На графиках показан процент CD69 экспрессии в CD19+ В-клетках, CD4+ и CD8+ Т-клетках, CD3+CD56+ клетках, CD56неярких и CD56ярких NK-клетках. В.-С. NK92 клетки стимулировали с применением титрованного IL-2 (В.) и IFN- β (С.) в указанные промежутки времени после предварительной обработки с применением анти-BTLA (MIN26) или контрольного Ig. Вестерн-блоты показывают цельноклеточные экстракты фосфо-JAK1, STAT5 и Akt (S473) для мониторинга IL-2 сигналинга, или фосфо-STAT1 для

мониторинга IFN- β сигналинга, и актина для контроля общего уровня белка.

ПРИМЕР 6

Биоинженерный HVEM селективным образом активирует BTLA сигналинг

Селективность связывания лиганда UL144 и мутации в лимфоме позволили предположить, что *de novo* конструирование HVEM должно привести к образованию BTLA специфического агониста. Мутантные HVEM-Fc белки были сконструированы посредством аланин-сканирующего, насыщающего и комбинаторного мутагенеза. Выявлено, что HVEM мутеины, содержащие мутации в S58R и L90A (HVEM-RA), придавали селективность BTLA, в то время как дополнительные мутации в G68T и L70W усиливали BTLA аффинность 10-кратно (HVEM-RTWA). Примечательно, что и RA, и RTWA мутанты ингибировали анти-CD3-индуцированный фосфо-ERK1/2 в большей степени, чем родительские HVEM-Fc белки в контрольных клетках, и все HVEM-Fc белки снижали ERK1/2 фосфорилирование до фоновых уровней в клетках эктопически экспрессирующих BTLA (фигура 6A). Только высокоаффинный HVEM-RTWA мутант значительно снижал ZAP-70/Syk фосфорилирование до фоновых уровней во всех клетках (фигура 6B). В клетках, экспрессирующих эктопический BTLA, ингибирующая активность HVEM-RA и HVEM-RTWA мутантов коррелировала с исключительным индуцированием фосфо-SHP2 сигналов, а также общего клеточного фосфотирозина (фигура 6C и фигура 12B). Таким образом, биоинженерные HVEM-Fc воспроизводят селективный и стерически незатрудненный агонизм вирусного и мутантного HVEM.

ПРИМЕР 7

Различные патоген-ассоциированные и *de novo* биоинженерные HVEM мутеиновые BTLA агонисты ингибируют T-клеточную сигнализацию

Было показано, что HVEM мутеиновые BTLA агонисты ингибируют T-клеточную сигнализацию. JTAg клетки трансдуцировали контрольным BTLA, CD160-GPI, CD160-TM, BTLA CD160-GPI и BTLACD160-TM HVEM лигандами посредством электропорации и оставляли в покое на 48 часов перед активацией, или стабильно

трансдуцировали ретровирусами, экспрессирующими указанные HVEM лиганды. Чтобы активировать JTAG клетки альдегид сульфатные микросферы соединяли с анти-CD3 в концентрации 100 $\mu\text{g/ml}$ с или без указанного HVEM или UL144 Fc белков в концентрации 1 μM в PBS в течение 90' при 37°C. Микросферы отмывали дважды и инкубировали с JTAG клетками в соотношении 4:1 микросферы к клеткам в течение 5 минут. Клетки незамедлительно фиксировали с применением 2% параформальдегида, пермеабелизовали 90% метанолом, и окрашивали указанными фосфо-специфическими антителами. Клетки затем проверяли на предмет внутриклеточного окрашивания фосфо-ERK1/2 (T202/Y204) (Фиг. 13А., В.), фосфо-NF- κB p65 (S529) (Фиг. 13С.), фосфо-ВТК/ІТК (Y551/Y511) (Фиг. 13D.), фосфо-PLC γ 1 (Y783) (Фиг. 13Е.), фосфо-ZAP70/Syk (Y319/Y352) (Фиг. 13F.) и фосфотирозина (Фиг. 13G.). На фигуре 13А показаны графики MFI окрашенных клеток. На фигурах 13А.-G. показан процент положительных событий среди окрашенных клеток. (среднее \pm SEM, характеризующее три эксперимента). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$.

ПРИМЕР 8

ВТLА агонисты ингибируют В-клеточную сигнализацию

Было показано, что ВТLА агонисты ингибируют В-клеточную сигнализацию. Чтобы активировать ВJAB клетки альдегид сульфатные микросферы соединяли с анти-IgM при концентрации 100 $\mu\text{g/ml}$ с или без указанного HVEM или UL144 Fc белков при 1 μM в PBS в течение 90' при 37°C. Микросферы отмывали дважды и инкубировали с ВJAB клетками при соотношении 4:1 микросферы к клеткам в течение 10 или 60 минут. Клетки незамедлительно фиксировали с применением 2% параформальдегида, пермеабелизовали с применением 90% метанола и окрашивали указанными фосфо-специфическими антителами. ВJAB клетки затем проверяли на предмет внутриклеточного окрашивания фосфо-ERK1/2 (pT202/pY204), фосфо-Акт (S473) или фосфотирозина (Фиг. 14А-В). На фигурах 14А-В показан процент клеток, положительных по фосфо-ERK1/2 (pT202/pY204), фосфо-Акт (S473) или фосфотирозину.

ВТЛА агонисты ингибируют интерфероновую активацию В-клеток. Чтобы активировать В-клетки человека альдегид сульфатные микросферы соединяли с указанными HVEM или UL144 Fc белками в концентрации 1 μM в PBS в течение 90' при 37°C. Микросферы отмывали дважды и инкубировали с В-клетками человека, очищенными от PBMC крови нормального донора-человека, в соотношении 4:1 микросферы к клеткам, и стимулировали с применением 10 U/ml интерферона- β в течение 6 часов перед лизисом и выделением RNA. На фигуре 15 показана кратность снижения уровней каждого из указанных стимулированных интерфероном генов при обработке клеток с применением каждого из ВТЛА агонистов (HVEM, UL144 Fc, HVEM^{R109W} Fc и HVEM^{RTWA} Fc) по сравнению с контролем. (среднее \pm SEM, обобщенные данные из двух экспериментов). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

Было выявлено, что ВТЛА агонисты ограничивают IL-2 сигналинг в NK-клетках. NK92 клетки культивировали без сыворотки в течение, по меньшей мере, четырех часов, а затем стимулировали с применением 20 U/ml IL-2 человека на 0, 1, 5, 15, 30 и 60 минуте после предварительной обработки с применением указанных Fc и антител при концентрации 2 $\mu\text{g/ml}$ на льду в течение 15 минут (Фиг. 16). После активации клетки лизировали в RIPA буфере, и фосфорилирование белков анализировали посредством вестерн-блоттинга. На фигуре 16А показаны вестерн-блоты цельноклеточных экстрактов фосфо-JAK1, фосфо-STAT5 и актина для контроля общего уровня белка. На фигуре 16В показаны графики, указывающие количественную оценку интенсивности полос, нормализованной к актину.

ПРИМЕР 9

Идентификация селективности лиганда в HVEM мыши

Селективность лигандов определяли в HVEM мыши. Панель HVEM-Fc мутеинов мыши получали посредством транзientной трансфекции в 293Т клетки, включая HVEM дикого типа, и два варианта, содержащие единичные аминокислотные замены, которые, как было предсказано, блокируют связывание с LIGHT (ВТЛА/CD160-sp) или и ВТЛА, и CD160 (LIGHT-sp) на основе гомологии с HVEM человека

(Фиг. 17). HVEM-Fc белки титровали на 293Т клетки, транзиторно трансфицированные или с применением CD160 мыши (Фиг. 17А), или ВТЛА мыши (Фиг. 17В), или LIGHT мыши, и связывание детектировали с использованием анти-Fc человека. Специфическое связывание измеряли с применением анализа методом проточной цитометрии (Фиг. 17С). На графиках показана MFI окрашивания HVEM-Fc белков на клетках, экспрессирующих лиганды.

ПРИМЕР 10

Селективный HVEM-Fc ингибирует воспаление кожи *in vivo*

Было показано, что HVEM-Fc ингибирует воспаление кожи *in vivo*. Мутеины HVEM-Fc мыши инъецировали интраперитонеально животным-моделям воспаления кожи, обработанным имиквимодом. Кожную ткань собирали после трех обработок имиквимодом (состав Алдара) при 50 мг на выбритые спинки каждого животного на каждый день лечения, и разрезали для гистологического анализа. Толщину эпидермиса количественно определяли в срезах кожи, окрашенных Н & Е, в 10 сайтах на протяжении длины каждой ткани. Типовые изображения показали утолщение эпидермиса в различных группах животных, получавших HVEM мутеины (Фиг. 18А). На фигуре 18В показана количественная оценка толщины эпидермиса. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$.

ПРИМЕР 11

Краткое изложение

Данные, представленные здесь, показывают, что экспрессия ВТЛА селективных агонистов вирусами и злокачественными клетками является распространенной стратегией направленного воздействия на HVEM сигнальную сеть. Эволюция и мутации HVEM вирусов, которые предотвращают связывание CD160 по всей видимости обеспечивают селективное преимущество для патогена и злокачественной клетки. Было показано, что активность вирусного HVEM имитатора в CMV является стерически незатрудненной в CD160-экспрессирующих клетках по сравнению с HVEM, напрямую ингибируя активацию ZAP70/Syk и нисходящих ERK1/2 путей после стимуляции рецептора антигена в лимфоцитах. Дополнительно, в CD160-экспрессирующих NK-клетках активация ВТЛА посредством вирусного HVEM имитатора напрямую ограничивает воспалительный цитокиновый

сигналинг. Совместно, эти данные иллюстрируют, как потенциал ограничивать воспалительный сигналинг посредством ингибирующих рецепторов может обеспечить селективное давление на различные внутриклеточные патогены, такие как вирусы и опухоли. Эта база знаний о вирусных и опухолевых мутациях подтолкнуло биоинженерию HVEM достигнуть селективности и высокой аффинности для BTLA, что может оказаться практичным при изменении воспалительных и пролиферативных процессов.

UL144 белок исходно был смоделирован с применением расшифрованной структуры HVEM частично из-за ее гомологии (фигура 1A). Однако, существуют едва заметные различия связывания между UL144 и HVEM с определенными BTLA мутантами, с BTLA, связанным с 6F4 антителом, и с BTLA в цис-конфигурации, указывая на неидентичные взаимодействия (фигура 3, 4). UL144 не мог быть свернут до CD160-связывающего белка посредством индивидуальной точечной мутации, вероятно отражающей множественные изменения специфичности, которые возникли во время эволюции вируса-хозяина. В результате UL144 белок является высокоантигенным несмотря на сохранение BTLA связывания между штаммами. В противоположность этому, каждый опухоль-ассоциированный HVEM содержит только одну мутацию, которая в отдельности не могла отменить все CD160 связывание. Существуют другие примеры TNF рецепторов, взаимодействующие с Ig доменами, например, NGFRp75 с Longo1. Примечательно, что HVEM сам по себе исходно был идентифицирован посредством его взаимодействия с Ig доменом гликопротеина D вируса простого герпеса. CMV экспрессирует другой белок, ORF UL141, который связывает TNF-связанные индуцирующие апоптоз рецепторы лигандов (TRAIL-R). Недавно был расшифрован совместный комплекс этих двух белков, демонстрируя, что UL141 сворачивается как Ig домен, однако, контакт между этими белками происходит на поверхности, где лиганд TRAIL вступает в контакт с TRAIL-R, в отличие от HVEM взаимодействия с BTLA или CD160. HVEM может быть уникальным при принятии нескольких белковых видов лигандов, и комплексы между N-концевым богатым цистеином доменом 1 (CRD1) TNFR белков и Ig доменами по всей видимости не являются предпочтительным типом

белок-белкового взаимодействия среди эукариот. Интересно отметить более частое применение этих нестандартных взаимодействий различными вирусами, что приводит к соблазну предположить, что модулирование иммунных рецепторов может усилить выживаемость патогена.

Выявлено, что BTLA ингибировал IL-2 и тип I интерфероновый сигналинг в NK-клетках человека и что подтверждена роль BTLA в качестве ингибитора иммунных контрольных точек, регулирующего сигналинг T и B-клеточных рецепторов. Механизм ингибирующего сигналинг нисходящего пути BTLA, как предполагают, включает активацию SHP-1 или 2, и вероятно вовлекает дополнительные пути. Ингибирующее действие биоинженерных HVEM-RTWA на ZAP70/Syk фосфорилирование соответствует предшествующим исследованиям, демонстрируя, что CD3 ζ и Syk являются непосредственными мишенями BTLA активности в T- и B-клетках. JAK/STAT сигналинг регулируется частично посредством активации SHP-1 и дефосфорилирования белков-мишеней, включая JAK киназы и STAT белки. BTLA агонисты могут напрямую направленно воздействовать на цитокиновый сигналинг посредством вовлечения SHP-1 или посредством сцепления с неизвестными ингибирующими путями.

