

**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(51) Int. Cl.

*C12N 15/12* (2006.01)*C12Q 1/68* (2006.01)

(11) 공개번호

10-2006-0052681

(43) 공개일자

2006년05월19일

(21) 출원번호 10-2005-7022431

(22) 출원일자 2005년11월23일

번역문 제출일자 2005년11월23일

(86) 국제출원번호 PCT/US2004/016381

(87) 국제공개번호

WO 2004/107618

국제출원일자 2004년05월24일

국제공개일자

2004년12월09일

(30) 우선권주장	60/472,844	2003년05월23일	미국(US)
	60/547,975	2004년02월26일	미국(US)

(71) 출원인  
 와이어쓰  
 미국 뉴저지주 07940 매디슨 파이브 지랄다 팜즈  
 더 거버먼트 오브 더 유나이티드 스테이츠 오브 아메리카 에즈 레프리젠티드 바이 더 세크러  
 테리 오브 더 디파트먼트 오브 헬스 앤드 휴먼 서비스  
 미국 메릴랜드 20852-3804 록빌 쉬트 325 엑시큐터브 블루바드 6011 오피스 오브 테크놀로  
 지 트랜스퍼 내쇼날 인스티튜츠 오브 헬스

(72) 발명자

콜린스 마리  
 미국 앰에이 01760 나틱 라트번 로드 54  
 세바치 에탄 메나헴  
 미국 앰디 20850 록빌 데포 코트 5  
 맥휴즈 레베카 수잔느  
 미국 엔제트 6001 웨링톤 웹 스트리트 51-75 큐비에이아파트 2디  
 휘터스 매튜 제임스  
 미국 앰에이 01749 허드슨 브렌顿 우드 로드 14  
 영 데보라 안  
 미국 앰에이 02176 웬로제 넬슨 로드 39  
 비르네 마이클 찹맨  
 미국 앰에이 브룩라인 히슬롭 로드 34  
 레디 패드말라타 에스  
 미국 앰에이 02081 월풀 미로드 스트리트 127  
 스테펜스 지오프레이 로렌스  
 미국 앰디 20872 데마스커스 리지 마노르 드라이브 26051  
 카레노 비트리즈 엠  
 미국 앰오 63105 클레이튼 닥트포드 에비뉴 11

(74) 대리인

최규팔  
 이은선

심사청구 : 없음

(54) G I T R 리간드, G I T R 리간드-연관 분자, 항체 및 그의 용도

## 요약

본 발명은 글루코코르티코이드-유발 TNF 수용체(GITR)의 신규 리간드와 관련된 신규한 분리 및 정제된 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드를 제공한다. 본 발명은 또한 GITR 리간드(GITRL)에 대한 항체를 제공한다. 본 발명은 또한 GITRL 및/또는 GITRL의 조정자를 이용하여 면역계의 조절곤란으로부터 발생하는 질병(예를 들어, 자가면역 질병, 염증성 질병, 이식거부, 암 및 전염병)의 진단, 예후, 진행 감시 및 치료를 위한 신규한 방법을 제공한다. 본 발명은 추가로 신규한 치료제 및 치료표적을 제공하고, GITRL 및 GITR과 관련하여 면역계의 조절곤란으로부터 발생하는 상기 질병에 대한 중재(치료) 및 예방을 위한 시험 화합물의 스크리닝 및 평가하는 방법을 제공한다.

## 색인어

없음

## 명세서

### 기술분야

본 출원은 2003년 5월 23일에 출원된 미국 가출원 세르 60/472,844호 및 2004년 2월 26일에 출원된 미국 가출원 세르 60/547,975호의 이익을 누리고 있으며, 상기 출원의 내용은 참고로서 본 명세서에 포함되어 있다.

본 발명은 NIH Intramural Research Project #Z01-AI-000224에 대한 것으로 정부의 지원으로 만들어졌다. 정부가 본 발명에 대해 일부 권리를 가지고 있다.

### 배경기술

#### 발명의 분야

본 발명은 글루코코르티코이드-유발 TNF 수용체(GITR), GITR과 연관된 리간드(GITRL) 및 그들과 관련된 조정자와 관련된 면역계의 조절곤란으로부터 발생하는 질병(예를 들어, 자가면역 질병, 염증성 질병, 이식거부, 암 및 전염병)의 진단, 예후, 진행 감시 및 치료를 위한 신규한 방법을 제공한다. 본 발명은 추가로 신규한 치료제 및 치료표적을 제공하고, GITRL 및 GITR과 관련하여 면역계의 조절곤란으로부터 발생하는 상기 질병에 대한 중재(치료) 및 예방을 위한 시험 화합물의 스크리닝 및 평가하는 방법을 제공한다.

#### 관련된 배경 기술

일반적으로 T 림프구는 세포-매개 면역에 책임이 있고, 다른 백혈구의 반응을 증가 또는 억제함으로써 조절 역할을 수행한다. T 림프구가 면역반응의 억제에 관련됐다는 개념은 잘 알려져 있다(예를 들어, Gershon et al. (1970) Immunology 18 : 723-35 참조). 그러나, 이런 억제 세포에 대한 표적 항원 및 그들의 기능을 조절하는 메카니즘에 대해서는 아직 연구중이다.

가슴샘에서 생산되는 조절 T 세포의 한 집단은 독특한 막 항원의 발현에 의한 작동 T 세포와 구분된다. 이러한 조절 T 세포는 CD25 항원을 공발현(coexpress)하는 CD4<sup>+</sup> T 세포(즉, CD4 항원을 발현하는 T 세포)의 서브집단을 구성한다. CD25는 인터루킨-2 수용체(IL-2R) α-사슬로 알려져 있다. CD<sup>+</sup> 25 T 세포는 다양한 동물 모델에서 염증성 병변 및 자가면역의 예방과 연관되어 있다(Shevach (2000) Ann. Rev. Immunol. 18: 423-49, 및 그 안의 참고문헌 참조). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포는 또한 시험관내(in vitro) T 세포 활성화의 억제 및 공배양(coculture)에서 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 세포의 입양(adoptive) 억제와 연관되어 있다(Shevach, supra).

20년 이전에 일부 자가-반응 T 세포가 중앙 내성(central tolerance) 메카니즘을 이탈하고, 가슴샘-유래 조절 T 세포의 조절하에 주변부에 존재한다는 것이 밝혀졌다. 1995년에 Sakaguchi 및 그의 동료는 자연적으로 IL-2R의 α-사슬(즉, CD25)을 발현하는 CD4<sup>+</sup> T 세포의 작은 집단이 조직-특이적 자가반응 T 세포의 조절에 관련돼 있다는 것을 밝혔다

(Sakaguchi et al. (1995) *J. Immunol.* 155: 1151-64). 특히, 그들은 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 세포를 면역결핍 숙주로 전달하게되면 다양한 자가면역 질병을 유발하며, 이는 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 공전달에 의해 예방될 수 있다고 하였다(Sakaguchi et al., supra). 후속 연구는 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 조절 T 세포의 바이러스성, 세균성 및 원충성 감염에 대한 면역 반응의 억제에 관련돼 있다는 것을 암시하였다(Aseffa et al. (2002) *J. Immunol.* 169: 3232-41; Belkaid et al. (2002) *Nature* 420: 502-07; Hisaeda et al. (2004) *Nat. Med.* 10: 29-30; Kursar et al. (2002) *J. Exp. Med.* 196: 1585-92; Lundgren et al. (2003) *Infect. Immun.* 71: 1755-62; Maloy et al. (2003) *J. Exp. Med.* 197: 111-19). 이 두개의 연구는 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 제거가 면역 반응을 증진시킨다는 증거를 제공하였다. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포에 의한 활성화 및 억제를 알아내기 위한 수많은 시도가 있었다. 이런 세포는 시험관내 및 생체내(*in vivo*) 작용 T 세포 기능을 강력하게 억제하는 가슴샘-유래 세포의 독특한 계보를 나타낸다.

많은 시험관내 실험에서 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 세포가 미토겐 및 항원에 반응하여 IL-2의 전사를 금지시킴으로써 CD4<sup>+</sup> T 세포의 증식을 억제한다는 것이 밝혀졌다(예를 들어, Thornton and Shevach (1998) *J. Exp. Med.* 188: 287-96; Takahashi et al. (1998) *Int. Immunol.* 10: 1969-80). 생체내에서 자가반응 CD4<sup>+</sup> T 세포 및 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 공전달은 조직-특이적 자가면역을 유도 및 작용 단계를 억제하는데 충분하다(Suri-Payer et al. (1999) *Eur. J. Immunol.* 29: 669-77; Suri-Payer et al. (1998) *J. Immunol.* 160: 1212-18). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 다른 성질은 외인 IL-2 부존재시의 T 세포 수용체(TCR) 자극에 대한 저반응, 세포-세포 상호작용을 통한 면역억제 및 그들의 억제 표현형을 유도하기 위한 TCR 신호에 대한 필요를 포함한다(일단 그들이 활성화되면, 그들의 억제 기능은 항원 자극에 대해 독립적이다). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 세포 자극에 얻을 수 있는 CD25 발현의 단순한 습득은 억제 표현형을 유발하지 못한다는 것이 알려져 있다. 이러한 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포는 인간내에 존재하는 것으로 알려져 있다(Shevach (2001) *J. Exp. Med.* 193:F1-F6).

한 연구에서 변형된 가슴샘의 선택이 조절 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 생산에 요구된다는 것이 밝혀졌다(Jordan et al. (2001) *Nat. Immunol.* 2: 301-06). 더욱이, 녹아웃(knockout) 마우스를 이용한 연구에서 IL-2 합성 및 반응에 관련된 분자가 이러한 세포의 생산에 필요하다는 것이 밝혀졌다; IL2 또는 IL2R $\beta$  또는 B7.1(CD80) 및 B7.2(CD86) 또는 CD28이 유전적으로 결핍된 마우스는 모두 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포가 심각하게 감소하였고, 이런 마우스중의 일부 주변부에서 림프절병증 및 과증식을 일으켰다(Papiernik et al. (1998) *Int. Immunol.* 10: 371-78 ; Salomon et al. (2000) *Immunity* 12: 431-40; Kumanogoh et al. (2001) *J. Immunol.* 166: 353-60).

최근까지 면역 시스템의 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-매개 억제에 관련된 메카니즘에 대해 밝혀진바가 없다(예를 들어, 항원 특이성, 억제 획득에 관한 분자, 및 억제의 작동 국면(phase)에 관한 세포표면 단백질 또는 단시간 작동하는 사이토카인); 자가면역을 조절함에 있어 CD25<sup>+</sup> T 세포의 분자 표적은 일반적으로 잘 알려져 있지 않다. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 및 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 세포에 대한 유전자 칩 분석을 통한 유전자 발현상의 차이를 조사하여 수많은 CD25<sup>+</sup> 분화 유전자가 존재한다는 것이 현재 알려져 있다(McHugh et al. (2002) *Immunity* 16: 311-23; U. S. Patent Application 10/194,754 참조, 여기에 참고자료로 전체가 포함되어 있다). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 상에 우세하게 발현되는 유전자는 자가면역 질병, 염증성 질병, 이식거부, 암 및 전염병에 대한 치료 중재(intervention) 및 스크리닝 방법을 위한 표적으로서 작용할 수 있다.

중요하게도, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 세포에서 분화되어 발현되는 것으로 알려진 유전자중의 하나는 글루코코티코이드-유발 TNF 수용체(GITR) (McHugh et al., supra)이다. 세포-표면의 막횡단 단백질 수용체인 GITR은 종양 괴사 인자 수용체(TNFR) 서브페밀리이다. GITR은 비활성화된 T 세포상에 구조적으로 존재하고 있는 것으로 알려져 있다(Gavin et al. (2002) *Nat. Immunol.* 3: 33-41; McHugh et al., supra ; Shimizu et al. (2002) *Nat. Immunol.* 3: 135-42). GITR은 GITR 리간드(GITRL)이라 지칭되는 다른 막횡단 단백질에 결합한다. GITR에 대한 작용성 항체는 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 억제 활성을 없애는 것으로 보였고, 이러한 세포의 활성을 조절하는데 있어 GITR의 기능적인 역할을 나타냈다(McHugh et al., supra).