В отличие от селективных вирусных и мутантных BTLA агонистов, HVEM взаимодействует с BTLA, LIGHT и CD160 в активированных T-клетках, в то время как в NK-клетках обильная экспрессия CD160 блокирует HVEM, потенциально активируя провоспалительный сигналинг. В контексте лимфомы мутированный TNFRSF14 часто образует пару с нефункциональным аллелем, что приводит к ухудшению прогноза. Описанные выше эксперименты предсказывают, что HVEM мутация помимо CD160 связывания предотвращает активацию цитолитических клеток, в то время как сохранение связывания BTLA активирует ингибирующий сигналинг в соседних клетках. Идентификация DLBCL делеций в LIGHT и BTLA, оба из которых могут активировать HVEM сигналинг в транс-конфигурации, дополнительно поддерживает гипотезу, что главным селективным фактором является активация опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов. Дополнительно, опухоли сами по себе могут отвечать

на LIGHT и VTLA, чтобы активировать нисходящий путь сигналов выживания HVEM. Примечательно, что фолликулярные T-хелперные клетки заметно экспрессируют VTLA и LIGHT, и могут вносить вклад в поддержание функциональности HVEM в лимфоме. Продолжение исследований обосновано для определения того, как HVEM вносит вклад в приспособляемость лимфомы к микроокружению опухоли посредством выбора лиганда. Экспрессия VTLA, LIGHT, и CD160 значительно варьирует между различными типами клеток, активации и состояниях дифференцировки. Таким образом, динамическая регуляция HVEM лигандов обеспечивает механизм контроля активирующих и ингибирующих сигналов в зависимости от клеточного контекста. Определение факторов, регулирующих экспрессию рецептора и лиганда, позволит лучше понять роль этих белков в иммунных ответах, и как можно управлять этими путями с целью терапевтического вмешательства. Разработка таргетных агонистов для VTLA или других ингибирующих рецепторов может служить для увеличения репертуара препаратов для лечения воспалительного заболевания.

Хотя изобретение было описано со ссылкой на вышеописанные примеры, следует понимать, что в дух и объем изобретения заключены модификации и вариации. Таким образом, изобретение ограничено только посредством формулы изобретения.

Таблица 1. Праймеры, применяемые для клонирования и сайт-направленного мутагенеза

Ген	Праймер	Последовательность
	CMV UL144 человека	
E27A мутант	Fiala UL144 E46 For	AAACCCGAAGCAGTGCAATTAGGAAATCAGTG
E27A мутант	Fiala UL144 E46 Rev	TAATTGCACTGCTTCGGGTTTGCATATTTTCAG
V28Y мутант	UL144_V28YTop	ACCCGAAGAATATCAATTAGGAAATCAGTGTTGT C
V28Y мутант	UL144_V28YBot	TTCCSTAATTGATATTCTTCGGGTTTGCATATTTTC
Q29P мутант	UL144_Q29PTop	GAAGAAGTGCCATTAGGAAATCAGTGTTGTCCC
Q29P мутант	UL144_Q29PBot	ATTTCCSTAATGGCACTTCTTCGGGTTTGCATATTT TC
N32S мутант	UL144_N32STop	GCAATTAGGAAGTCAGTGTTGTCCCCCATGTAAA C
N32S мутант	UL144_N32SBot	ACAACACTGACTTCCSTAATTGCACTTCTTCGG

Q33A мутант	Fiala UL144 Q52 For	TTAGGAAATGCGTGTGTCCCCCATGTAAACAAG
Q33A мутант	Fiala UL144 Q52 Rev	GGGACAACACGCATTTCTAATTGCACTTCTTC
P36A мутант	Fiala UL144 P55 For	CAGTGTGTGCCCCCATGTAAACAAGGATATCGTG
P36A мутант	Fiala UL144 P55 Rev	TTTACATGGGGCACAACACTGATTTCTAATTG
P37K мутант	UL144_P37KTop	GTGTTGTCCCAAATGTAAACAAGGATATCGTGTT AC
P37K мутант	UL144_P37KBot	TTGTTTACATTTGGGACAACACTGATTTCTAAT TG
K39S мутант	K39STop	TCCCCCATGTTCAACAAGGATATCGTGTTACAGG
K39S мутант	K39SBot	ATATCCTTGTGAACATGGGGGACAACACTGATTT C
G41A мутант	Fiala UL144 G60 For	TGTAAACAAGCATATCGTGTTACAGGACAATGTA C
G41A мутант	Fiala UL144 G60 Rev	AACACGATATGCTTGTTTACATGGGGGACAACAC TG
Y42A мутант	UL144F-Y42A-F	CCCCCATGTAAACAAGGAGCTCGTGTTACAGGAC AATG
Y42A мутант	UL144F-Y42A-R	CATTGTCCTGTAACACGAGCTCCTTGTTTACATG GGGG
R43A мутант	Fiala UL144 R62A For	CAAGGATATGCTGTTACAGGACAATGTACGCAAT ATAC
R43A мутант	Fiala UL144 R62A Rev	TCCTGTAACAGCATATCCTTGTTTACATGGGGG
T45A мутант	Fiala UL144 T64 For	TATCGTGTTGCAGGACAATGTACGCAATATACG
T45A мутант	Fiala UL144 T64 Rev	ACATTGTCCTGCAACACGATATCCTTGTTTACAT GG
G46A мутант	Fiala UL144 G65 For	CGTGTTACAGCACAATGTACGCAATATACGAGTA C
G46A мутант	Fiala UL144 G65 Rev	CGTACATTGTGCTGTAACACGATATCCTTGTTTA C
G46K мутант	FUL144-G46K 5'	AAACAAGGATATCGTGTTACAAAACAATGTACGC AATATACGAGT
G46K мутант	FUL144-G46K 3'	ACTCGTATATTGCGTACATTGTTTTGTAACACGA TATCCTTGTTT
Q47A мутант	UL144_Q47ATop	GTTACAGGAGCATGTACGCAATATACGAGTACAA C
Q47A мутант	UL144_Q47ABot	TGCGTACATGCTCCTGTAACACGATATCCTTG
T49G мутант	UL144_T49GTop	GGACAATGTGGGCAATATACGAGTACAACATGTA C
T49G мутант	UL144_T49GBot	CGTATATTGCCACATTGTCCTGTAACACGATAT C
Q50A мутант	Fiala UL144 Q69 For	CAATGTACGGCATATACGAGTACAACATGTACAG

Q50A мутант	Fiala UL144 Q69 Rev	ACTCGTATATGCCGTACATTGTCCTGTAACACGA TATC
T52A мутант	Fiala UL144 T71 For	ACGCAATATGCGAGTACAACATGTACACTTTGCC C
T52A мутант	Fiala UL144 T71 Rev	TGTTGTA CTG CATATTGCGTACATTGTTCTGTA AC
N61A мутант	UL144_N61ATop	CTTTGCCCTGCCGGTACGTATGTATCAGGGC
N61A мутант	UL144_N61ABot	CGTACCGGCAGGGCAAAGTGTACATGTTGTAC
L68A мутант	Fiala UL144 L86 For	GTATCAGGGGCTTACAATTGTACCAATTGCACTG
L68A мутант	Fiala UL144 L86 Rev	ACAATTGTAAGCCCCTGATACATACGTACCGTTA G
E76M мутант	UL144_E76MTop	CAATTGCACTATGTGTAATGCACTGAGGTTAC
E76M мутант	UL144_E76MBot	CAATTGCACTATGTGTAATGCACTGAGGTTAC
P106A мутант	Fiala UL144 P124 For	TTTTCCGTTGCAGGCGTCCAACATCACAAGCAAC G
P106A мутант	Fiala UL144 P124 Rev	TTGGACGCCTGCAACGGAAAATGACGTATAATTC
	HVEM человека	
P59S мутант	hHVEM_P59STop	CAAGTGCAGTTCAGGTTATCGTGTGAAGGAG
P59S мутант	hHVEM_P59SBot	CGATAACCTGAACTGCACTTGGGGCAGCAC
G60D мутант	HuHVEMG60Dfor	tgcagtcagattatcgtgtgaaggaggcctg
G60D мутант	HuHVEMG60Drev	ACACGATAATCTGGACTGCACTTGGGGC
Y61C мутант	HuHVEMY61Cfor	GTCCAGGTTGTCTGTGTGAAGGAGGCCTGC
Y61C мутант	HuHVEMY61Crev	CTTCACACGACAACCTGGACTGCACTTGGG
G72D мутант	hHVEM_G72DTop	GCTGACGGACACAGTGTGTGAACCCTGC
G72D мутант	hHVEM_G72DBot	ACACACTGTGTCCGTGAGCTCCCCGCAG
T82P мутант	hHVEM_T82PTop	TCCAGGCCCTACATTGCCACCTCAATG
T82P мутант	hHVEM_T82PBot	AATGTAGGGGCCTGGAGGGCAGGGTTC
Ins91I мутант	hHVEM_ins91ITop	CTCAATGGCCTAATAAGCAAGTGTCTGCAGTGC
Ins91I мутант	hHVEM_ins91IBot	CACTTGCTTATTAGGCCATTGAGGTGGGCAATG
A102P мутант	hHVEM_A102PTop	GTGACCCACCCATGGGCCTGCGCGCG
A102P мутант	hHVEM_A102PBot	GGCCCATGGGTGGGTACACATTTGGCACTG
R109W мутант	HuHVEMR109Wfor	CGCGAGCTGGAAGTCTCCAGGACAGAG
R109W мутант	HuHVEMR109Wrev	GAGCAGTTCCAGCTCGCGCGCAGGCCC
	BTLA человека	
Q37A мутант	HuBTLAQ37Atop	catgtgatgtAGCGCTTATATAAAGAGACAATC TGAACACTC
Q37A мутант	HuBTLAQ37Abot	CTTTATATAAAGCGCTACATCACATGATTCTTTCC CCATG

L38H мутант	HuBTLAL38Htop	ATGTGATGTACAGCATTATATAAAGAGACAATCT GAACACTCC
L38H мутант	HuBTLAL38Hbot	TTGTCTCTTTATATAATGCTGTACATCACATGAT TCTTTCC
R42D мутант	HuBTLAR42Dtop	CTTTATATAAAGGACCAATCTGAACACTCCATCT TAGC
R42D мутант	HuBTLAR42Dbot	GTGTTTCAGATTGGTCCTTTATATAAAGCTGTACA TCACATGATTC
E45A мутант	HuBTLAE45Atop	AGAGACAATCTGCACACTCCATCTTAGCAGGAGA TCC
E45A мутант	HuBTLAE45Abot	AAGATGGAGTGTGGAGATTGTCTCTTTATATAAA GCTGTAC
E57A мутант	HuBTLAE57Atop	CTTTGAACTAGCATGCCCTGTGAAATACTGTGCT AAC
E57A мутант	HuBTLAE57Abot	TCACAGGGCATGCTAGTTCAAAGGGATCTCCTGC TAAG
P59A мутант	HuBTLAP59Atop	GAACTAGAATGCGCTGTGAAATACTGTGCTAACA GGC
P59A мутант	HuBTLAP59Abot	GTATTTACAGCGCATTCTAGTTCAAAGGGATCT C
K90A мутант	HuBTLAK90Atop	ACAAGTTGGGCGGAAGAGAAGAACATTTCATTTT TCATTC
K90A мутант	HuBTLAK90Abot	CTTCTCTCCGCCCAACTTGTTTGTCTATCTTCA AGTTTTAC
V117A мутант	HuBTLAV117Atop	TGTTCTGCAAATTTTCAGTCTAATCTCATTGAAA GC
V117A мутант	HuBTLAV117Abot	GATTAGACTGAAAATTTGCAGAACAGCGGTATGA CCC
N118F мутант	HuBTLAN118Ftop	GCTGTTCTGCATTTTTTCAGTCTAATCTCATTGA AAGC
N118F мутант	HuBTLAN118Fbot	TAGACTGAAAAATGCAGAACAGCGGTATGAC
F119A мутант	HuBTLAF119Atop	GTTCTGCAAATGCTCAGTCTAATCTCATTGAAAG CCAC
F119A мутант	HuBTLAF119Abot	GAGATTAGACTGAGCATTTGCAGAACAGCGGTAT G
S121H мутант	HuBTLAS121Htop	CAAATTTTCAGCATAATCTCATTGAAAGCCACTC AAC
S121H мутант	HuBTLAS121Hbot	CAATGAGATTATGCTGAAAATTTGCAGAACAGCG
H127D мутант	HuBTLAH127Dtop	CATTGAAAGCGACTCAACAACCTTTTATGTGACA GATG
H127D мутант	HuBTLAH127Dbot	GTTGTTGAGTCGCTTTCAATGAGATTAGACTGAA AATTTG

S128H мутант	HuBTLAS128Htop	TGAAAGCCACCATACAACCTCTTTATGTGACAGAT GTAAAAAG
S128H мутант	HuBTLAS128Hbot	AAGAGTTGTATGGTGGCTTTCAATGAGATTAGAC TG

Таблица S2. Моновалентная и бивалентная кинетические константы скорости для связывания Fc слитого белка

	Аналит	
	HVEM-Fc	HuCMV UL144-Fc
Моновалентный анализ		
k_a ($\times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	3,74	1,61
k_d ($\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$)	6,6	4,76
K_D (nM)	177	295
Бивалентный анализ		
k_{a1} ($\times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	1,53	0,781
k_{d1} ($\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$)	9,02	5,1
k_{a2} ($\times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	57,3	0,0139
k_{d2} (s^{-1})	2,05	0,00289

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый белок, содержащий белок-медиатор проникновения вируса герпеса (HVEM) и Fc белок, где HVEM белок содержит аминокислотные остатки 1-161, 39-161, 1-184, 39-184, 1-202 или 39-202 SEQ ID NO: 2, и где аминокислотные остатки 1-161, 39-161, 1-184, 39-184, 1-202 или 39-202 SEQ ID NO: 2 содержат мутации, содержащие S58R и L90A, где слитый белок является агонистом аттенюатора В- и Т-лимфоцитов (BTLA).