다른 연구도 GITR을 특이성 모노클로날 항체를 이용한 GITR의 자극이 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포-매개 억제를 제거하고, 그에 의해 자가면역을 유도하는 것을 확인하였다(Shimizu et al., supra). 이러한 연구는 GTRL이 보다 신뢰성 있는 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 마커임을 제안하게 하였다(Uraushihara et al. (2003) *J. Immunol.* 171: 708-16); 그러나, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 활성화뒤에 GITR의 상향조절이 또한 발생하므로, GITR의 단독 발현만으로 이런 아집단을 구별할 수는 없다(McHugh et al., supra ; Shimizu et al., supra).

GITR이 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 세포에 대한 억제 활성을 조절하는데 있어 중요하다는 것이 알려졌기 때문에, GITR과 상호작용할 수 있는 신규한 분자를 확인하고, 특성을 아는 것이 바람직하다. GITR과 상호작용하는 신규한 분자는 여기에 개시되어 있다. 추가로, 이런 분자의 조절자가 제공된다.

### 발명의 상세한 설명

본 발명은 인간 GITRL에 대한 신규한 마우스 동족체의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 제공한다. 본 발명은 또한 마우스 GITRL에 대한 항체를 제공한다. 본 발명은 또한 작용성 GITR-GITRL 결합을 유도함으로써 면역 억제를 역으로 하고, GITR-GITRL 결합을 길항함(예를 들어, GITRL 활성을 저해(예를 들어, GITR 및 GITRL의 상호작용을 차단)하는 중화 항체를 사용함)으로써 면역 억제를 보존하거나 증진시키는 방법을 제공한다. 이런 면역 억제의 역 또는 보전/증진은 자가면역 질병, 염증성 질병, 이식거부, 암 및 전염병과 같은 면역반응의 조절이상으로부터 발생하는 다양한 질병을 치료하는데 유익하다. 본 발명에 따른 방법은 이에 한정되지는 않으나 마우스 GITR, GITRL 및 그의 동족체를 포함하는 GITRL 및 GITR을 조절하는 것에 관한 것이고; 특히 이러한 동족체에는 인간 GITRL 및 인간 GITR이 포함된다.

본 발명은 GITR에 대한 신규한 리간드(GITRL)와 관련된 분리 및 정제된 신규한 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드를 제공한다. 본 발명은 또한 GITRL에 대한 항체 및 자가면역 질병, 염증성 질병, 이식거부, 암 및 전염병의 진단, 예후, 진행 감시 및 치료를 위한 신규한 방법을 제공한다. 본 발명의 한 구체예에서, 개시된 방법 및 분자는 자가면역 질병, 염증성 질병, 이식거부, 암 및 전염병을 포함하는 질병의 치료동안에 면역 반응의 결과를 조절하는데 사용될 수 있다. 다른 구체예에서, GITR 및 GITRL의 상호작용을 차단 또는 저해하는(예를 들어, GITRL의 발현 또는 활성을 하향조절하거나 GITRL에 결합함으로써, 그러나 GITR 신호를 유도하지는 않음) 본 발명의 개시된 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드는 면역 시스템의 억제를 보전하거나 증진시키는데 사용될 수 있다. 다른 구체예에서, GITR 및 GITRL의 상호작용은 저분자에 의해 차단 또는 저해될 수 있다. 당업자는 이런 타입의 조절(즉, 이런 구체예)이 자가면역 질병 및 어떤 염증성 질병 및 유사 또는 관련된 질병, 그리고 이식거부의 치료에 있어 가장 유익함을 예측할 수 있다. 다른 구체예에서, 예를 들어 GITRL의 발현 또는 활성을 상향조절하거나 GITR에 대해 작용성 결합을 함으로써 GITR 신호를 유도하는 본 발명에 개시된 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드는 면역 시스템의 억제를 역으로 하거나 차단하거나 제거할 수 있다. 다른 구체예에서, GITR 및 GITRL의 상호작용은 저분자에 의해 증가되거나 모방될 수 있다. 이런 타입의 조절이 암과 유사질병, 및 전염병의 치료에 가장 유익하다는 것이 당업자는 예측될 것이다. 또한, 당업자는 이런 신규한 치료를 확립된 다른 치료와 병용하는 것에 대한 가능한 잇점을 알 것이다.

한 구체예에서, 본 발명은 서열번호:1 또는 서열번호:3의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 분리된 핵산분자를 제공한다. 다른 구체예에서, 핵산분자는 적어도 하나의 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결된다. 다른 구체예에서, 핵산분자로 트랜스포메이션되거나 트랜스펙션된 숙주세포가 제공된다.

다른 구체예에서, 본 발명은 서열번호:1 또는 서열번호:3의 분리된 대립유전자를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열번호:3의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 분리된 유전자를 제공한다.

다른 구체예에서, 본 발명은 서열번호:1 또는 서열번호:3의 뉴클레오티드 서열, 또는 그의 상보적 서열과 고 긴장 상태에서 특이적으로 혼성화하는 분리된 핵산분자를 제공한다.

다른 구체예에서, 본 발명은 서열번호:2의 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 코딩하는 분리된 핵산분자 또는 단백질의 활성 단편을 코딩하는 그의 단편을 제공한다. 다른 구체예에서, 핵산분자 또는 그의 단편은 적어도 하나의 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결된다. 다른 구체예에서, 적어도 하나의 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결된 분리된 핵산분자 또는 그의 활성단편으로 트랜스포메이션 또는 트랜스펙션된 숙주세포가 제공된다. 다른 구체예에서, 본 발명은 체세포 및 배아세포에 분리된 핵산분자 또는 그의 단편을 함유하는 비인간 트랜스제닉 동물을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 체세포 및 배아세포에 서열번호:1 또는 서열번호:3의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DNA를 함유하는 비인간 트랜스제닉 동물을 제공한다.

다른 구체예에서, 본 발명은 서열번호:1 또는 서열번호:3의 뉴클레오티드 서열, 또는 그의 상보적 서열에 고 긴장 상태에서 특이적으로 혼성하는 분리된 핵산에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 포함하는 분리된 단백질을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열번호:2의 아미노산 서열, 또는 그의 활성 단편을 포함하는 분리된 단백질을 제공한다.

다른 구체예에서, 본 발명은 서열번호:1 또는 서열번호:3의 뉴클레오티드 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열, 또는 단편을 포함하는 분리된 핵산분자를 제공하고, 세포내에서 핵산의 발현은 GIRLL의 생산을 감소시킨다. 다른 구체예에서, 핵산분자 또는 그의 단편은 적어도 하나의 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결된다. 다른 구체예에서, 적어도 하나의 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결된 분리된 핵산분자 또는 그의 활성단편으로 트랜스포메이션 또는 트랜스펙션된 숙주세포가 제공된다. 다른 구체예에서, 본 발명은 체세포 및 배아세포에 분리된 핵산분자 또는 그의 단편을 함유하는 비인간 트랜스제닉 동물을 제공한다.

다른 구체예에서, 본 발명은 서열번호:1 또는 서열번호:3의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산분자에 대응하는 mRNA에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오티드를 제공하고, 올리고뉴클레오티드는 GITRL의 발현을 저해한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열번호:1 또는 서열번호:3의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산분자에 대응하는 siRNA 분자를 제공하고, siRNA 분자는 GITRL의 발현을 저해한다.

다른 구체예에서, 본 발명은 서열번호:1 또는 서열번호:3의 뉴클레오티드 서열, 또는 그의 상보적 서열에 고 긴장 상태에서 특이적으로 혼성하는 분리된 핵산에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 포함하는 분리된 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 분리된 항체를 제공한다. 다른 구체예에서, 항체는 GITRL 활성을 중화한다. 다른 구체예에서, 항체는 ATCC number PTA-5336를 가지는 5F1, 또는 ATCC number PTA-5337를 가지는 10F12이다. 다른 구체예에서, 항체는 5F1 또는 10F12의 항원 결합 단편을 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열번호:2의 아미노산 서열, 또는 그의 활성 단편을 포함하는 분리된 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 분리된 항체를 제공한다. 다른 구체예에서, 항체는 GITRL 활성을 중화한다. 다른 구체예에서, 항체는 ATCC number PTA-5336를 가지는 5F1, 또는 ATCC number PTA-5337를 가지는 10F12이다. 다른 구체예에서, 항체는 5F1 또는 10F12의 항원 결합 단편을 포함한다.

다른 구체예에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, GITRL과 GITR의 상호작용을 저해하거나 차단할 수 있는 시험 화합물을 스크리닝하는 방법을 제공한다: GITRL 및 GITR을 포함하는 샘플을 화합물과 접촉시키고, 샘플에서 GITRL과 GITR의 상호작용이 상기 화합물과 접촉시키지 않은 샘플내의 GITRL과 GITR의 상호작용에 대해 상대적으로 감소하였는지를 결정하며, 상기 화합물과 접촉한 샘플내의 GITRL과 GITR의 상호작용의 감소에 의해 상기 화합물이 GITRL과 GITR의 상호작용을 저해하는 물질임을 확인한다. 다른 구체예에서, 확인된 화합물은, 개체(subject)로부터 T세포를 분리하고, 분리된 T세포를 확인된 화합물로 처리하며, 처리된 T세포를 개체에 이식시키는 단계를 포함하는 자가면역 질병, 염증성 질병 또는 이식거부의 위험이 있거나 진단된 개체를 치료하는 방법에 사용된다. 다른 구체예에서, 확인된 화합물은, 개체에 확인된 화합물을 투여하는 것을 포함하는 자가면역 질병, 염증성 질병 또는 이식거부의 위험이 있거나 진단된 개체를 치료하는 방법에 사용된다. 다른 구체예에서, 본 발명은 개체에 화합물을 투여하기 전에 개체로부터 작동 T세포의 첫번째 수를 검사하고, 개체에 화합물을 투여한 후에 개체로부터 작동 T세포의 두번째 수를 검사하며, 첫번째 수와 두번째 수를 비교하는 단계를 포함하고, 첫번째 수와 비교하여 두번째 수에서 작용 T세포의 수가 상당히 감소하면 화합물이 개체로부터 자가면역 질병, 염증성 질병 또는 이식거부를 치료하는데 유용하다는 것을 나타내는 개체로부터 확인된 화합물의 효능을 평가하는 방법을 제공한다. 다른 구체예에서 작용 T세포는 CD4<sup>+</sup> T세포 또는 CD8<sup>+</sup> T세포이다.

다른 구체예에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, GITRL과 GITR의 상호작용을 모방하거나 증가시킬 수 있는 시험 화합물을 스크리닝하는 방법을 제공한다: GITRL 및 GITR을 포함하는 샘플을 시험 화합물과 접촉시키고, 샘플에서 GITRL과 GITR의 상호작용이 상기 화합물과 접촉시키지 않은 샘플내의 GITRL과 GITR의 상호작용에 대해 상대적으로 증가하였는지를 결정하며, 상기 화합물과 접촉한 샘플내의 GITRL과 GITR의 상호작용의 증가에 의해 상기 화합물이 GITRL과 GITR의 상호작용을 모방하거나 증가시키는 물질임을 확인한다. 다른 구체예에서, 확인된 화합물은, 개체로부터 T세포를 분리하고, 분리된 T세포를 확인된 화합물로 처리하며, 처리된 T세포를 개체에 이식시키는 단계를 포함하는 자가면역 질병, 염증성 질병 또는 이식거부의 위험이 있거나 진단된 개체를 치료하는 방법에 사용된다. 다른 구체예에서, 확인된 화합물은, 개체에 확인된 화합물을 투여하는 것을 포함하는 암 또는 전염병의 위험이 있거나 진단된 개체를 치료하는 방법에 사용된다. 다른 구체예에서, 본 발명은 개체에 화합물을 투여하기 전에 개체로부터 작동 T세포의 첫번째 수를 검사하고, 개체에 화합물을 투여한 후에 개체로부터 작동 T세포의 두번째 수를 검사하며, 첫번째 수와 두번째 수를 비교하는 단계를 포함하고, 첫번째 수와 비교하여 두번째 수에서 작용 T세포의 수가 상당히 증가하면 화합물이 개체로부터 암 또는 전염병을 치료하는데 유용하다는 것을 나타내는 개체로부터 확인된 화합물의 효능을 평가하는 방법을 제공한다. 다른 구체예에서 작용 T세포는 CD4<sup>+</sup> T세포 또는 CD8<sup>+</sup> T세포이다.