2. Слитый белок, содержащий белок-медиатор проникновения вируса герпеса (HVEM) и Fc белок, где HVEM белок содержит аминокислотные остатки 1-161, 39-161, 1-184, 39-184, 1-202 или 39-202 SEQ ID NO: 2, и где аминокислотные остатки 1-161, 39-161, 1-184, 39-184, 1-202 или 39-202 SEQ ID NO: 2 содержат мутации, содержащие S58R, G68T, L70W и L90A, где слитый белок является агонистом аттенюатора В- и Т-лимфоцитов (BTLA).

3. Слитый белок по п. 1 или 2, где HVEM белок содержит аминокислотные остатки 1-161 SEQ ID NO: 2.

4. Слитый белок по п. 1 или 2, где HVEM белок содержит аминокислотные остатки 39-161 SEQ ID NO: 2.

5. Слитый белок по п. 1 или 2, где HVEM белок содержит аминокислотные остатки 1-184 SEQ ID NO: 2.

6. Слитый белок по п.1 или 2, где HVEM белок содержит аминокислотные остатки 1-202 SEQ ID NO: 2.

7. Слитый белок по п. 1 или 2, где HVEM белок содержит аминокислотные остатки 39-202 SEQ ID NO: 2.

8. Слитый белок по любому из пп.1, 2, 4 или 7, где HVEM белок дополнительно содержит сигнальную последовательность HVEM.

9. Слитый белок по любому из пп.1-8, где HVEM белок слит с белком Fc через последовательность пептидного линкера.

10. Слитый белок по любому из пп.1-9, где Fc белок выбран из группы, состоящей из IgA, IgG, IgD, IgE и IgM.

11. Слитый белок по п.10, где Fc белок представляет собой белок IgG, выбранный из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

12. Слитый белок по п.11, где Fc белок IgG является человеческим.

13. Слитый белок по п.12, где Fc белок представляет собой белок IgG1 человека, содержащий два одинаковых белковых фрагмента, полученных из второго константного домена и третьего константного домена двух тяжелых цепей антитела IgG1 человека.

14. Белок-медиатор проникновения вируса герпеса (HVEM), содержащий аминокислотные остатки 1-161, 39-161, 1-184, 39-184, 1-202 или 39-202 SEQ ID NO: 2, и где аминокислотные остатки 1-161, 39-161, 1-184, 39-184, 1-202 или 39-202 SEQ ID NO: 2 содержат мутации, включающие S58R и L90A, и где HVEM белок является агонистом BTLA.

15. Белок-медиатор проникновения вируса герпеса (HVEM), содержащий аминокислотные остатки 1-161, 39-161, 1-184, 39-184, 1-202 или 39-202 SEQ ID NO: 2, и где аминокислотные остатки 1-161, 39-161, 1-184, 39-184, 1-202 или 39-202 SEQ ID NO: 2 содержат мутации, включающие S58R, G68T, L70W и L90A, и где HVEM белок является агонистом BTLA.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая слитый белок по любому из пп.1-13 или HVEM белок по п.14 или 15 и фармацевтически приемлемый носитель.

17. Применение слитого белка по любому из пп.1-13 или HVEM белка по п.14 или 15 в производстве лекарственного средства для применения в способе лечения связанного с BTLA расстройства у пациента.

18. Применение по п.17, где связанным с BTLA расстройством является рак или аутоиммунное заболевание или расстройство.

19. Применение по п.17, где расстройство, связанное с BTLA, представляет собой аутоиммунное заболевание или расстройство, выбранные из группы, состоящей из: болезни Аддисона, бокового амиотрофического склероза, болезни Крона, синдрома Кушинга, сахарного диабета 1 типа, реакции «трансплантат против хозяина», болезни Грейвса, болезнь Гийена-Барре, красной волчанки, рассеянного склероза, псориаза, псориатического артрита, ревматоидного артрита, саркоидоза, склеродермии, системной красной волчанки, отторжения трансплантата и васкулита.

20. Применение по п.19, где аутоиммунное заболевание или нарушение представляют собой реакцию «трансплантат против хозяина».

21. Применение по п.17, где связанное с ВТЛА расстройство, представляет собой рак, выбранный из группы, состоящей из рака простаты, толстой кишки, органов брюшной полости, кости, молочной железы, пищеварительной системы, печени, поджелудочной железы, брюшины, эндокринных желез (надпочечников, паращитовидных желез, гипофиза, семенников, яичники, тимуса, щитовидная железа), глаза, головы и шеи, нервной системы (центральной и периферической), лимфатической системы, таза, кожи, мягких тканей, селезенки, органов грудной клетки и мочеполовых путей.

22. Применение по п.21, где рак представляет собой рак лимфатической системы.

23. Применение по любому из пп.17-22, дополнительно включающее введение модулятора иммунного ответа или химиотерапевтического средства.

24. Способ модуляции иммунного ответа у субъекта, включающий введение слитого белка по любому из пп. 1-13 или HVEM белка по п. 14 или 15 нуждающемуся в этом субъекту.

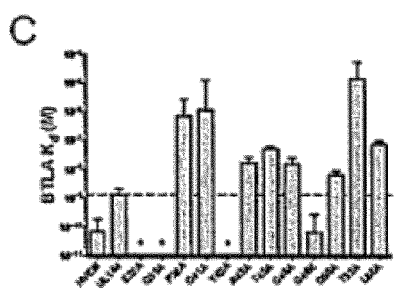
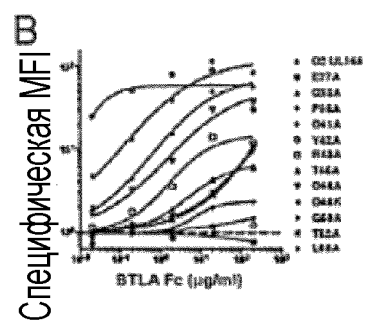
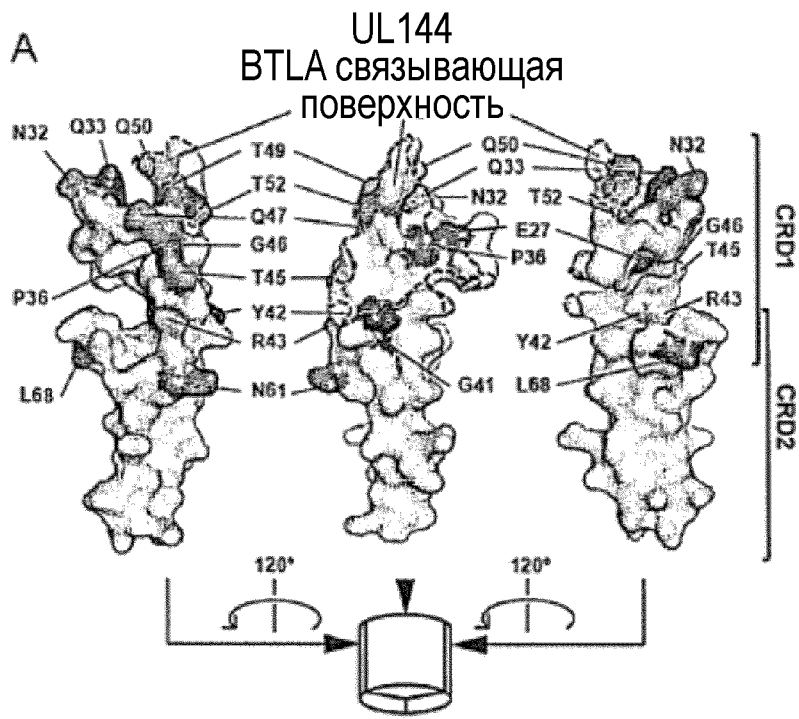
25. Способ по п.24, где фосфорилирование ERK1/2 является сниженным по сравнению с уровнями до введения слитого белка или HVEM белка.

26. Способ по п.24, где фосфорилирование ZAP70/Syk является сниженным по сравнению с уровнями до введения слитого белка или HVEM белка.

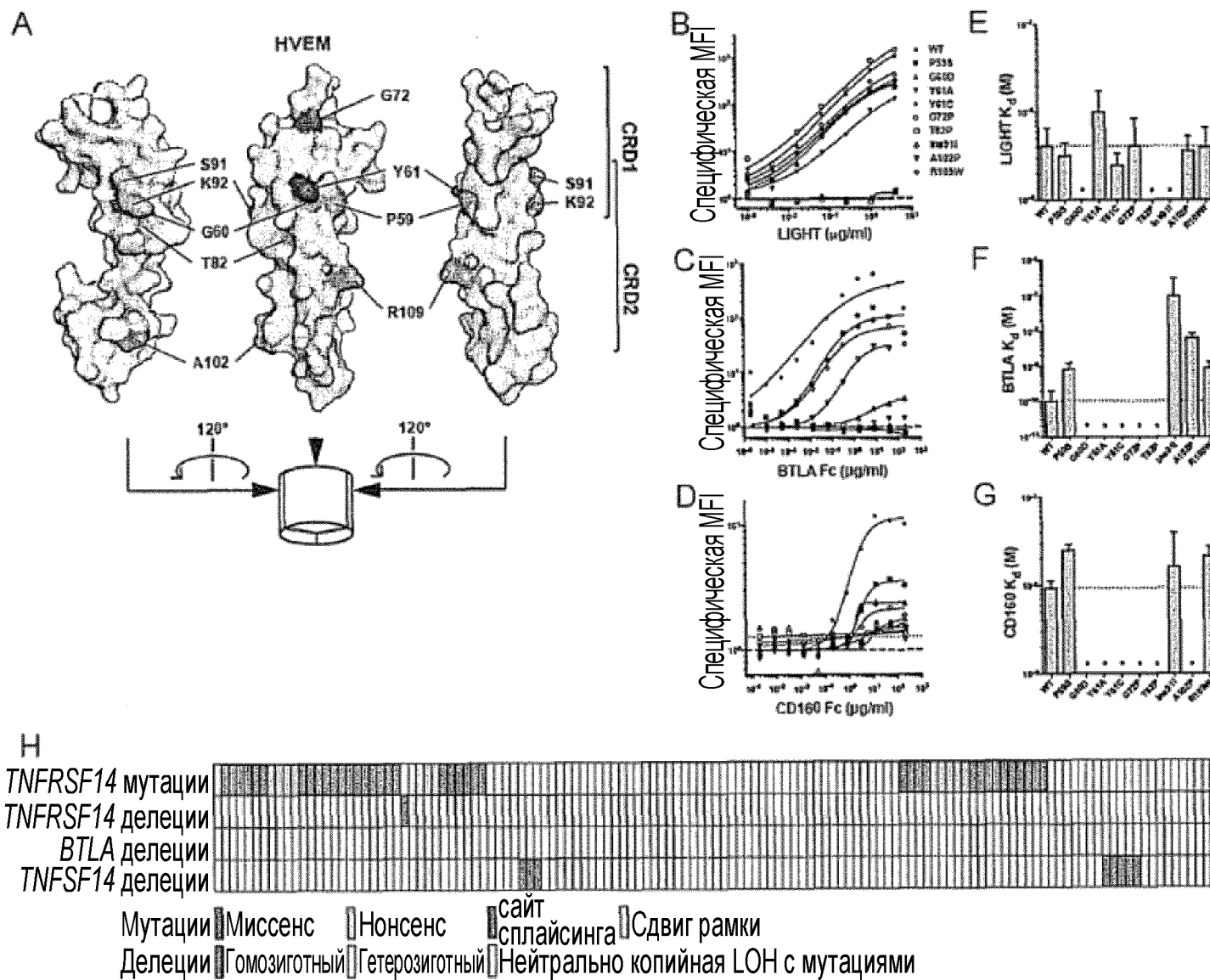
27. Способ по п.24, где общее клеточное фосфорилирование и фосфорилирование SHP2 является индуцированным по сравнению с уровнями до введения слитого белка или HVEM белка.

28. Способ повышения ВТЛА сигналинга клетке *in vitro*, включающий приведение экспрессирующей ВТЛА клетки в контакт со слитым белком по любому из пп. 1-13 или HVEM белком по п. 14 или 15.