다른 구체예에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 개체에서 자가면역 질병, 염증성 질병 또는 이식거부를 진단하는 방법을 제공한다: 개체로부터 얻은 샘플내의 GITRL 유전자 산물의 시험량을 검출하고, 상기 시험량을 대조군 샘플내의 GITRL 유전자 산물의 양과 비교하며, 정상적인 양보다 상당히 높은 시험량은 자가면역 질병, 염증성 질병 또는 이식거부에 대한

진단에서 양성 지표를 나타낸다. 다른 구체예에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 개체에서 암 또는 전염병을 진단하는 방법을 제공한다: 개체로부터 얻은 샘플내의 GITRL 유전자 산물의 시험량을 검출하고, 상기 시험량을 대조군 샘플내의 GITRL 유전자 산물의 양과 비교하며, 정상적인 양보다 상당히 낮은 시험량은 자가면역 암 또는 전염병에 대한 진단에서 양성 지표를 나타낸다.

다른 구체예에서, 본 발명은 개체에 GITR 길항제를 투여하는 것을 포함하는, 자가면역 질병, 염증성 질병 또는 이식거부로 진단된 또는 위험이 있는 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 다른 구체예에서, 상기 방법은 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 조절 T 세포에 의한 억제에 대해 개체내 작동 T 세포의 감수성이 유지되도록 GITR 길항제(예를 들어, 그러한 감수성을 유지하는데 유효한 양으로)를 투여하는 것을 포함한다. 다른 구체예에서, GITR 길항제는 중화 항-GITRL 항체, 중화 항-GITR 항체, GITR을 포함하는 융합 단백질, GITR의 활성 단편을 포함하는 융합 단백질, 길항성 저분자, 안티센스 GITRL 핵산분자 및 siRNA GITRL 핵산분자로 구성된 그룹으로부터 선택된다. 다른 구체예에서, 자가면역질병 또는 염증성 질병은 류마티스 관절염, 뇌척수염, 골관절염, 다발 경화증, 자가면역 위염, 전신홍반 루프스, 건선과 다른 염증성 피부병, 타입 I 당뇨병, 천식, 알레르기, 및 크론병과 궤양 대장염을 포함하는 염증성 대장 질병으로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

다른 구체예에서, 본 발명은 개체에 GITR 작용제를 투여하는 것을 포함하는, 암 또는 전염병으로 진단된 또는 위험이 있는 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 다른 구체예에서, 상기 방법은 GITR 작용제가 개체내 작용 T 세포에 대해 costimulatory 신호를 제공하고, 개체내에서 작용 T 세포가 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 조절 T 세포에 의한 억제에 덜 민감하도록 GITR 작용제(예를 들어, 그러한 신호를 제공하는데 유효한 양으로)를 투여하는 것을 포함한다. 다른 구체예에서, GITR 작용제가 GITRL, GITRL의 활성 단편, GITRL을 포함하는 융합 단백질, GITRL의 활성 단편을 포함하는 융합 단백질 및 작용성 GITR 항체로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

다른 구체예에서, 본 발명은 GITR 작용제를 세포 집단(population)에 투여하는 것을 포함하는 작용 T 세포를 함유하는 세포 집단의 증식을 유도하는 방법을 제공한다. 다른 구체예에서, GITR 작용제가 GITRL, GITRL의 활성 단편, GITRL을 포함하는 융합 단백질, GITRL의 활성 단편을 포함하는 융합 단백질 및 작용성 GITR 항체로 구성된 그룹으로부터 선택된다. 다른 구체예에서, 작용 T 세포는 CD4<sup>+</sup> T 세포 또는 CD8<sup>+</sup> T 세포이다.

다른 구체예에서, 본 발명은 GITR 길항제를 세포 집단(population)에 투여하는 것을 포함하는, 작용 T 세포를 함유하는 세포 집단의 증식을 저해하는 방법을 제공한다. 다른 구체예에서, GITR 길항제는 중화 항-GITRL 항체, 중화 항-GITR 항체, GITR을 포함하는 융합 단백질, GITR의 활성 단편을 포함하는 융합 단백질, 길항성 저분자, 안티센스 GITRL 핵산분자 및 siRNA GITRL 핵산분자로 구성된 그룹으로부터 선택된다. 다른 구체예에서, 작용 T 세포는 CD4<sup>+</sup> T 세포 또는 CD8<sup>+</sup> T 세포이다. 다른 구체예에서, GITR 길항제는 5F1 또는 10F12이다.

다른 구체예에서, 본 발명은 GITR 작용제를 세포 집단에 투여하는 것을 포함하는, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 조절 T 세포의 존재하에 작용 T 세포를 포함하는 세포 집단의 억제를 저해하거나 차단하는 방법을 제공한다. 다른 구체예에서, 상기 방법은 GITR 작용제가 costimulatory 신호를 작용 T 세포에 제공하고, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 조절 T 세포에 의한 억제에 덜 민감하도록 GITR 작용제를 투여하는 것을 포함한다. 다른 구체예에서, GITR 작용제는 GITRL, GITRL의 활성 단편, GITRL을 포함하는 융합 단백질, GITRL의 활성 단편을 포함하는 융합 단백질 및 작용성 GITR 항체로 구성된 그룹으로부터 선택된다. 다른 구체예에서, 작용 T 세포는 CD4<sup>+</sup> T 세포 또는 CD8<sup>+</sup> T 세포이다.

다른 구체예에서, 본 발명은 GITR 길항제를 세포 집단에 투여하는 것을 포함하는, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 조절 T 세포의 존재하에 작용 T 세포를 포함하는 세포 집단을 억제하는 방법을 제공한다. 다른 구체예에서, 상기 방법은 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 조절 T 세포에 의한 억제에 대해 개체내 작동 T 세포의 감수성이 유지되도록 GITR 길항제를 투여하는 것을 포함한다. 다른 구체예에서, GITR 길항제는 중화 항-GITRL 항체, 중화 항-GITR 항체, GITR을 포함하는 융합 단백질, GITR의 활성 단편을 포함하는 융합 단백질, 길항성 저분자, 안티센스 GITRL 핵산분자 및 siRNA GITRL 핵산분자로 구성된 그룹으로부터 선택된다. 다른 구체예에서, 작용 T 세포는 CD4<sup>+</sup> T 세포 또는 CD8<sup>+</sup> T 세포이다. 다른 구체예에서, GITR 길항제는 5F1 또는 10F12이다.

다른 구체예에서, 본 발명은 서열번호:1 또는 서열번호:3의 뉴클레오티드 서열에 상보적이고 세포내에서 발현시 GITRL의 생산 감소를 야기하는 뉴클레오티드 서열, 또는 그의 단편을 포함하는 분리된 핵산 분자로 세포 집단을 처리하는 것을 포함하는, 세포 집단에서 GITRL의 발현을 저해하는 방법을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열번호:1 또는 서열번

호:3의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산분자에 대응하는 mRNA에 상보적이고 GITRL의 발현을 저해하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 또는 그의 단편으로 세포 집단을 처리하는 것을 포함하는, 세포 집단에서 GITRL의 발현을 저해하는 방법을 제공한다.

다른 구체예에서, 본 발명은 서열번호:1 또는 서열번호:3의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 분리된 핵산분자에 대응하는 mRNA에 대해 표적화된 siRNA로 세포 집단을 처리하는 것을 포함하는, 세포 집단에서 GITRL의 발현을 저해하는 방법을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열번호:1 또는 서열번호:3의 뉴클레오티드 서열에 상보적인 분리된 핵산분자에 대응하는 mRNA에 대해 표적화된 siRNA로 세포 집단을 처리하는 것을 포함하는, 세포 집단에서 GITRL의 발현을 저해하는 방법을 제공한다.

다른 구체예에서, 본 발명은 GITRL을 코딩하는 핵산분자에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드로 세포 집단을 처리하는 것을 포함하는, 세포 집단에서 GITRL의 발현을 저해하는 방법을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 GITRL을 코딩하는 mRNA에 대해 표적화된 siRNA로 세포 집단을 처리하는 것을 포함하는, 세포 집단에서 GITRL의 발현을 저해하는 방법을 제공한다.

다른 구체예에서, 본 발명은 서열번호:1 또는 서열번호:3의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산분자, 또는 서열번호:2의 아미노산 서열을 포함하는 단백질 또는 그의 활성단편을 코딩하는 분리된 핵산분자로 세포집단을 트랜스포메이션 또는 트랜스펙션 시킴으로써 세포집단을 치료하는 것을 포함하는, 세포집단에서 GITRL의 발현을 유도하는 방법을 제공한다(여기에서, 핵산분자는 적어도 하나의 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결된다).

다른 구체예에서, 본 발명은 GITR과 시험관내(*in vitro*) 또는 생체외(*ex vivo*) 접촉시킨 작동 T 세포 집단을 제공한다. 다른 구체예에서, GITR 작용제는 GITRL, GITRL의 활성 단편, GITRL을 포함하는 융합 단백질, GITRL의 활성 단편을 포함하는 융합 단백질 및 작용성 GITR 항체로 구성된 그룹으로부터 선택된다. 다른 구체예에서, 작용 T 세포는 CD4<sup>+</sup> T 세포 또는 CD8<sup>+</sup> T 세포이다.

다른 구체예에서, 본 발명은 작동 T 세포 집단을 얻고, 상기 집단을 GITR 작용제로 처리하며, 처리된 집단을 암 또는 전염병으로 고통받는 개체에 투여하는 것을 포함하는, 개체로부터 암 또는 전염병을 치료하는 방법을 제공한다. 다른 구체예에서, GITR 작용제는 GITRL, GITRL의 활성 단편, GITRL을 포함하는 융합 단백질, GITRL의 활성 단편을 포함하는 융합 단백질 및 작용성 GITR 항체로 구성된 그룹으로부터 선택된다. 다른 구체예에서, 작용 T 세포는 CD4<sup>+</sup> T 세포 또는 CD8<sup>+</sup> T 세포이다. 다른 구체예에서, 개체는 암으로 고통받고 있고, 처리된 집단은 종양 백식으로 사용된다.

다른 구체예에서, 본 발명은 GITR 작용제 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 다른 구체예에서, GITR 작용제는 GITRL, GITRL의 활성 단편, GITRL을 포함하는 융합 단백질, GITRL의 활성 단편을 포함하는 융합 단백질 및 작용성 GITR 항체로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

다른 구체예에서, 본 발명은 GITR 길항제 및 약제학적으로 허용되는 담체을 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 다른 구체예에서, GITR 길항제는 중화 항-GITRL 항체, 중화 항-GITR 항체, GITR을 포함하는 융합 단백질, GITR의 활성 단편을 포함하는 융합 단백질, 길항성 저분자, 안티센스 GITRL 핵산분자 및 siRNA GITRL 핵산분자로 구성된 그룹으로부터 선택된다. 다른 구체예에서, 항체는 5F1 또는 10F12의 항원 결합 단편을 포함한다.