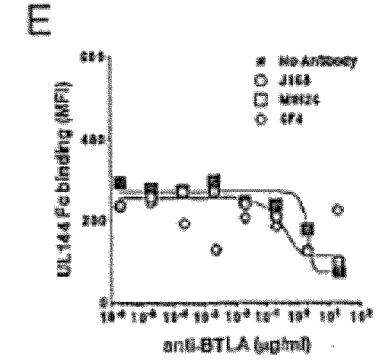
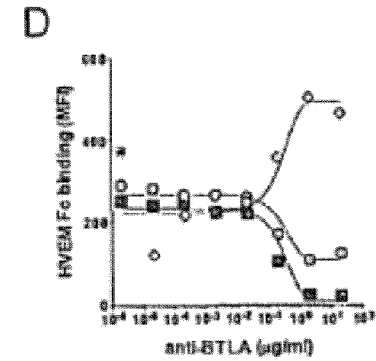
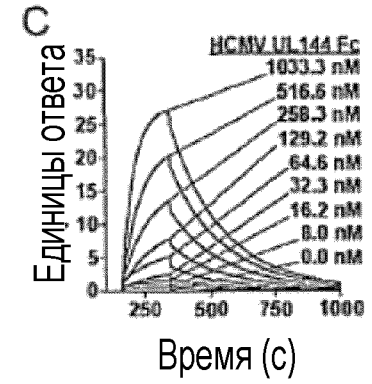
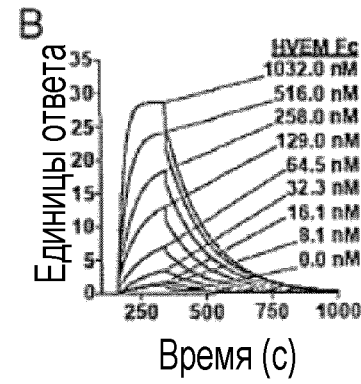
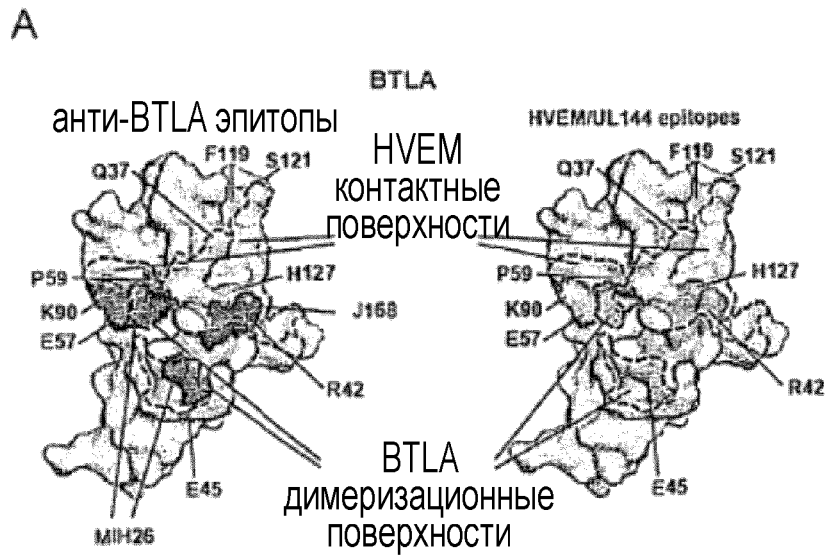
По доверенности



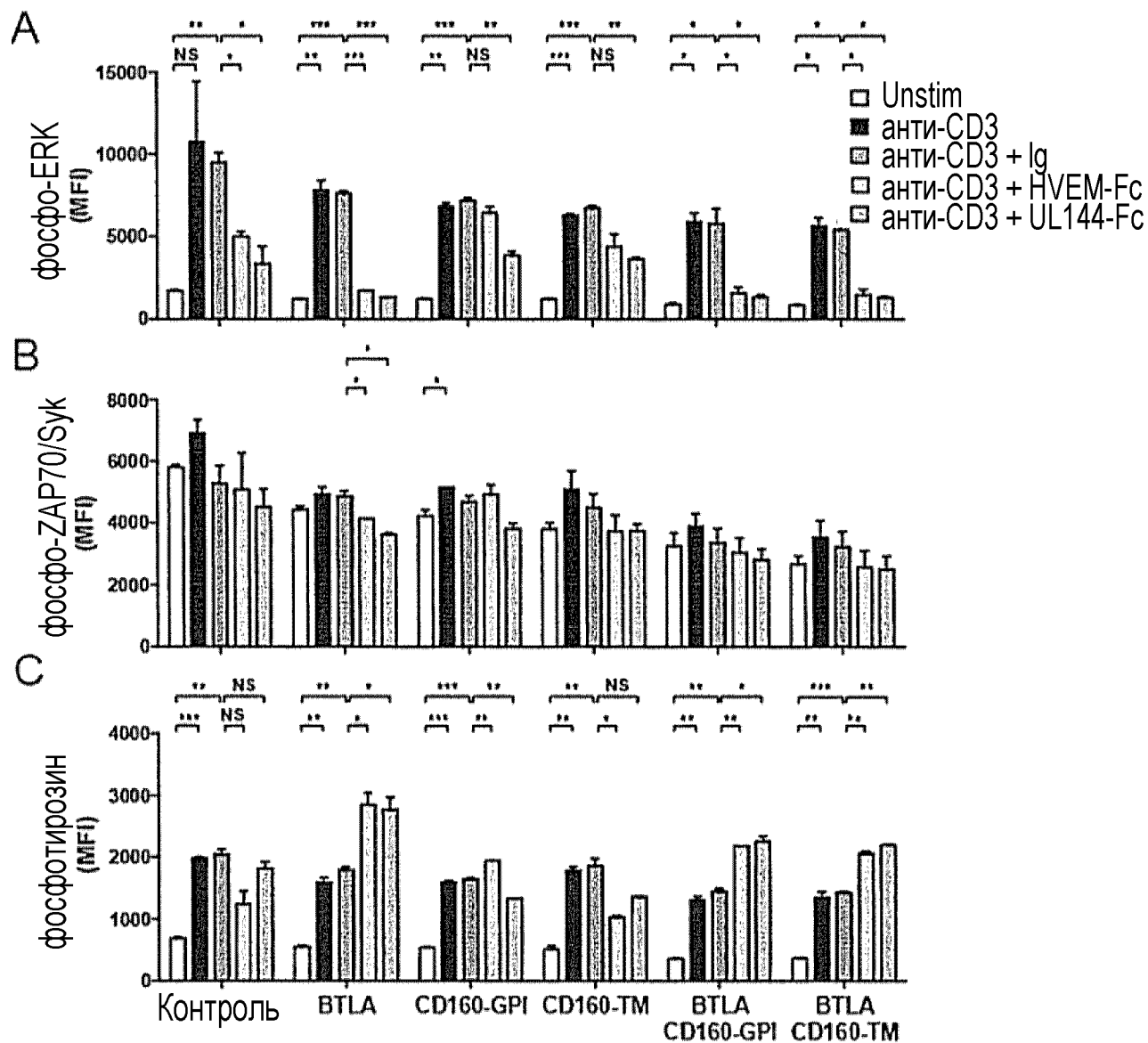
ФИГ. 1А-1С



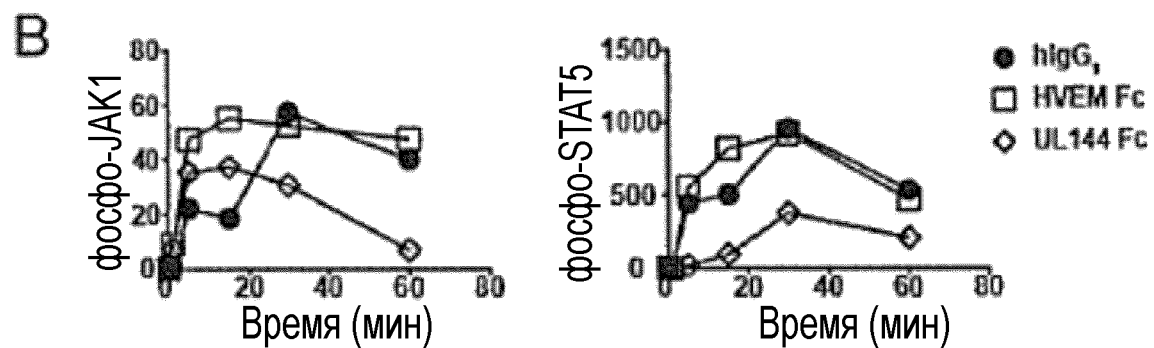
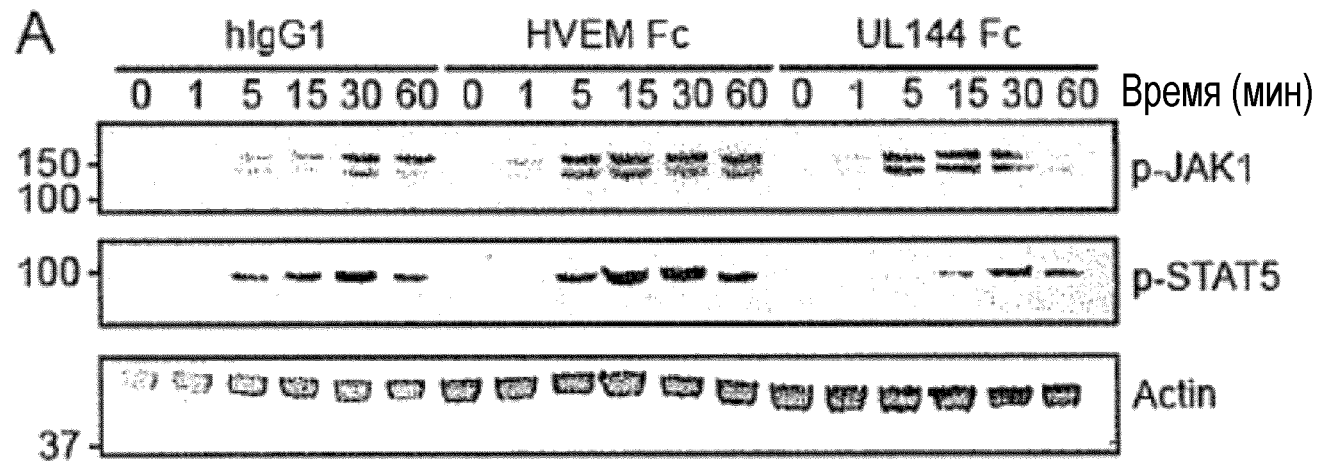
ФИГ. 2А-2Н