다른 구체예에서, 본 발명은 GITR 작용제 및 항원(바이러스 항원, 세균 항원, 진균 항원, 기생충 항원, 암 항원, 종양-연관 항원 및 그들의 단편으로 구성된 그룹으로부터 선택됨)을 포함하는 백신 보강제를 제공한다. 다른 구체예에서, GITR 작용제는 GITRL, GITRL의 활성 단편, GITRL을 포함하는 융합 단백질, GITRL의 활성 단편을 포함하는 융합 단백질, 작용성 저분자 및 작용성 항-GITR 항체로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

다른 구체예에서, 본 발명은 GITR 길항제 및 항원(자가항원, 아밀로이드 웨بت아이드 단백질, 동종항원, 이식 항원, 알레르기 항원 및 그들의 단편으로 구성된 그룹으로부터 선택됨)을 포함하는 백신 보강제를 제공한다. 다른 구체예에서, GITR 길항제는 중화 항-GITRL 항체, 중화 항-GITR 항체, GITR을 포함하는 융합 단백질, GITR의 활성 단편을 포함하는 융합 단백질, 길항성 저분자, 안티센스 GITRL 핵산분자 및 siRNA GITRL 핵산분자로 구성된 그룹으로부터 선택된다. 다른 구체예에서, 항체는 5F1 또는 10F12을 포함하는 항원 결합 단편을 포함한다.

다른 구체예에서, 본 발명은 GITRL 활성을 중화시킬 수 있는 시험 화합물을 스크리닝하는 방법을 제공한다: GITRL 및 중화 항체를 포함하는 샘플을 화합물과 접촉시키고, 샘플에서 GITRL 및 중화 항체의 상호작용이 상기 화합물과 접촉시키지

않은 샘플내의 GITRL 및 중화 항체의 상호작용에 대해 상대적으로 감소하였는지를 결정하며, 상기 화합물과 접촉한 샘플내의 GITRL 및 중화 항체의 상호작용의 감소에 의해 상기 화합물이 GITRL 및 중화 항체의 상호작용을 저해하거나 차단하는 물질임을 확인한다. 다른 구체예에서, 항체는 5F1 또는 10F12이다.

다른 구체예에서, 본 발명은 GITR 작용제를 투여하는 것을 포함하는, 작용 T 세포를 함유하는 세포집단에 costimulatory 신호를 제공하는 방법을 제공한다. 다른 구체예에서, GITR 작용제는 GITRL, GITRL의 활성 단편, GITRL을 포함하는 융합 단백질, GITRL의 활성 단편을 포함하는 융합 단백질 및 작용성 GITR 항체로 구성된 그룹으로부터 선택된다. 다른 구체예에서, 작용 T 세포는 CD4<sup>+</sup> T 세포 또는 CD8<sup>+</sup> T 세포이다.

여제 활성에 대한 반전을 나타낼 수 있는 GITR에 대한 항체가 작용성 신호를 나타내는 것으로 보이는 것처럼, GITRL에 의한 GITR의 채용(engagement)은 또한 조절 T 세포의 억제활성을 저해할 것이다. 종래에는 적합한 시약이 없었기 때문에, 보다 생리학적 조건에서 GITR/GITRL 상호작용에 대한 상세한 기능 분석을 하지 못했다. 여기서, GITRL의 마우스 오솔로그(ortholog)가 동정되었고, GITRL의 마우스 오솔로그에 특이적으로 결합하는 작용성 항체(즉, 인간 GITRL과 교차-반응하지 않음)가 제조되었다.

이 시약을 이용하여, GITRL의 조직 분포 및 조절이 시험되었다. 추가로, GITR<sup>-/-</sup>마우스를 이용하여 GITR/GITRL 상호작용의 T 세포 억제를 조절능력을 시험하였다. 정도의 차이는 있으나 CD25<sup>-</sup> 및 CD25<sup>+</sup> T 세포가 모두 GITR을 발현하기 때문에, 종래의 연구는 작용성 항-GITR 항체와 함께 공배양 처리하는 경우에 억제 기능의 저해가 GITR을 채용한 세포 표적에 관해 동일한 결과를 나타낸다고 하였다. 공배양 실험에서 야생형 및 GITR<sup>-/-</sup> 마우스로부터 얻은 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 및 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 세포를 이용함으로써, 억제를 제거하기 위해서는 GITR을 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 억제 T 세포가 아닌 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> 반응자 T 세포에 연결되어야 한다는 것이 밝혀졌다. 생리학적 수의 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포 존재하에서는 완전히 억제되지만, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 부재하에 GITR<sup>-/-</sup> T 세포는 야생형 동물과 유사한 증식 반응을 제공(mount)한다. 이런 결과는 GITL/GITRL의 채택이 작동 T 세포에게 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 저해 효과에 대한 저항성을 부여하는 기준에 알지 못한 신호를 제공한다는 것을 처음으로 제시하였다. 따라서, 제2차 염증성 신호 다음에 일어나는 GITRL 발현의 하향조절은 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-매개 억제를 촉진하고, 유해한 과잉의 작동 세포 반응 결과를 예방할 수 있다.

이 연구는 GITR 및 그의 리간드 (GITRL)의 상호작용에 깔려 있는 메카니즘(특히, 전통적으로 억제 활성의 표적으로 이해되어진 CD4+ CD25-T 세포에 대한 효과) 대해 새롭게 조명하였다. 요약하면, GITR<sup>-/-</sup> 마우스를 이용하여, 항-GITR mAb(GITR에 대한 작용성 마우스 항체)의 억제 제거 능력은 (종전에, 여러 연구에서 제안되어진) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포가 아닌 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 세포에 대한 작용에 의해 매개된다. APCs (항원보유세포, antigen presenting cell)는 구조적으로 GITRL을 발현하고, GITRL은 다음의 톨-유사(toll-like) 수용체 신호를 하향조절한다. GITR<sup>-/-</sup> 마우스 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 세포가 증식 반응을 마운트(mount)할 수는 있지만, 생리학적 수의 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 존재하에 증식을 마운트하는 것은 할 수 없다. 따라서, GITRL은 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 세포 및 작동 T 세포(예를 들어, CD8<sup>+</sup> T 세포)에 대해 중요 신호를 제공하고, 이들에게 면역반응 초기의 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-매개 조절에 대해 저항성을 부여한다. 염증성 자극에 의한 GITRL의 하류조절은 예를 들어 암 또는 염증성 손상과정에서 억제활성에 대한 작동 T 세포의 감수성을 증가시킬 수 있다.

이로 인해, 본 발명은 인간 GITRL에 대한 신규한 마우스 동족체의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 제공한다. 인간 GITRL은 동정되었다(Kwon et al. (1999) J. Biol. Chem. 274: 6056-61; Gurney et al. (1999) Curr. Biol. 9: 215-18); 더욱이, 최근 수많은 그룹이 뮤린 GITR 리간드의 클로닝에 대해 보고하고 있다(Kim et al. , 2003; Tone et al. , 2003; Yu et al., 2003).

한 측면으로, 본 발명은 인간 GITRL에 대한 신규한 마우스 동족체의 뉴클레오티드, 아미노산 서열 및 그의 활성단편 및/또는 융합 단백질을 제공한다. 본 발명의 GITRL 폴리뉴클레오티드는 GITRL의 발현을 조절하는 폴리뉴클레오티드(예를 들어, GITR의 발현을 상향조절할 수 있는 GITRL 폴리뉴클레오티드 포함 발현 벡터, 및/또는 GITRL의 발현을 하향조절하는 안티센스 및/또는 RNAi GITRL 폴리뉴클레오티드)를 포함한다. 세포 및/또는 동물에서 GITRL의 발현을 조절하기 위한 그러한 폴리뉴클레오티드의 용도가 또한 제공된다. GITRL 폴리뉴클레오티드에 추가하여, 본 발명은 또한 예를 들면 GITRL을 흡내낼 수 있는(즉, 작동 T 세포에서 GITR 활성을 유도하는) GITRL의 활성 단편 및/또는 GITRL 융합 단백질과 같은 다른 작용성 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 또한, GITRL 폴리뉴클레오티드를 함유하는 트랜스포메인션된 세포 및 트랜스제닉 동물이 본 발명의 범위에 속한다.

다른 측면으로, 본 발명의 신규한 뮤린 GITRL 폴리펩티드에 대해 특이적으로 결합하는(즉, 인간 GITRL에 결합하지 않는) 항체가 제공된다. 보다 구체적으로, GITRL의 활성을 저해하는 중화 항체(예를 들어, GITRL의 GITR에 대한 결합을 차단)가 제공된다; 이러한 항체는 GITRL의 활성을 중화한다고 말할 수 있다(즉, GITRL을 무력하게 한다). 본 발명의 중화항체는 GITRL 활성을 저해하는 GITRL에 대한 비인간 및 인간 항체 및 본 발명에 따른 GITRL 활성 저해 비인간 항체의 키메라된 및/또는 인간화된 항체를 포함한다. 또한, 항체의 반감기, 안정성 또는 친화성을 증가시킬 수 있는 또는 항체의 작동 기능을 수정할 수 있는 하나 이상의 변이를 가질 수 있는 길항성 항체가 본 발명의 범위내에 속한다.

본 발명의 또 다른 측면은 GITRL 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드(그것의 인간 동족체를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다)가 세포, 기관 또는 개체내의 GITR 활성을 조절할 수 있는 화합물의 동정에 사용되는 스크리닝 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 동정된 화합물의 투여전 및 투여후에 환자의 T 세포수를 검사함으로써 동정된 화합물의 활성을 분석하는 방법을 제공한다. 추가로, 본 발명은 동정된 화합물을 이용하여 환자 또는 개체를 치료하는 방법을 제공한다.

GITR 활성을 조절할 수 있는 시험 화합물(예를 들어, GITR 작용제 또는 GITR 길항제)을 제공하는 것 외에, 본 발명은 예를 들어 자가면역 질병, 염증성 질병, 이식거부, 암 및 전염병과 같은 면역계의 조절곤란과 관련된 질병의 진단, 예후, 진행 감시 및 치료를 위한 신규한 방법을 제공한다.

GITRL 및 관련 분자를 이용하는 본 발명에 따른 방법이 또한 여기에 개시되어 있고, 면연계의 조절곤란과 관련된 질병의 치료학적 치료를 위한 작용성 GITR 분자(즉, GITRL 폴리뉴클레오티드, GITRL 폴리펩티드, 그의 활성 단편 및/또는 그의 융합 단백질, 작용성 저분자 및 작용성 GITR 항체) 및 길항성 GITR 분자(즉, GITRL 저해 폴리뉴클레오티드, 중화 GITR 항체, 중화 GITRL 항체, 길항성 및 GITR 융합 단백질)를 포함한다. 예를 들어, GITR 길항제(예를 들어, 중화 항-GITRL 항체)를 개체에 투여하는 것을 포함하는 자가면역 질병, 이식거부, 및/또는 염증성 질병으로 진단되거나 또는 위험이 있는 개체를 치료하는 방법을 제공한다.; 또한, GITR 작용제(예를 들어, GITRL 또는 그의 작용성 융합 단백질)을 투여하는 것을 포함하는 암 또는 전염병으로 진단되거나 또는 위험이 있는 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 대체적으로, GITR 작용제 (예를 들어,GITRL(그의 작용성 융합 단백질을 포함)) 또는 GITR 길항제 (예를 들어, 중화 항-GITRL 항체 또는 길항성 GITR 융합 단백질)을 투여함으로써 각각 T 세포의 증식을 유도하거나 저해하는 방법이 제공된다. 유사하게, GITR 작용제 (예를 들어,GITRL(그의 작용성 융합 단백질을 포함)) 또는 GITR 길항제(예를 들어, 중화 항-GITRL 항체)를 각각 투여하는 것을 포함하는 CD4+CD25+ T 세포의 존재하에 T 세포의 억제를 차단하거나 증가시키는 방법이 또한, 제공된다. GITRL 폴리펩티드 및 관련 분자(그의 작용성 융합 단백질을 포함)으로 처리된 T 세포 집단은 본 발명의 범위내에 속하고, 암 또는 전염병의 치료방법으로 개체에 투여될 수 있다. 자가면역 질병, 염증성 질병 또는 이식거부로 진단되거나 또는 위험이 있는 개체를 GITR 활성을 감소시키는 길항성 화합물로 치료하는 방법, 및 암 또는 전염병으로 진단되거나 또는 위험이 있는 개체를 GITR 활성을 증가시키는 작용성 화합물로 치료하는 방법을 포함하는 다른 치료방법이 제공된다. 본 발명의 GITRL 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드 및 관련 분자(작용성 GITRL 융합 단백질 및 길항성 항-GITRL 항체를 포함)를 포함하는 약제학적 조성물 (예를 들어 백신 보강제)가 또한 본 발명의 범위내에 속한다. 본 발명에 따른 방법은 GITRL 및 GITR (마우스 GITRL, GITR 및 그의 동족체를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다)에 관한 것이다; 구체적으로 인간 GITRL 및 GIRL가 이러한 동족체에 포함된다.