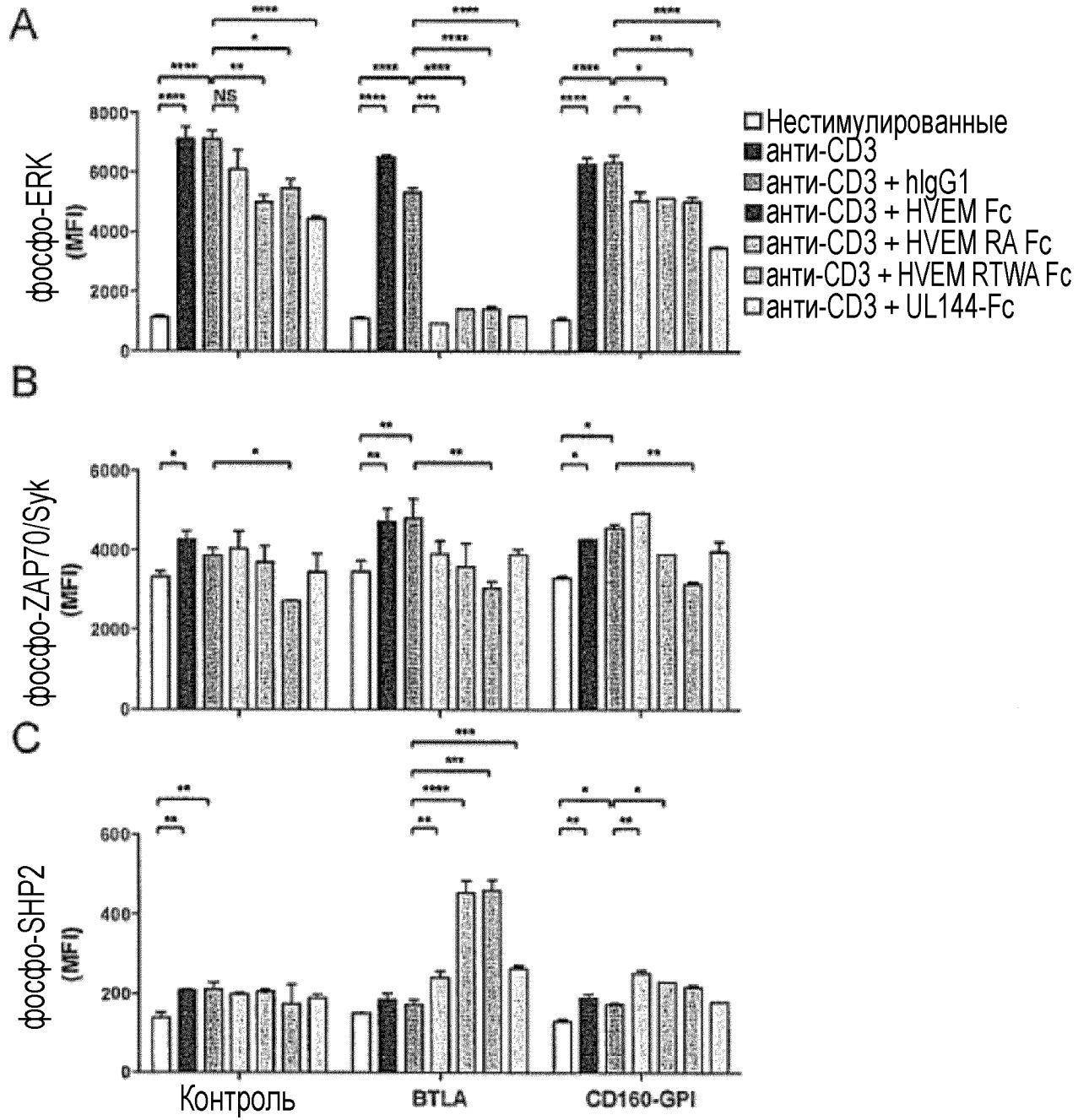
ФИГ. 3А-3Е



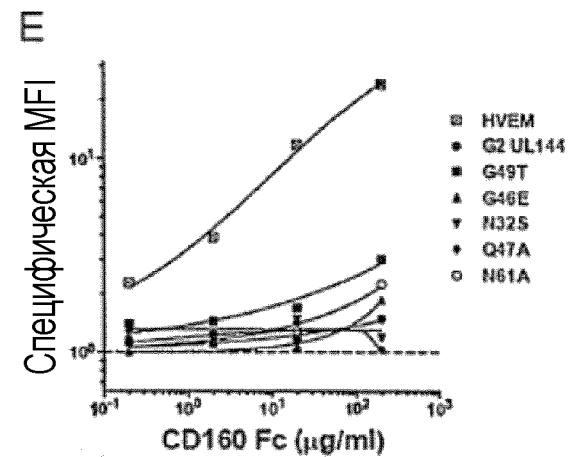
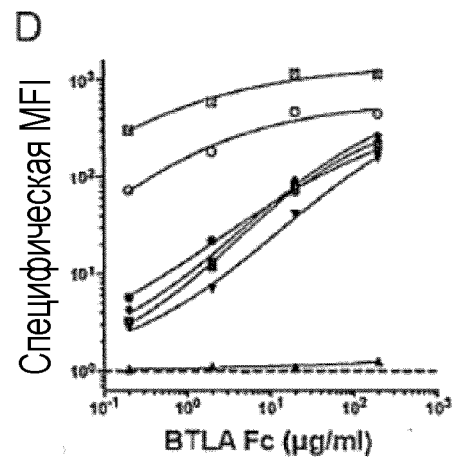
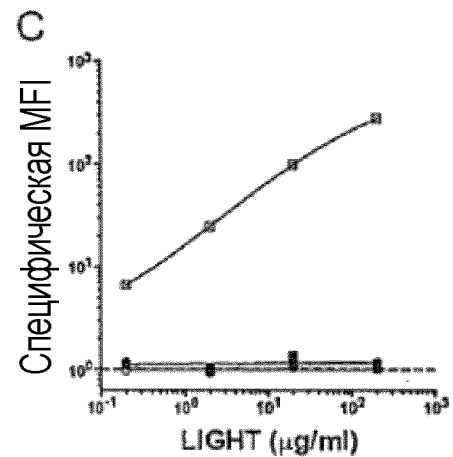
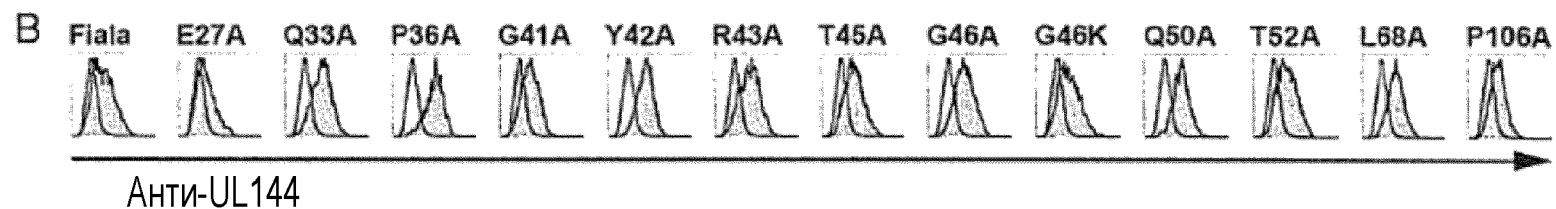
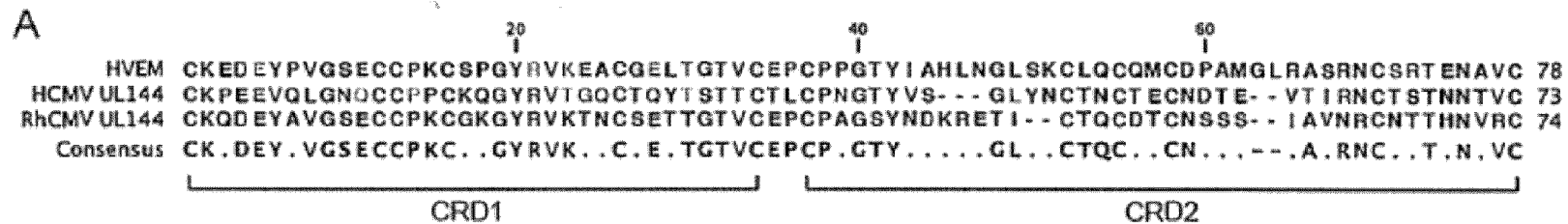
ФИГ. 4А-4С



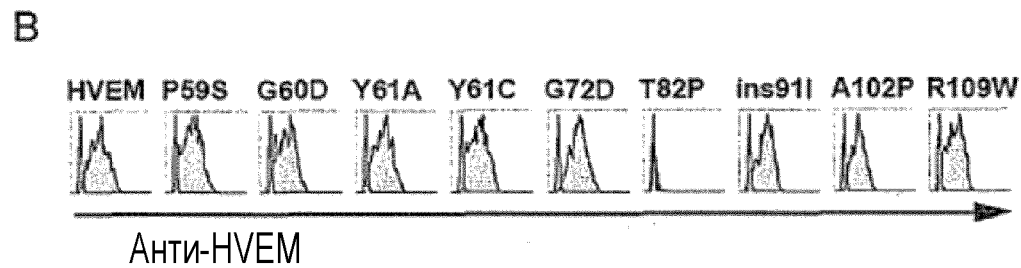
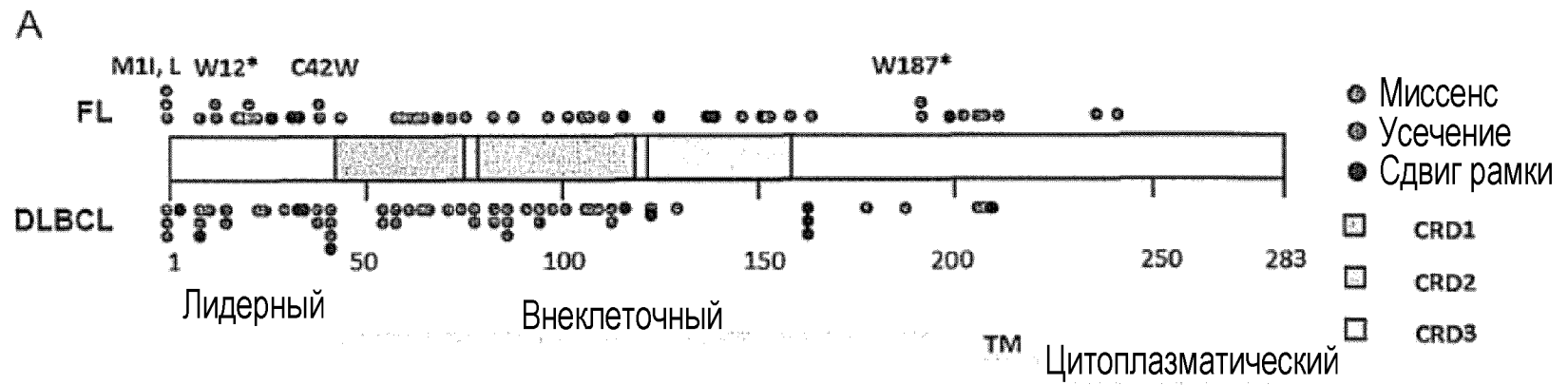
ФИГ. 5А-5В