### GITRL 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드

본 발명은 신규한 GITR 리간드(GITRL)에 관한 신규한 분리 및 정제된 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드를 제공한다. 본 발명의 유전자, 폴리뉴클레오티드, 단백질 및 폴리펩티드를 마우스 GITRL 및 그의 동족체를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.

예를 들어, 본 발명은 뮤린 GITRL을 코딩하는 분리 및 정제된 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 본 발명의 바람직한 DNA 서열은 게놈, cDNA 및 화학적으로 합성된 DNA 서열을 포함한다.

이러한 신규 리간드를 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열 (마우스 GITRL cDNA)이 서열번호:1에 나와 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 또한 서열번호:1 또는 그의 상보적 서열에 긴장 상태에서 혼성화하는 및/또는 풀-렌스(full-length) 마우스 GITRL 중에서 실질적으로 생물학적 활성을 보유하는 폴리펩티드(즉, 활성단편)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드는 또한 적어도 21개의 연속된 뉴클레오티드를 포함하는 서열번호:1의 서열 중 연속 부분을 포함한다.

이런 신규 리간드를 코딩하는 게놈 DNA의 뉴클레오티드 서열(마우스 GITRL 게놈 유전자)은 서열번호:3에 나와 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 또한 서열번호:3 또는 그의 상보적 서열에 긴장 상태에서 혼성화하는 및/또는 풀-렌스

(full-length) 마우스 GITRL 중에서 실질적으로 생물학적 활성을 보유하는 폴리펩티드(즉, 활성단편)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드는 또한 적어도 21개의 연속된 뉴클레오티드를 포함하는 서열 번호:3의 서열 중 연속 부분을 포함한다.

마우스 GITRL의 아미노산 서열이 서열번호:2에 나와 있다. 또한, 본 발명의 폴리펩티드는 적어도 7개의 연속된 아미노산을 포함하는 서열번호:2의 서열 중 연속 부분을 포함한다. 본 발명의 바람직한 폴리펩티드는 서열번호:2의 서열 중 폴-렌스 마우스 GITRL의 실질적인 생물학적 활성을 보유하는 임의의 연속된 부분을 포함한다. 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 위에서 서술한 뮤린 기원의 폴리뉴클레오티드외에 서열번호:2의 아미노산 서열 또는 그의 연속 부분을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 위에서 서술한 폴리뉴클레오티드와는 잘 알려진 유전자 코드의 축퇴만이 상이하다.

본 발명의 분리된 폴리뉴클레오티드는 혼성화 프로브 및 개시된 폴리뉴클레오티드를 코딩하는 것과 동일하거나 유사한 서열을 가지는 핵산을 확인하거나 분리하기 위한 프라이머로 사용될 수 있다. 핵산의 확인 및 분리에 사용되는 혼성화 방법은 폴리머라제 체인 리액션(PCR), 서던(southern) 혼성화, 인 시츄(in situ) 혼성화, 노던(nothern) 혼성화를 포함하고, 당업자에게 잘 알려져 있다.

혼성화 반응은 다른 긴장상태에서 수행될 수 있다. 혼성화 반응의 긴장은 어느 두개의 핵산 분자가 서로 혼성화하는 난이도를 포함한다. 각 혼성화 폴리뉴클레오티드는 대응하는 폴리뉴클레오티드는데 바람직하게는 감소된 긴장상태에서, 보다 바람직하게는 긴장상태에서, 가장 바람직하게는 고도의 긴장상태에서 혼성화한다. 긴장상태의 예는 하기 표1에 있다: 고도의 긴장상태는 예를 들어 적어도 상태 A-F와 같은 상태를 말하고; 긴장상태는 예를 들어 적어도 상태 G-L과 같은 상태를 말하며; 감소된 긴장상태는 예를 들어 적어도 상태 M-R과 같은 상태를 말한다.

[표1]

긴장 조건	폴리뉴클레오티드 하이브리드	혼성 길이 (bp) <sup>1</sup>	혼성화 온도 및 완충액 <sup>2</sup>	세척 온도 및 완충액 <sup>2</sup>
A	DNA:DNA	> 50	65°C; 1X SSC-또는- 42°C; 1X SSC, 50% 포름아미드	65°C; 0.3X SSC
B	DNA:DNA	< 50	T <sub>B</sub> *; 1X SSC	T <sub>B</sub> *; 1X SSC
C	DNA:RNA	> 50	67°C; 1X SSC-또는- 45°C; 1X SSC, 50% 포름아미드	67°C; 0.3X SSC
D	DNA:RNA	< 50	T <sub>D</sub> *; 1X SSC	T <sub>D</sub> *; 1X SSC
E	RNA:RNA	> 50	70°C; 1X SSC-또는- 50°C; 1X SSC, 50% 포름아미드	70°C; 0.3X SSC
F	RNA:RNA	< 50	T <sub>F</sub> *; 1X SSC	T <sub>F</sub> *; 1X SSC
G	DNA:DNA	> 50	65°C; 4X SSC-또는- 42°C; 4X SSC, 50% 포름아미드	65°C; 1X SSC
H	DNA:DNA	< 50	T <sub>H</sub> *; 4X SSC	T <sub>H</sub> *; 4X SSC
I	DNA:RNA	> 50	67°C; 4X SSC-또는- 45°C; 4X SSC, 50% 포름아미드	67°C; 1X SSC
J	DNA:RNA	< 50	T <sub>J</sub> *; 4X SSC	T <sub>J</sub> *; 4X SSC
K	RNA:RNA	> 50	70°C; 4X SSC-또는- 50°C; 4X SSC, 50% 포름아미드	67°C; 1X SSC
L	RNA:RNA	< 50	T <sub>L</sub> *; 2X SSC	T <sub>L</sub> *; 2X SSC
M	DNA:DNA	> 50	50°C; 4X SSC-또는- 40°C; 6X SSC, 50% 포름아미드	50°C; 2X SSC
N	DNA:DNA	< 50	T <sub>N</sub> *; 6X SSC	T <sub>N</sub> *; 6X SSC
O	DNA:RNA	> 50	55°C; 4X SSC-또는- 42°C; 6X SSC, 50% 포름아미드	55°C; 2X SSC
P	DNA:RNA	< 50	T <sub>P</sub> *; 6X SSC	T <sub>P</sub> *; 6X SSC
Q	RNA:RNA	> 50	60°C; 4X SSC-또는- 45°C; 6X SSC, 50% 포름아미드	60°C; 2X SSC
R	RNA:RNA	< 50	T <sub>R</sub> *; 4X SSC	T <sub>R</sub> *; 4X SSC

<sup>1</sup> 혼성길이는 혼성화 폴리뉴클레오티드에서 혼성화된 구역으로 예측되는 것이다. 폴리뉴클레오티드가 미지 서열의 표적 폴리뉴클레오티드에 혼성화하는 경우 혼성길이는 혼성화된 폴리뉴클레오티드의 것으로 추정된다. 알고 있는 서열의 폴리뉴클레오티드가 혼성화하는 경우 혼성길이는 폴리뉴클레오티드의 서열을 정령하고, 최적의 서열 상보성 구역을 확인함으로써 결정된다.

<sup>2</sup>SSPE (1xSSPE는 0.15 M NaCl, 10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 및 1.25mM EDTA, pH 7.4)는 혼성화 및 세척 완충액에서 SSC (1xSSC는 0.15M NaCl 및 15mM 소듐 시트레이트)를 대체할 수 있고; 세척은 혼성화가 완료된 뒤 15분가 수행된다.

50 염기쌍 길이 미만의 혼성에 예상되는 혼성화 온도는 혼성물의 융점 (T<sub>m</sub>)보다 5-10°C 낮아야 하고, T<sub>m</sub>은 다음 식에 의해 결정된다. 18 염기쌍 길이 미만의 혼성에 대해  $T_m(\text{C}^\circ) = 2(A + T \text{ 염기의 수}) + 4(G + C \text{ 염기의 수})$ . 18 및 49 염기쌍 길이 상이의 혼성에 대해  $T_m(\text{C}^\circ) = 81.5 + 16.6 (\log_{10} \text{Na}^+) + 0.41 (\% G + C) - (600/N)$ 이다: 여기에서, N은 혼성상태에 있는 염기의 수이고, Na는 혼성화 완충액에 있는 소듐 이온의 농도이다(1x SSC에서  $\text{Na}^+ = 0.165 \text{ M}$ ).

폴리뉴클레오티드 혼성화에 대한 긴장상태의 추가적인 예가 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Chs. 9 & 11, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), and Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, Sects. 2.10 & 6.3-6.4, John Wiley & Sons, Inc. (1995))에 있으며 여기에 참조자료로 포함되어 있다.

본 발명의 분리된 폴리뉴클레오티드는 개시된 폴리뉴클레오티드의 대립 변이체를 코딩하는 서열을 포함하는 분리된 DNA를 확인 및 분리하기 위한 혼성화 프로브 및 프라이머로 사용될 수 있다. 대립 변이체는 개시된 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 폴리펩티드와 동일하거나 상당히 유사한 폴리펩티드를 코딩하는 개시된 폴리뉴클레오티드의 자연 발생적인 다른 형태이다. 바람직하게 대립 변이체는 개시된 폴리뉴클레오티드와 적어도 90% 서열 동일성(보다 바람직하게는 적어도 95% 동일성; 가장 바람직하게는 적어도 99% 동일성)을 가진다.

또한, 본 발명의 분리된 폴리뉴클레오티드는 개시된 폴리뉴클레오티드에 상동적인 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 포함하는 분리된 DNA를 확인 및 분리하기 위한 혼성화 프로브 및 프라이머로 사용될 수 있다. 이러한 상동물은 개시된 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드의 종과 다른 종으로부터 분리된 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드이거나 동일한 종의 것일 수 있지만, 개시된 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드와 상당한 서열 상동성을 갖는다. 바람직하게는 폴리뉴클레오티드 상동물은 개시된 폴리뉴클레오티드와 적어도 50% 서열 동일성(보다 바람직하게는 적어도 75% 동일성; 가장 바람직하게는 적어도 90% 동일성)을 가지고, 폴리펩티드 상동물은 개시된 폴리펩티드와 적어도 30% 서열 동일성(보다 바람직하게는 적어도 45% 동일성; 가장 바람직하게는 적어도 60% 동일성)을 가진다. 바람직하게, 개시된 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드의 상동물은 포유동물로부터 분리된 것이다.

또한, 본 발명의 분리된 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 폴리펩티드를 발현하는 세포 및 조직, 발현 조건을 확인 및 분리하기 위한 혼성화 프로브 및 프라이머로 사용될 수 있다.

추가적으로, 본 발명의 분리된 폴리뉴클레오티드는 세포 또는 기관에서 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 대응하는 유전자의 발현을 변경(즉, 증가, 감소 또는 수정)하는데 사용될 수 있다. 이러한 대응 유전자는 본 발명의 cDNA(예를 들어, 서열번호:1)가 유래되는 mRNA를 제조하기 위해 전사되는 본 발명의 계놈 DNA 서열(예를 들어, 서열번호:3)이다.

본 발명에 따른 유전자(마우스 GITRL 및 그의 상동물을 포함하지만 이에 한정되는 않음)의 변형된 발현은 세포 또는 기관에서 안티센스 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 안티센스 GITRL 핵산 분자) 및 본 발명의 유전자로부터 전사되는 mRNA에 결합 및/또는 절단하는 리보짐(ribozyme)과 같은 다양한 저해 폴리뉴클레오티드의 사용을 통해 성취될 수 있다(예를 들어, Galderisi et al. (1999) J. Cell Physiol. 111 : 251-57; Sioud (2001) Curr. Mol. Med. 1: 575-88를 참조). 이러한 저해 폴리뉴클레오티드는 자가면역 질병, 염증성 질병, 이식거부, 및 유사 또는 관련 질병의 예방 또는 치료에 유용하다.

본 발명의 안티센스 폴리뉴클레오티드 또는 리보짐은 본 발명에 따른 유전자의 전체 코딩 스트랜드에 상보적일 수 있거나, 그의 일부에만 상보적일 수 있다. 대체적으로, 안티센스 폴리뉴클레오티드 또는 리보짐은 본 발명에 따른 유전자의 코딩 스트랜드의 비코딩 영역에 상보적일 수 있다. 안티센스 폴리뉴클레오티드 또는 리보짐은 당업계에 잘 알려진 방법을 이용하여 화학 합성 및 효소적 리게이션(ligation)을 이용하여 제조될 수 있다. 화학적으로 합성된 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오시드 결합은 뉴클레아제-매개 분해에 저항하는 능력을 증가시키고, 그들의 서열 특이성을 증가시키기 위해 수정될 수 있다. 그러한 결합 수정은 포스포로티오에이트, 메틸포스포네이트, 포스포로아미데이트, 보라노포스페이트, 모르폴리노 및 웹티드 핵산(PNA) 결합을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다(Galderisi et al., supra ; Heasman (2002) Dev. Biol. 243: 209-14; Micklefield (2001) Curs : Med. Chem. 8:1157-79). 대체적으로, 이러한 분자는 안티센스(즉, 역) 오리엔테이션에 본 발명의 폴리뉴클레오티드가 서브클론된 발현 벡터를 이용하여 생물학적으로 제조될 수 있다.

또한, 본 발명의 저해 폴리뉴클레오티드는 이중 DNA 나선의 메이저 그루브에 높은 특이성 및 친화성을 가지고 결합하는 삼중나선-형성 올리고뉴클레오티드(TFOs)를 포함한다. 본 발명에 따른 유전자의 발현은 상보적 TFOs를 유전자의 조절 구역(즉, 프로모터 및/또는 인핸서 서열)에 표적화하여 유전자의 전자를 차단하는 삼중 나선 구조를 형성하게 함으로써 저해될 수 있다.

본 발명의 한 구체예에서, 본 발명의 저해 폴리뉴클레오티드는 짧은 간섭 RNA(siRNA) 분자이다(예를 들어, siRNA GITRL 핵산분자). 이러한 siRNA 분자는 짧고(바람직하게는 19~25 뉴클레오티드; 가장 바람직하게는 19 또는 21 뉴클레오티드), 표적 mRNA의 서열-특이적 분해를 일으키는 이중-가닥 RNA 분자이다. 이런 분해는 RNA 간섭 (RNAi)로 알려져 있다(예를 들어, Bass (2001) *Nature* 411: 428-29). 처음에 저급 기관에서 확인된 RNAi는 포유동물 세포에 효과적으로 적용되었고, 최근에는 Fas mRNA에 대해 표적화된 siRNA로 처리된 마우스에서 전격감염이 예방된다는 것을 보였다 (Song et al. (2003) *Nature Med.* 9:347-51). 추가로, 경막내에 전달된 siRNA가 래트의 두 가지 모델(작용제-유도 통증 모델 및 신경병성 통증 모델)에서 통증 반응을 차단하는 것으로 최근 보고되었다(Dorn et al. (2004) *Nucleic Acids Res.* 32 (5): e49).

본 발명의 siRNA 분자는 두개의 상보적인 단일-가닥 RNA 분자(그중의 하나는 표적 mRNA의 부분에 일치함)를 함께 어닐링(anneling)함으로써 제조될 수 있고(Fire et al., U. S. Patent No. 6,506,559), 또는 스스로 접혀 필수적인 이중-가닥 부분을 형성하는 단일 헤어핀 RNA 분자를 통하여 제조될 수 있다(Yu et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 6047-52). siRNA 분자는 화학적으로 합성될 수 있고(Elbashir et al. (2001) *Nature* 411: 494-98), 또는 단일-가닥 DNA 주형을 이용하여 시험관내 전사를 통하여 제조될 수 있다(Yu et al., supra). 대체적으로, siRNA 분자는 센스 및 암티센스 siRNA 서열을 함유하고 있는 발현 벡터를 이용하여 생물학적으로 일과적으로(transiently)(Yu et al., supra ; Sui et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 5515-20) 또는 안정하게 (Paddison et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:1443-48) 제조될 수 있다. 최근, siRNA로 더 가공되는 헤어핀 RNA를 발현하는 아데노바이러스 벡터를 이용하여 일차 인간 세포에서 표적 mRNA의 수준을 효과적으로 서열-특이적 방식에 의해 감소시킬 수 있음이 알려졌다(Artz et al. (2003) *Genome Res.* 13: 2325-32).

본 발명의 폴리뉴클레오티드에 대해 표적화된 siRNA는 당업계에 잘 알려진 기준에 디초하여 설계될 수 있다(예를 들어, Elbashir et al. (2001) *EMBO J.* 20: 6877-88). 예를 들어, 표적 mRNA의 표적 세그먼트는 바람직하게는 AA(가장 바람직함), TA, GA 또는 CA로 시작해야 하며; siRNA 분자의 GC 비율은 바람직하게는 45-55%여야 하며; siRNA 분자는 바람직하게는 열에서 세 개의 동일한 뉴클레오티드를 포함해서는 안되고; siRNA 분자는 바람직하게는 여에서 일곱 개의 혼합된 G/C를 함유해서는 안되며; 표적 세그먼트는 바람직하게는 표적 mRNA의 ORF 구역에 위치해야 하고 바람직하게는 ATF 개시후에 적어도 75 염기쌍이어야 하며, 종결 고콘 전에 적어도 75 염기쌍을 가져야 한다. 이러한 기준에 기초하여, 또는 다른 공지된 기준에 기초하여(예를 들어, Reynolds et al. (2004) *Nature Biotechnology* 22: 326-30), 본 발명의 mRNA 폴리뉴클레오티드에 표적화된 본 발명의 siRNA 분자는 당업자에 의해 설계될 수 있다.

기관에서 본 발명에 따른 유전자의 변형된 발현은 게놈에 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 도입한 비인간 트랜스제닉 동물을 만들었으므로서 또한 성취될 수 있다. 그러한 트랜스제닉 동물은 본 발명의 유전자에 대해 복수개의 카피(즉, 트랜스진(transgene))를 가지는 동물을 포함한다. 조직-특이적 조절 서열(들)은 특정 세포에 대해 또는 특정 발달 단계에서 본 발명에 따른 폴리펩티드의 발현을 지시하는 트랜스진에 작동가능하게 연결될 수 있다. 마우스와 같은 특정 동물에 대해 배아 조작 및 마이크로인젝션을 통하여 트랜스제닉 동물을 생성하는 방법은 일반적이고 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, Bockamp et al., *Physiol Genomics*, 11: 115-32 (2002)).

기관에서 본 발명에 따른 유전자의 변형된 발현은 또한 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 대응하는 내재 유전자가 외래 폴리뉴클레오티드 서열의 삽입에 의해 파괴된 동물을 만들었으므로서 성취될 수 있다(즉, 녹아웃(knockout) 동물). 내재 유전자의 코딩 영역은 파괴되고, 비기능 단백질을 생성하게 된다. 대체적으로, 내재 유전자에 대한 상류 조절 영역이 파괴되거나 다른 조절 요소로 대체됨으로써 기능 단백질의 변형된 발현을 일으킬 수 있다. 상동성 재조합을 포함하는 녹아웃 동물의 제조방법이 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, Wolfer et al., *Trends Neurosci.*, 25: 336-40 (2002)).

본 발명의 분리된 폴리뉴클레오티드는 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결되거나 및/또는 본 발명의 폴리펩티드의 재조합 생산을 위한 발현벡터에 리게이션될 수 있다. 재조합 단백질을 발현시키는 일반적인 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 그러한 재조합 단백질은 면역계의 조절곤란으로부터 발생하는 질병의 치료에 유용한 수용성 형태로 발현될 수 있다; 그런 질병은 예를 들어 암, 전염병 및, 자가면역 질병, 염증성 질병과 이식거부를 포함한다. 자가면역 질병 및 염증성 질병 류마티스 관절염, 뇌척수염, 골관절염, 다발 경화증, 자가면역 위염, 전신홍반 루프스, 건선과 다른 염증성 피부병, 타입 I 당뇨병, 천식, 알레르기, 및 크론병과 궤양 대장염을 포함하는 염증성 대장 질병을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.

여기에 사용되는 발현벡터는 그것에 연결된 다른 핵산 분자를 전달할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 벡터의 한가지 형태는 플라스미드이고, 이는 추가적인 DNA 세그멘트가 리게이션 될 수 있는 환상의 이중 나선 DNA 환을 지칭한다. 벡터의 다른 형태는 바이러스 벡터이고, 바이러스 게놈에 추가적인 DNA 세그멘트가 리게이션될 수 있다. 어떤 벡터는 그들이 도입된 숙주세포에서 자가 복제를 할 수 있다(예를 들어, 세균 복제원점을 가지는 세균 벡터 및 에피솜 포유동물 벡터). 다른 벡터(예를 들어, 비에피솜 포유동물 벡터)는 숙주세포에 도입될 때 숙주세포의 게놈에 삽입될 수 있고, 이에 의해 숙주 게놈과 함께 복제될 수 있다. 또한, 어떤 벡터는 그들이 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 그러한 벡터는 여기에서 재조합 발현벡터(또는 단순한, 발현벡터)로 지칭된다. 일반적으로 재조합 DNA 기술을 이용한 발현벡터는 종종 플라스미드 형태이다. 플라스미드가 가장 일반적으로 사용되는 벡터 형태이므로 본 명세서에서 플라스미드 및 벡터는 상호 교환적으로 사용된다. 그러나, 본 발명은 동등한 기능을 제공하는 바이러스 벡터(예를 들어, 복제 결손 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-연관 바이러스)와 같은 다른 형태의 발현벡터를 포함한다.

한 구체예에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 GITR 작용제(예를 들어, GITRL 폴리펩티드, 그의 활성단편 및/또는 융합 단백질을 포함)를 생성하는데 사용될 수 있고, 이 또한 본 발명의 범위내에 속한다. 예를 들어, GITRL 폴리펩티드 또는 그의 활성 단편은 제2 모이어티(예를 들어, 이뮤노글로불린 또는 그의 단편(예를 들어, 그의 Fc 결합 단편))에 융합될 수 있다. 어떤 구체예에서, 제1 폴리펩티드는 풀-렌스 GITRL 폴리펩티드를 포함한다. 대체적으로 제1 폴리펩티드는 풀-렌스 GITRL 폴리펩티드 보다 작은 것을 포함할 수 있다. 추가적으로 GITRL의 수용성 형태가 “링커(linker)” 서열을 통하여 이뮤노글로불린의 Fc 부분에 융합될 수 있다. 글루타티온-S-트랜스퍼라제 (GST), Lex-A, 티오레독신 (TRX) 또는 말토오스-결합 단백질 (MBP)와 같은 다른 융합 단백질이 또한 사용될 수 있다.