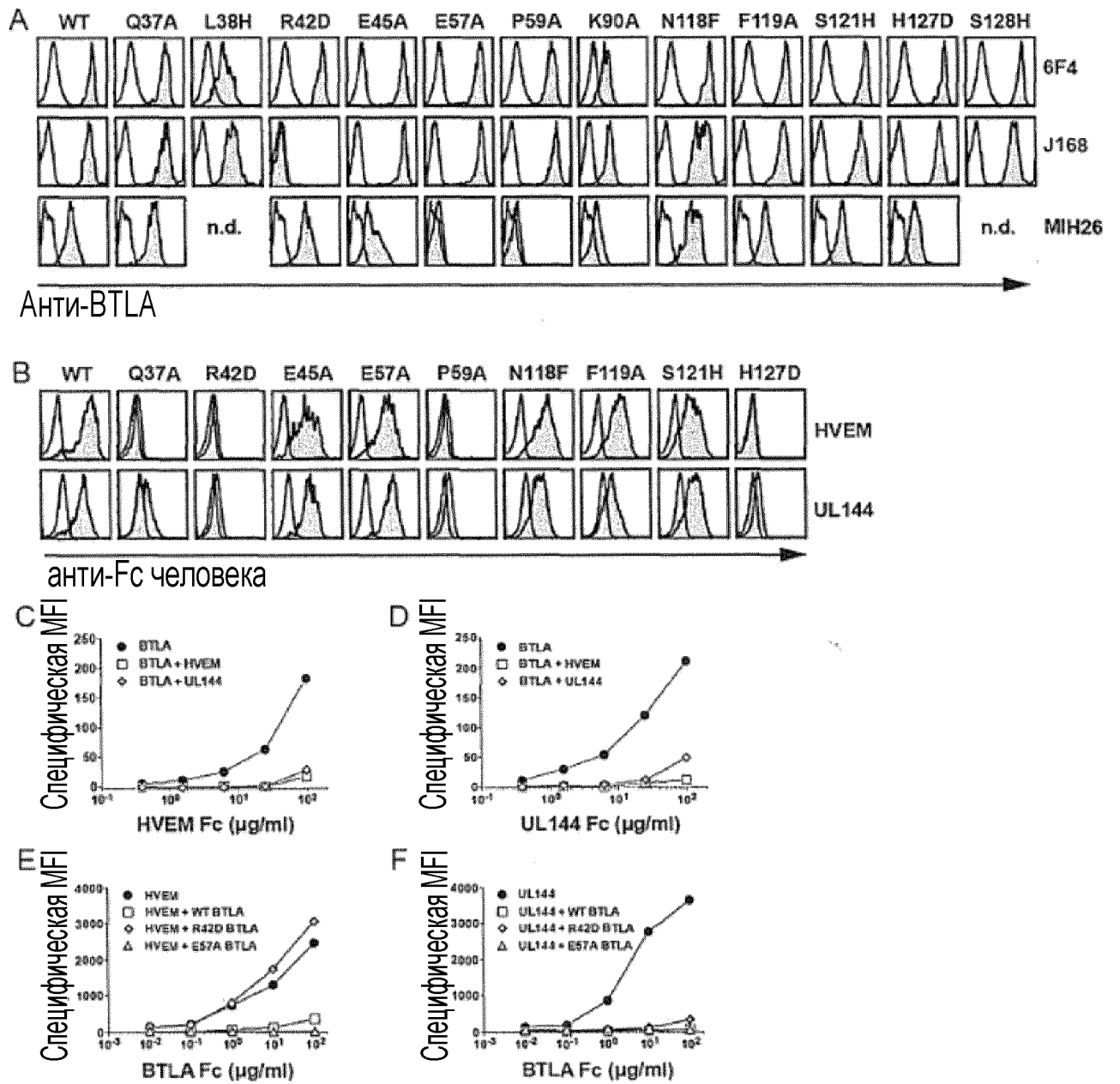
ФИГ. 6А-6С



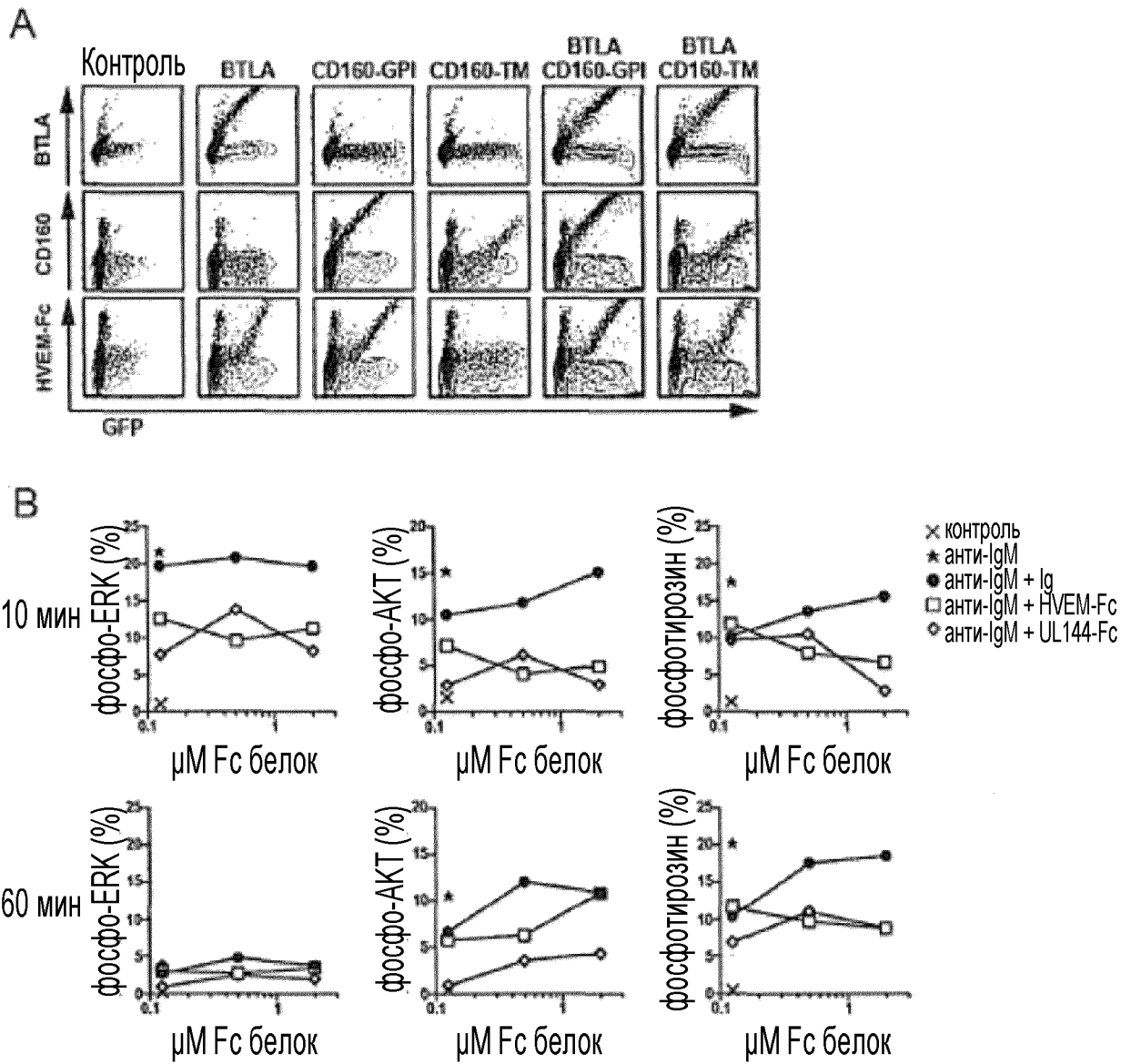
ФИГ. 7А-7Е



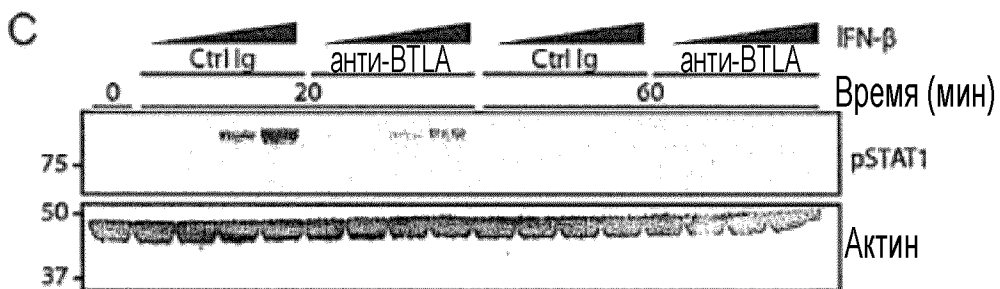
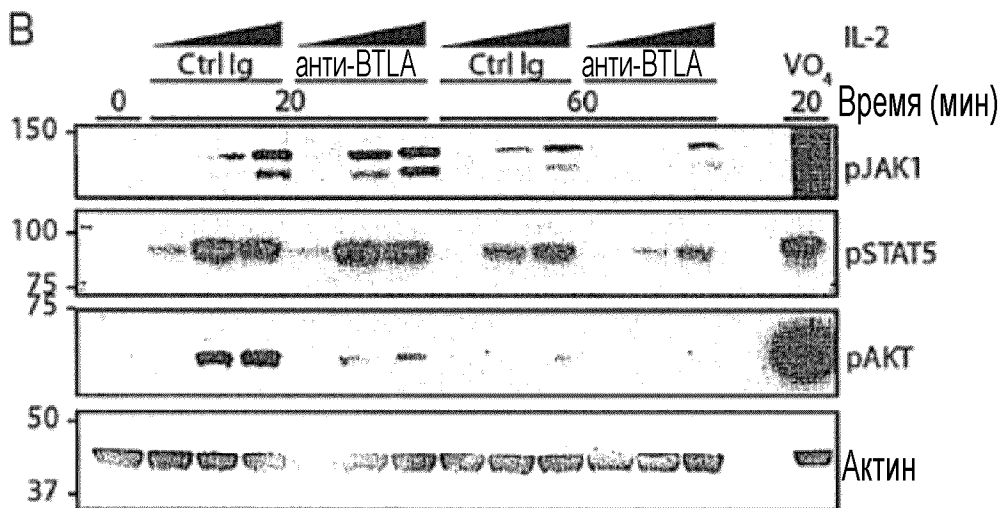
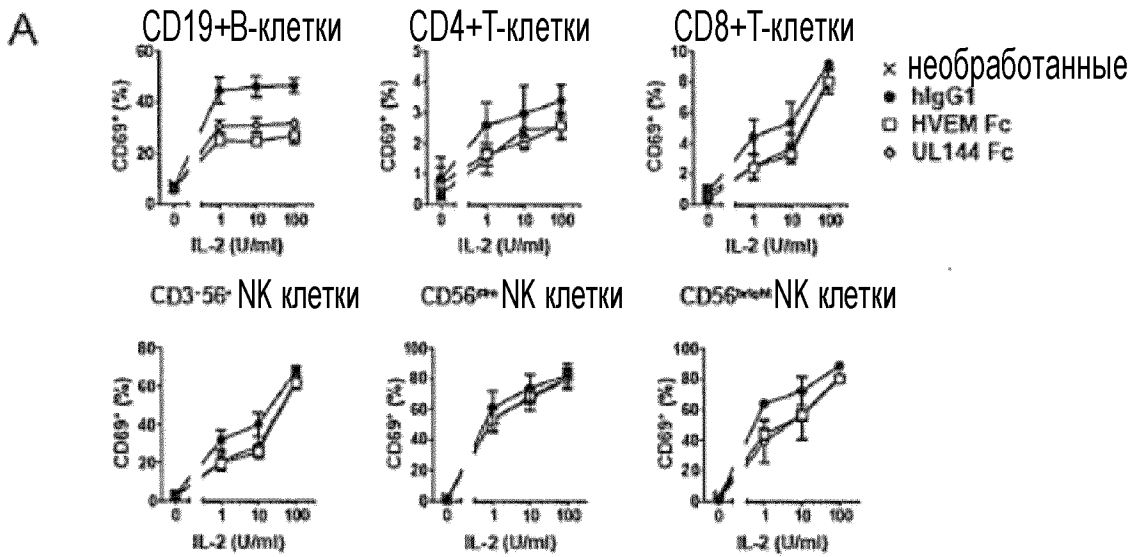
ФИГ. 8А-8В



ФИГ. 9A-9F

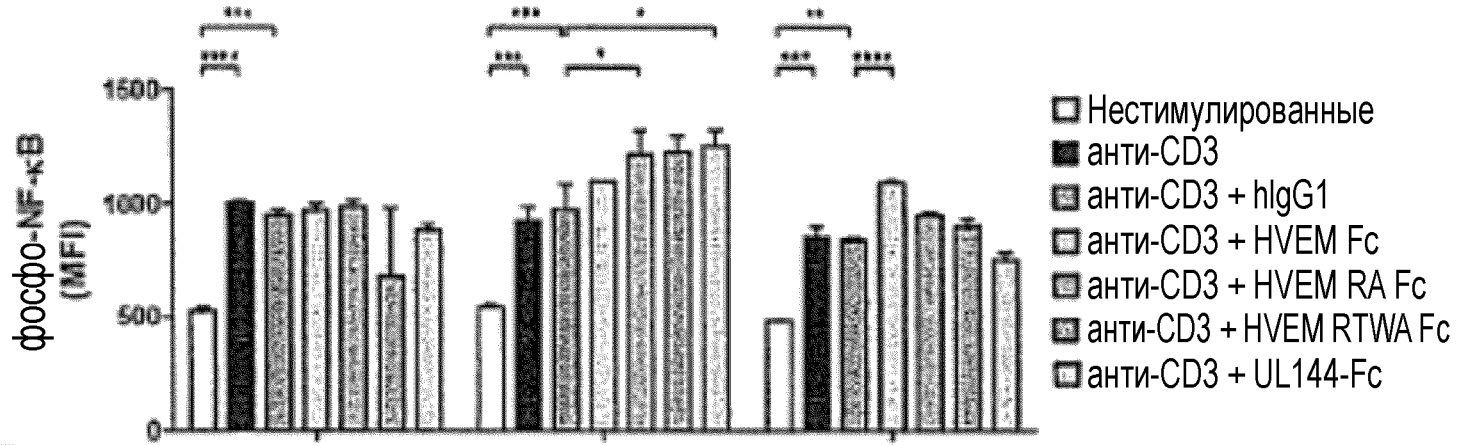


ФИГ. 10А-10В

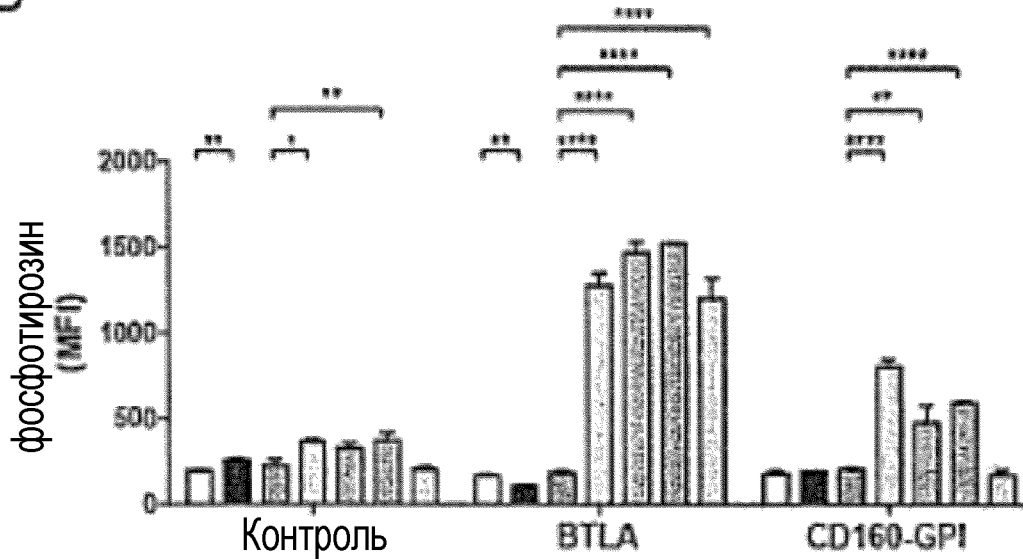


ФИГ. 11А-11С

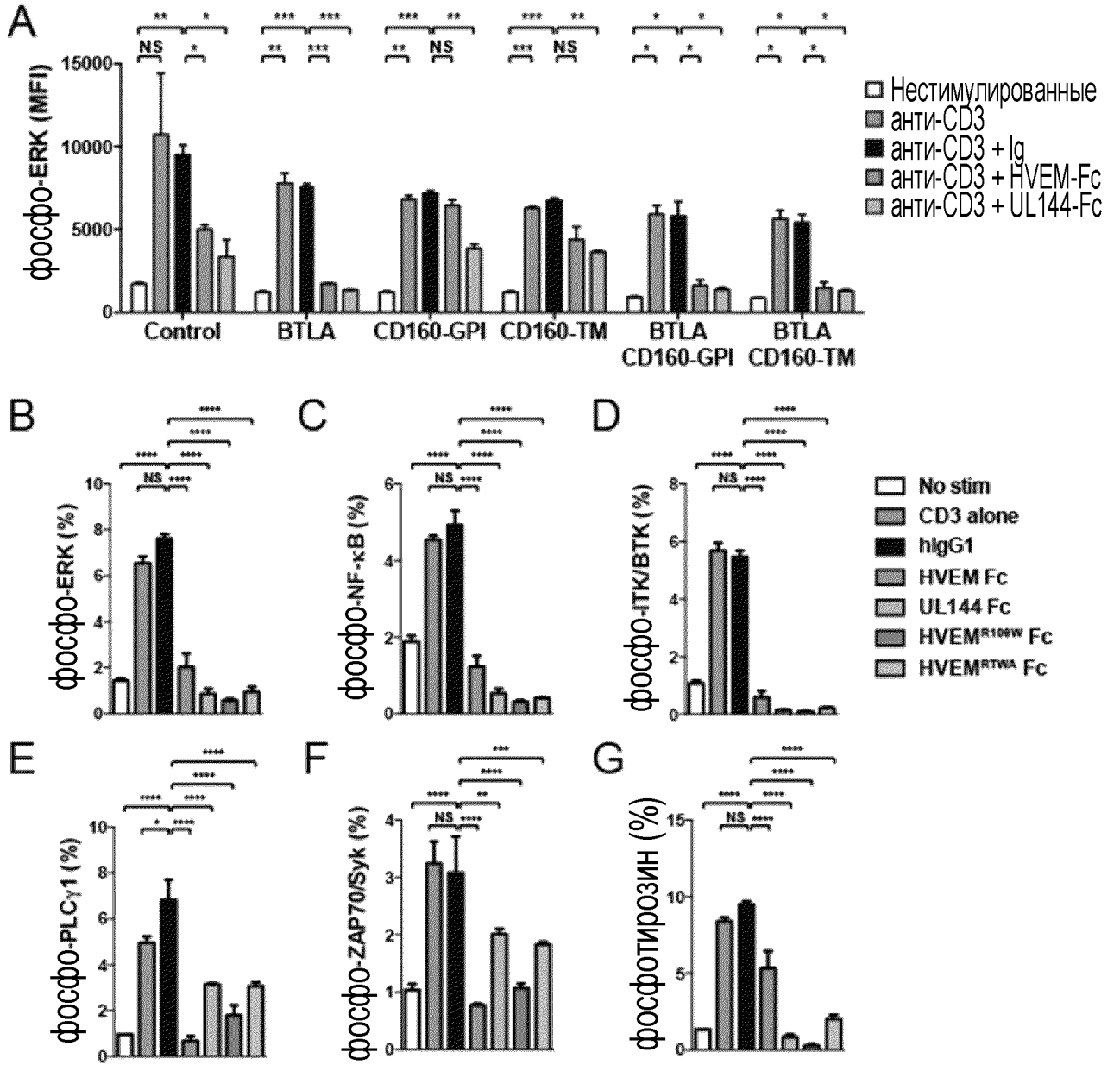
A



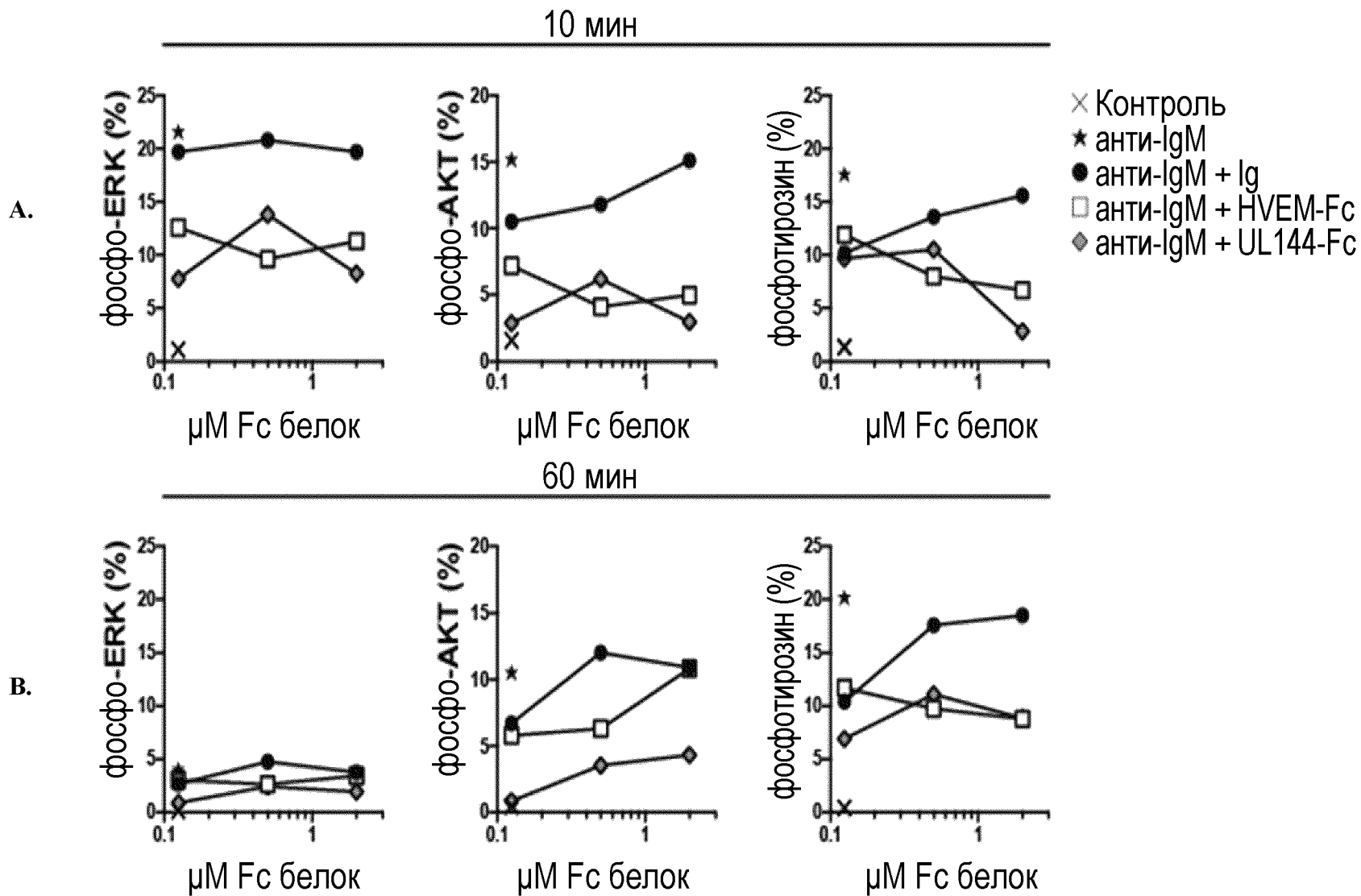
B



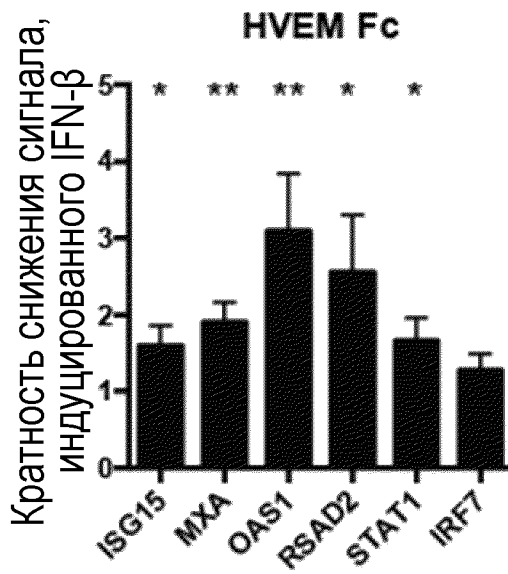
ФИГ. 12А-12В



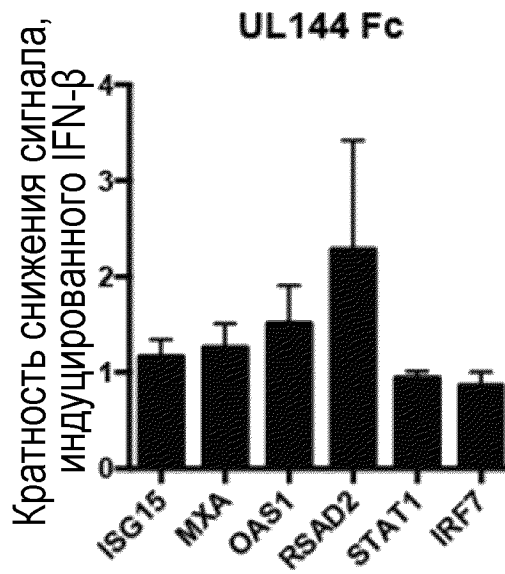
ФИГ. 13А-13G



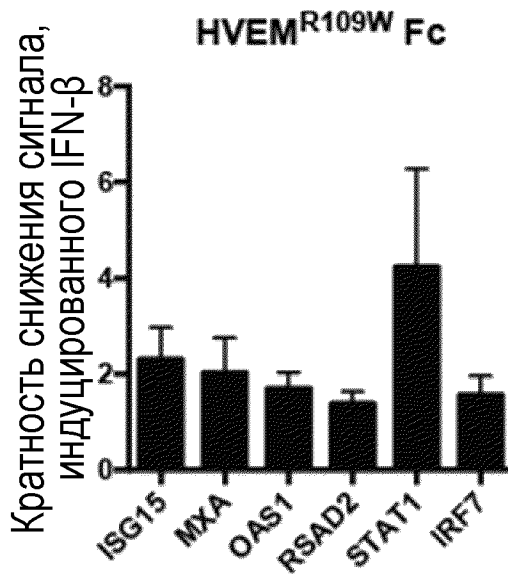
ФИГ. 14А-14В



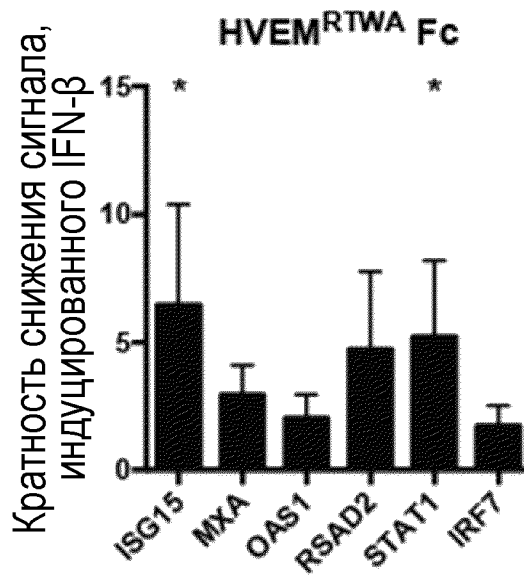
A.



B.