융합 단백질은 GITRL 또는 GITRL 단편을 제2 모이어티에 연결시키는 링커 서열을 추가적으로 포함할 수 있다. 그러한 링커 서열의 사용은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 융합 단백질은 약 2-20, 보다 바람직하게는 10 미만의 아미노산 길이를 가지는 웨티드 링커와 같은 웨티드 링커를 포함할 수 있다. 한 구체예에서, 웨티드 링커는 2 아미노산 길이일 수 있다.

한 구체예에서, 융합 단백질은 이종의 신호 서열(즉, GITRL 핵산에 의해 코딩되는 폴리펩티드에 존재하지 않는 폴리펩티드 서열)을 그의 N-말단에 포함한다. 예를 들어, 다른 단백질에서 유래한 신호 서열은 GITRL 폴리펩티드(그의 활성단편 및/또는 융합 단백질을 포함)에 융합될 수 있다. 어떤 숙주 세포(예를 들어, 포유동물 숙주세포)에서, GITRL의 발현 및/또는 분비는 이종 신호 서열을 사용하여 증가될 수 있다.

융합 단백질에 포함될 수 있는 신호 웨티드는 MKFLVNVALVFMWYISYIYA (서열번호:11)이다. 바람직하다면, 하나 이상의 아미노산이 GITRL 모이어티를 포함하는 제1 폴리펩티드 모이어티 및 제2 폴리펩티드 모이어티에 추가로 삽입될 수 있다. 제2 폴리펩티드는 바람직하게는 수용성이다. 어떤 구체예에서, 제2 폴리펩티드는 연결된 폴리펩티드의 반감기(예를 들어, 혈청 반감기)를 증가시킨다. 어떤 구체예에서, 제2 폴리펩티드는 융합 폴리펩티드와 제2 GITRL 폴리펩티드의 회합을 촉진시킨는 서열을 포함한다. 바람직한 구체예에서, 제2 폴리펩티드는 적어도 이뮤노글로불린 폴리펩티드의 영역을 포함한다. 이뮤노글로불린 융합 폴리펩티드는 당업계에 잘 알려져 있고, 예를 들어 US Patent Nos. 5,516,964; 5,225,538; 5,428,130; 5,514,582; 5,714,147; 및 5,455,165에 기재되어 있으며, 여기에 참고자료의 이들의 전체 내용이 포함되어 있다.

본 발명의 키메라 또는 융합 단백질은 표준 재조합 DNA 기술에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 다른 폴리펩티드 서열을 코딩하는 DNA 단편은 예를 들어 리게이션을 위해 둔단(blunt-ended)엔디드 또는 엇갈림단(stagger-ended) 말단, 적당한 말단 제공을 위한 제한효소 소화, 적당한 점착종단으로 채움, 원치 않는 결합을 피하기 위한 알카리성 포스파타제 처리, 효소적 리게이션을 채용하는 통상적인 기술에 따라 인-프레임(in-frame)으로 서로 리게이션될 수 있다. 다른 구체예에서, 융합 유전자는 자동화된 DNA 합성장치를 포함하는 통상적인 기술에 의해 합성될 수 있다. 대체적으로, 유전자 단편의 PCR 증폭은 순차적으로 어닐링되고 키메라 유전자 서열을 생성하기 위해 재 증폭되는 두개의 연속적인 유전자 단편간에 상보적 겹침을 야기하는 앵커 프라이머를 이용하여 수행될 수 있다(예를 들어, Ausubel et al. (Eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992 참조). 더욱이, 융합 모이어티를 코딩하는 많은 발현 벡터가 시판되고 있다(예를 들어, 이뮤노글로불린 중쇄의 Fc 영역). GITRL-코딩 핵산은 융합 모이어티가 이뮤노글로불린 단백질에 인-프레임으로 연결되게 하기 위해 그러한 발현벡터내로 클론될 수 있다. 어떤 구체예에서, GITRL 융합 폴리펩티드는 디머 또는 트리머와 같은 올리고머로 존재한다.

수많은 세포주가 본 발명의 폴리펩티드의 재조합 발현을 위한 숙주세포로 적합할 수 있다. 포류동물 숙주 세포주는 예를 들어 COS 세포, CHO 세포, 293T 세포, A431 세포, 3T3 세포, CV-1 세포, HeLa 세포, L 세포, BHK21 세포, HL-60 세포, U937 세포, HaK 세포, Jurkat 세포 및 일차 조직 및 일차 체외 이식 조직의 시험관내 배양으로부터 유래된 세포주를 포함한다.

대체적으로, 본 발명의 폴리펩티드를 효모와 같은 저급 진핵생물 또는 원핵생물에서 재조합적으로 제조하는 것이 가능하다. 잠재적으로 적합한 효모주는 *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* 주, 및 *Candida* 주를 포함한다. 잠재적으로 적합한 세균주는 *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, 및 *Salmonella typhimurium*를 포함한다. 본 발명의 폴리펩티드가 효모 또는 세균에서 만들어진다면, 기능성을 얻기 위해 예를 들어 적당한 자리에 인산화 또는 글리코실화에 의해 그들을 수정하는 것이 필요하다. 그러한 공유적 결합은 잘 알려진 화학적 또는 효소적 방법을 사용하여 수행될 수 있다.

세균에서의 발현은 재조합 단백질을 포함한 인클루전 바디를 형성시킬 수 있다. 따라서, 활성 또는 보다 활성 물질을 제조하기 위해서는 재조합 단백질의 재접힘이 필요할 수 있다. 세균 인클루전 바이로부터 올바르게 접힌 이종 단백질을 얻는 수 많은 방법이 당업계에 알려져 있다. 이러한 방법은 일반적으로 단백을 인클루전 바이로부터 용해시키고, 무질서 유발제를 이용하여 단백질을 완전히 변성하는 것을 포함한다. 단백질의 일차 아미노산 서열에 시스테인 잔기가 존재하는 경우에 이황화 결합의 올바른 형성을 허용하는 조건(산화환원계)에서 재접힘을 수행하는 것이 때때로 필요하다. 재접힘에 관한 일반적인 방법은 Kohno (1990) *Meta. Enzymol.* 185: 187-95. EP 0433225에 개시되어 있고, 특허출원 U.S. Ser. No. 08/163,877는 적절한 다른 방법에 대해 기재하고 있다.

본 발명의 폴리펩티드는 또한 본 발명의 분리된 폴리뉴클레오티드를 baculovirus 벡터와 같은 하나 이상의 곤충 발현 벡터 중의 적당한 조절 서열에 작동가능하게 연결하고, 곤충 세포 발현계를 채용함으로써 재조합적으로 제조될 수 있다. baculovirus/Sf9 발현계를 위한 물질 및 방법은 키트 형태로 시판되고 있다(예를 들어, MaxBac kitR, Invitrogen, Carlsbad, CA).

GITR 작용제(예를 들어, GITRL 단백질, 그의 활성단편 및/또는 융합 단백질)는 원하는 단백질을 발현하는데 필요한 배양 조건에서 트랜스포메이션된 숙주 세포를 배양함으로써 제조될 수 있다. 적당한 숙주세포에서의 재조합 발현 후에, 본 발명의 폴리펩티드는 젤 여과 및 이온 교화 크로마토그래피와 같은 공지의 정제 방법을 이용하여 배양 배지 또는 세포 추출물로부터 정제될 수 있다. GITR 작용제(예를 들어, GITRL 단백질, 그의 활성단편 및/또는 융합 단백질)의 수용성 형태가 조건 배지로부터 정제될 수 있다. 예를 들어 본 발명의 GITRL 단백질의 막-부착 형태는 전체 막분획을 발현 세포로부터 준비하고, 막을 Triton X-100과 같은 비이온성 계면활성제로 추출함으로써 정제될 수 있다. 정제는 본 발명의 폴리펩티드에 결합하는 것으로 알려진 물질을 이용한 친화 크로마토그래피를 또한 포함할 수 있다. 이러한 정제 방법은 또한 본 발명의 폴리펩티드를 천연 소스를 포함하는 다른 소스로부터 분리하는데 사용될 수 있다. 전술한 바와 같이, GITR 작용제(예를 들어, GITRL 단백질, 그의 활성단편 및/또는 융합 단백질)는 또한 예를 들어 체세포 또는 배아세포가 GITR 작용제를 코딩하는 폴리펩티드 서열을 함유하는 것을 특징으로 하는 트랜스제닉 소, 염소, 돼지 또는 양의 우유 성분과 같은 트랜스제닉 동물의 생산물로서 발현될 수 있다.

GITR 작용제(예를 들어, GITRL 단백질, 그의 활성단편 및/또는 융합 단백질)을 정제하는데 사용될 수 있는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 본 발명의 GITRL 단백질은 예를 들어 Amicon 또는 Millipore Pellicon 초여과 유니트와 같은 시판중인 단백질 농축 필터를 이용하여 농축될 수 있다. 농축 단계 후에, 농축물은 젤 여과 매질과 같은 정제 매트릭스에 적용될 수 있다. 대체적으로, 음이온 교환수지는 예를 들어 펜던트 디에틸아미노에틸(DEAE) 또는 폴리에틸렌이민(PEI) 그룹을 가지는 매트릭스 또는 기질을 채용할 수 있다. 매트릭스는 아크릴아미드, 아가로스, 텍스트란, 세룰로오스 또는 단백질 정제에 일반적으로 사용되는 다른 형태일 수 있다. 대체적으로, 양이온 교환 단계가 채용될 수 있다. 적합한 양이온 교환기는 설포프로필 또는 카복시메틸 그룹을 포함하는 다양한 불용성 매트릭스를 포함한다. 설포프로필 그룹이 바람직하다(예를 들어, S-SepharoseR 컬럼). 배양 상청액으로부터 GITR 작용제(예를 들어, GITRL 단백질, 그의 활성단편 및/또는 융합 단백질)의 정제는 concanavalin A-agarose, heparin-toyopearlR 또는 Cibacrom blue3GA SepharoseR과 같은 치환 수지; 또는 페닐에테르, 부티에테르 또는 프로필에테르와 같은 수지를 이용하는 소수성 상호작용 크로마토그래피; 또는 면역친화 크로마토그래피에 대해 하나 이상의 컬럼 단계를 또한 포함할 수 있다. 최종적으로, 예를 들어 펜던트 메틸 또는 다른 지방족 그룹을 가지는 실리카겔과 같은 소수성 RP-HPLC 매질을 이용하는 하나 이상의 역-상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC) 단계가 GITRL 단백질을 더 정제하기 위해 채용될 수 있다. GITRL 단백질에 대한 항체를 포함하는 친화 컬럼이 또한 공지의 방법에 따라 정제에 이용될 수 있다. 또한, 전술한 정제 단계의 일부 또는 전부는 다양하게 조합되어 또는 다른 공지 방법과 함께 실질적으로 분리 및 정제된 재조합 단백질을 제공하기 위해 채용될 수 있다. 바람직하게는, 분리된 GITRL 단백질은 실질적으로 다른 포유동물 단백질이 없도록 정제된다.

대체적으로, GITR 작용제(예를 들어, GITRL 단백질, 그의 활성단편 및/또는 융합 단백질)는 정제를 촉진하는 형태로 또한 재조합 발현될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드는 말토오스-결합 단백질(MBP), 글루타티온-S-트랜스퍼라제(GST), 또는 티오로록신(TRX)과 같은 단백질과 융합물로서 발현될 수 있다. 그런 융합 단백질의 발현 및 정제를 위한 키트가 New England BioLabs (Beverly, MA), Pharmacia (Piscataway, NJ), 및 Invitrogen에서 각각 시판되고 있다. 또한, GITR 작

용제(예를 들어, GITRL 단백질, 그의 활성단편 및/또는 융합 단백질)에는 작은 항원결정인자가 부착될 수 있고, 항원결정 인자에 특이적인 항체를 이용하여 순차적으로 확인 및 정제될 수 있다. 바람직한 항원결정인자는 Eastman Kodak (New Haven, CT)에서 시판하는 FLAG 에피토프이다.