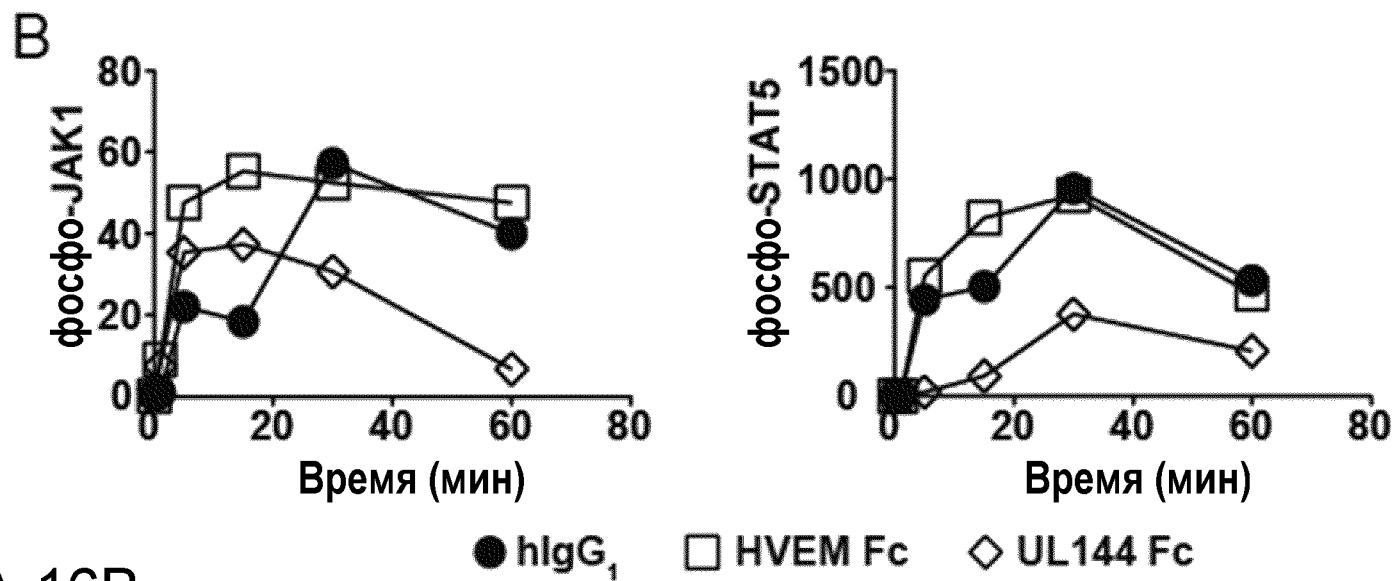
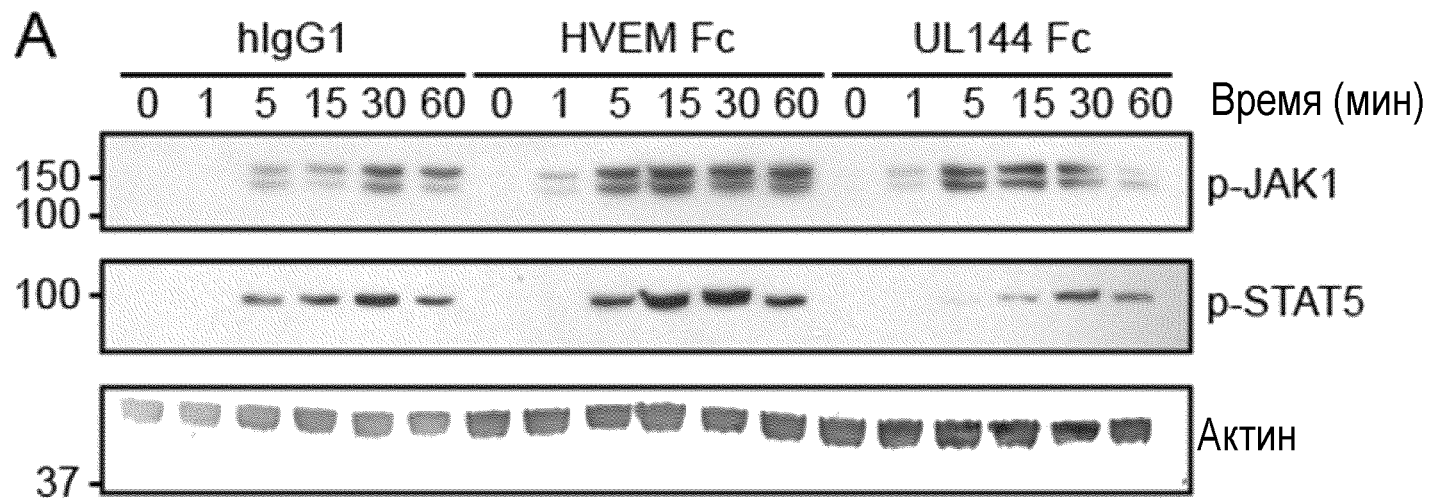


C.

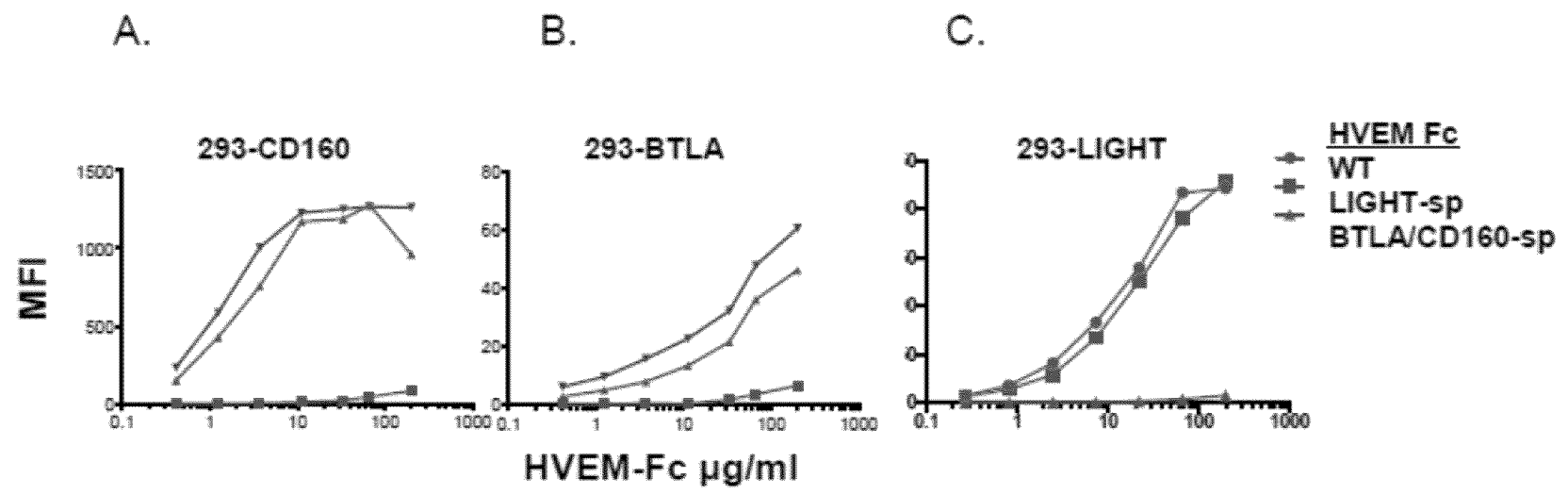


D.

ФИГ. 15А-15D

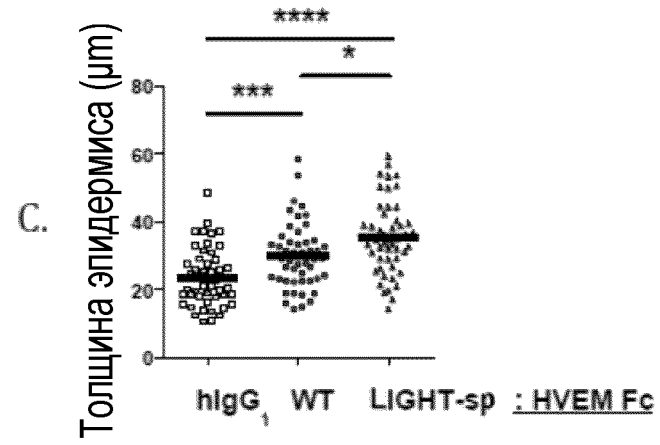
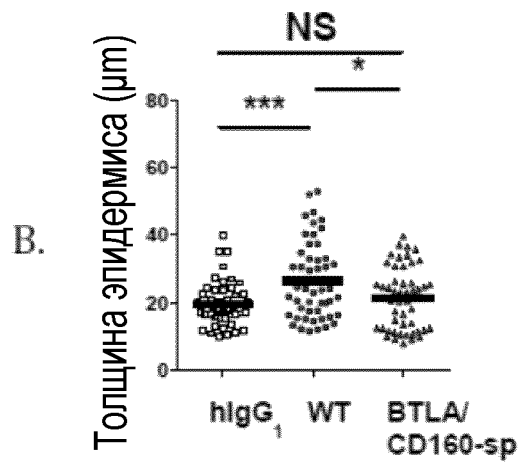
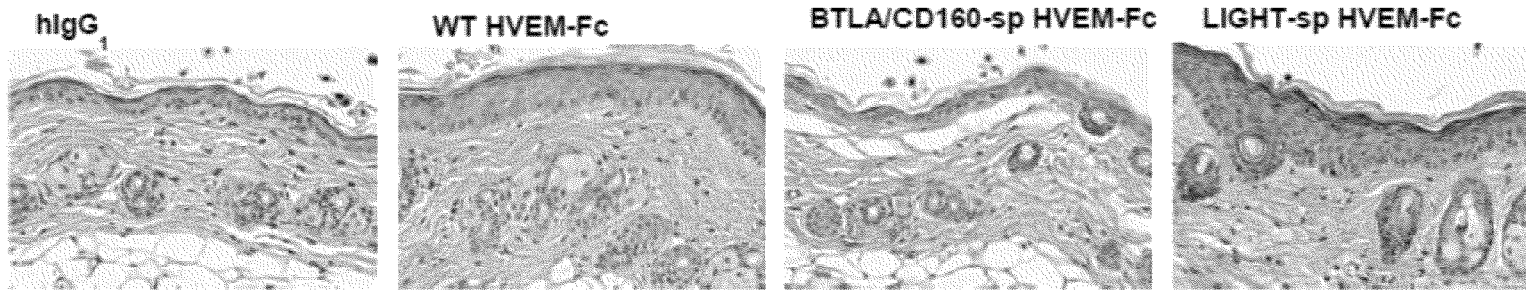


ФИГ. 16А-16В



ФИГ. 17А-17С

A.



ФИГ. 18А-18С

1 gccgcagcaa tggcgctgag ttcctctgct ggagttcatc ctgctagctg ggttcccag
 61 ctgccggtct gagcctgagg catggagcct cctggagact gggggcctcc tccctggaga
 121 tccacccccca gaaccgacgt cttgaggctg gtgctgtatc tcaccttctt gggagcccc
 181 tgctacgccc cagctctgcc gtccctgcaag gaggacgagt acccagtggg ctccgagtgc
 241 tgccccaagt gcagtccagg ttatcgtgtg aaggaggcct gcggggagct gacgggcaca
 301 gtgtgtgaac cctgccctcc aggcacctac attgccacc tcaatggcct aagcaagtgt
 361 ctgcagtgcc aatgtgtga cccagccatg ggccctgcgcg cgagccggaa ctgctccagg
 421 acagagaacg ccgtgtgtgg ctgcagccca ggccacttct gcatcgtcca ggacggggac
 481 cactgcgccg cgtgccgcgc ttacgccacc tccagcccgg gccagagggt gcagaagga
 541 ggcaccgaga gtcaggacac cctgtgtcag aactgcccc cggggacctt ctctcccaat
 601 gggaccctgg aggaatgtca gcaccagacc aagtgcagct ggctggtgac gaaggccgga
 661 gctgggacca gcagctccca ctgggtatgg tggtttctct cagggagcct cgtcatcgtc
 721 attgtttgct ccacagttgg cctaatacata tgtgtgaaaa gaagaaagcc aaggggtgat
 781 gtagtcaagg tgatcgtctc cgtccagcgg aaaagacagg aggcagaagg tgaggccaca
 841 gtcattgagg ccctgcaggc ccctccggac gtcaccacgg tggccgtgga ggagacaata
 901 ccctcattca cggggaggag cccaaaccac tgaccacag actctgcacc ccgacgccag
 961 agatacctgg agcgacggct gctgaaagag gctgtccacc tggcgaaacc accggagccc
 1021 ggaggcttgg gggctccgcc ctgggctgg

ФИГ. 19А

1 MEPPGDWGPP PWRSTPRTDV LRLVLYLTF L GAPCYAPALP SCKEDEYPVG SECCPKCSPG
 61 YRVKEACGEL TGTVCEPCPP GTYIAHLNGL SKCLQCQ MCD PAMGLRASRN CSRTENAVCG
 121 CSPGHFCIVQ DGDHCAACRA YATSSPGQRV QKGGTESQDT LCQNCPPGTF SPNGTLEECQ
 181 HQTKCSWLVT KAGAGTSSSH WWWWFLSGSL VIVIVCSTVG LIICVKRRKP RGDVVKVIVS
 241 VQRKRQEAEG EATVIEALQA PPDVTTVAVE ETIPSFTGRS PNH

ФИГ. 19В

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202390830**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**
См. дополнительный лист

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
C07K 14/705, A61K 38/17, A61K 47/68, A61P 35/00, A61P 37/06Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)
Espacenet, EAPATIS, Google, Reaxys**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	WO 2013/074738 A1 (SANFORD-BURNHAM MEDICAL RESEARCH INSTITUTE) 23.05.2013, реферат, формула, [0064]-[0069], [0145]-[0146], [0156]-[0160], [0172]-[0184], табл. 8, фиг. 12, 15-18, SEQ ID NO: 79,80	1-28
A	WO 2006/054961 A2 (GENENTECH, INC) 01.08.2007, реферат, формула, примеры 3-11, 17-19	1-28
A	WO 2006/063067 A2 (LA JOLLA INSTITUTE FOR ALLERGY AND IMMUNOLOGY et al.) 15.06.2006, реферат, формула, примеры 1-10	1-28

 последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

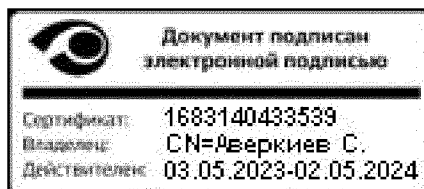
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 06 декабря 2023 (06.12.2023)

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы

С.Е. Аверкиев

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

202390830

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

МПК:

C07K 14/705 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

СПК:

C07K 14/70578
A61K 38/17
A61K 47/6801
A61P 35/00
A61P 37/06
C07K 2319/30