또한, GITR 작용제(예를 들어, GITRL 단백질, 그의 활성단편 및/또는 융합 단백질)는 공지된 일반적인 화학 합성에 의해 제조될 수 있다. 그런 폴리펩티드를 화학적으로 합성하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 그런 화학 합성 폴리펩티드는 천연의 정제된 폴리펩티드와 공통적인 생물학적 성질을 가질 수 있고, 따라서, 천연 폴리펩티드의 생물학적 활성 또는 면역학적 치환체로 채용될 수 있다.

GITR 작용제(예를 들어, GITRL 단백질, 그의 활성단편 및/또는 융합 단백질)는 개시된 폴리펩티드와 구조적으로 다른 분자(예를 들어, 약간 변형된 서열)를 또한 포함하지만, 그것은 개시된 폴리펩티드와 실질적으로 동일한 생화학적 성질을 가진다(예를 들어, 단지 기능적으로 비분질적인 아미노산 잔기만이 바뀐다). 그러한 분자는 자연 발생적인 대립 변이체 및 변형, 치환, 대체, 삽입 또는 결실을 포함하는 고도로 가공된 변이체이다. 그런 변형, 치환, 대체, 삽입 또는 결실을 위한 기술은 당업자에게 잘 알려져 있다. 어떤 구체예에서, GITRL 폴리펩티드 모이어티는 자연 발생 GITRL 서열(야생형)에 변이를 가지는 변이체 GITRL 폴리펩티드로서 제공되고, GITRL 서열에게 단백가수분해에 대해 더 많은 저항성(비변이 서열에 대해 상대적임)을 야기한다.

GITR 작용제(예를 들어, GITRL 단백질, 그의 활성단편 및/또는 융합 단백질)의 제조를 위해 여기에 개시된 방법은 GITR 길항제(특히 수용성 GITR 단백질, 그의 활성단편 및/또는 융합 단백질)를 제조하는데도 사용될 수 있다. 당업자는 GITR 길항제(예를 들어, 수용성 GITR, 그의 활성단편 및/또는 융합 단백질) GITR 길항제를 제조하기 위해 필요한 것은 GITR의 핵산 또는 아미노산 서열이라는 것을 인식할 것이고, 이 서열은 공지되어 있다. 이러한 서열을 이용하여, GITR 길항제(예를 들어, 수용성 GITR, 그의 활성단편 및/또는 융합 단백질)는 상술한 바와 같이 재조합 DNA 기술 및/또는 화학적 합성방법을 이용하여 제조될 수 있다.

#### 항-GITRL 항체

다른 구체예에서, 본 발명은 GITR 길항제를 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로 제공하고, 이들은 GITRL에 특이적으로 결합하며 바람직하게는 포유동물(예를 들어, 뮤린) GITRL에 결합하고, GITR 활성을 중화한다.

당업자는 여기에서 사용된 용어“항체”가 적어도 하나, 바람직하게는 2개의 중쇄(H) 가변 영역(VH로 약칭) 및 적어도 하나, 바람직하게는 두개의 경쇄(L) 가변 영역(VL로 약칭)을 포함하는 단백질을 지칭한다는 것을 인식할 것이다. VH 및 VL 영역은 초가변 영역, 잘 보존된 영역으로서 산재하고 있는 “상보성 결정 영역(CDR)” 및 “골격 영역(FR)”으로 더 세분화될 수 있다. FR 및 CDR의 정도는 정확히 정해져 있다(Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 및 Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917를 참조, 이들은 참고자료로 여기에 포함되어 있다). 각 VH 및 VL은 세 개의 CDR 및 네개의 FR로 구성되어 있고, 아미노-말단에서 카복시-말단으로 가면서 다음과 같이 배열되어 있다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

항체는 중쇄 및 경쇄 불변 영역을 더 포함할 수 있고, 그로 인해 각각 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄를 형성한다. 한 구체예에서, 항체는 두개의 이뮤노글로불린 중쇄 및 두개의 이뮤노글로불린 경쇄로 이루어진 태트라미이이고, 여기에서 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄는 예를 들어 이황화 결합에 의해 상호 연결되어 있다. 중쇄 불변 영역은 CH1, CH2 및 CH3의 세 개의 도메인으로 구성되어 있다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인 CL로 구성되어 있다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체의 불변영역은 전형적으로 면역계의 다양한 세포(예를 들어, 작동 세포) 및 전통적 보체계의 제1 성분(C1q)를 포함하는 숙주 조직 및 인자에 항체의 결합을 매개한다.

이뮤노글로불린을 실질적으로 이뮤노글로불린 유전자에 의해 코딩되는 하나 이상의 폴리펩티드로 구성된 단백질을 지칭한다. 확인된 인간 이뮤노글로불린 유전자는 카파, 람다, 알파 (IgA1 and IgA2), 감마 (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), 델타, 입실론 및 뮤 불변영역 및 수많은 가변 영역 유전자를 포함한다. 풀-렌스 이뮤노글로불린 “경쇄”(약 25 Kd, 또는 214 아미노산)는 NH<sub>2</sub>-말단(약 110 아미노산)이 가변영역 유전자에 의해 코딩되고, COOH-말단이 카파 또는 람다 불변영역 유전자에 의해 코딩된다. 풀-렌스 이뮤노글로불린 “중쇄”(약 50 Kd, 또는 446 아미노산)는 유사하게 가변영역 유전자(약 116 아미노산) 및 전술한 다른 불변영역 유전자 중의 하나, 예를 들어 감마(약 330 아미노산을 코딩)에 의해 코딩된다. 이뮤노글로불린 중쇄 불변영역 유전자는 항체 클래스를 코딩한다, 즉, 동형(isotype)(예를 들어, IgM 또는 IgG1). 여기에서 사용되는 항체의 항원 결합 단편 (또는 단순히 “항체 부분” 또는 “단편”)은 항원에 대한 특이적인 결합능을 보유하는 풀-렌스

항체의 하나 이상의 단편을 지칭한다(예를 들어, CD3). 용어, 항체의 “항원 결합단편”에 포함되는 결합 단편의 예는 다음을 포함한다; (i) Fab 단편, VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 구성되는 일가 단편; (ii)  $F(ab')_2$  단편, 헌지 영역에서 이황화다리에 의해 연결된 두개의 Fab 단편을 포함하는 이가 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 구성된 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 팔의 VL 및 VH 도메인으로 구성된 Fv 단편, (v) VH 도메인으로 구성된 dAb 단편 (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-46); 및 (vi) 분리된 상보성 결정 영역 (CDR). 더 나아가, Fv 단편의 두개의 도메인(VL 및 VH)이 다른 유전자에 의해 코딩되지만, 그들은 재조합 방법을 이용하여 그들을 단일 단백질 사슬로 만들어주는 합성 링커에 의해 연결될 수 있고, VL 및 VH 영역 쌍은 일가 분자를 형성한다(단일 사슬 Fv (scFv)로 알려짐; 예를 들어, Bird et al. (1988) Science 242: 423-26; 및 Huston et al. (1988) Proc.Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-83를 참조). 그러한 단일 사슬 항체는 또한 용어 항체의 “항원 결합단편”에 포함된다. 이러한 항체 단편은 당업자에게 알려진 통상의 기술을 이용하여 얻을 수 있고, 이용하기 위해 완전한 항체와 같은 방식으로 스크리닝 될 수 있다.

당업자는 본 발명의 폴리펩티드(예를 들어, 뮤린 GITRL)에 대한 항체 분자를 제조를 위해 여기에 개시된 방법이 또한 다른 단백질(예를 들어, GITR 또는 인간 GITRL)에 대한 항체 분자를 제조하는데 사용될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 결과적으로, 항체를 제조하는 방법은 개시된 본 발명의 폴리펩티드뿐만 아니라 예를 들어 GITR 또는 인간 GITRL에도 적용될 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드에 대한 항체 분자(예를 들어, 뮤린 GITRL(마우스 GITRL 및 그의 상동물을 포함하지만 이에 한정되지는 않음)에 대한 중화 항체)는 자가면역 질병, 염증성 질병, 이식거부 및 유사 또는 관련 질병을 예방하거나 치료하는데 유용할 수 있다. 예를 들어 작용성 GITR 항체와 같은 다른 항체 분자는 암, 전염병 및 유사 또는 관련 질병을 치료하는 본 발명의 방법에 유용할 수 있다. 그러한 항체 분자는 당업자에게 잘 알려진 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 모노클로날 항체는 공기방법에 따라 하이브리도마를 만듦으로써 제조될 수 있다. 이러한 방식으로 형성된 하이브리도마는 본 발명의 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하는 하나 이상의 하이브리도마를 확인하기 위해 엔자인-링키드-이뮤노소벤트 에세이(ELISA)와 같은 표준 방법을 이용하여 스크리닝된다. 예를 들어, 본 발명의 GITR 단백질은 또한 GITRL 단백질과 특이적으로 반응하고, 리간드가 수용체(즉, GITR)에 결합하는 것을 저해하는 폴리클로날 및 모노클로날 항체를 얻기 위해 동물을 면역화하는데 사용될 수 있다. 유사하게, GITR 단백질은 또한 GITR과 특이적으로 반응하는 폴리클로날 및 모노클로날 항체를 얻기 위해 사용될 수 있다. 웨პ티드 면역원은 추가로 카복실 말단에 시스테인 잔기를 함유할 수 있고, 키홀 럼페트 헤모시아닌(KLH)과 같은 합텐에 짹지어질 수 있다. 추가적인 웨პ티드 면역원이 티로신 잔기를 설폐이트된 티로신 잔기로 대체함으로써 제조될 수 있다. 그러한 웨პ티드를 합성하는 방법은 예를 들어, Merrifield (1963) J. Amer. Chem. Soc. 85: 2149-54; Krstenansky et al. (1987) FEBS Lett. 211: 10에서와 같이 당업계에 공지되어 있다. 본 발명의 폴리펩티드는 면역원으로 사용될 수 있고, 또는 대체적으로 폴리펩티드의 항원 웨პ티드 단편이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 폴리펩티드의 항원 웨პ티드 단편은 적어도 7개의 연속한 아미노산 잔기를 포함하고, 웨პ티드에 대항해서 발생한 항체가 폴리펩티드와 특이적 면역 복합체를 형성하도록 에피토프를 포함한다. 바람직하게는, 항원 웨პ티드는 적어도 10개의 아미노산 잔기, 보다 바람직하게는 적어도 15개의 아미노산 잔기, 더욱 바람직하게는 적어도 20개의 아미노산 잔기, 더욱 바람직하게는 적어도 30개의 아미노산 잔기를 포함한다.

모노클로날 항체는 재조합 DNA 기술 분야의 당업자에게 알려진 다른 방법에 의해 제조될 수 있다. 모노클로날 항체-분비 하이브리도마를 제조하는 대체 방법으로서, 본 발명의 폴리펩티드에 대한 모노클로날 항체는 본 발명의 폴리펩티드(예를 들어, GITRL) 또는 GITR로 재조합 복합 이뮤노글로불린 도서관(예를 들어, 항체 파지 디스플레이 도서관)를 스크리닝함으로써 확인 및 분리될 수 있고, 그에 의해서 본 발명의 폴리펩티드 또는 GITR에 결합하는 이뮤노글로불린 도서관 멤버를 각각 분리할 수 있다. 파지 디스플레이 도서관을 생성하고 스크리닝하기 위한 기술 및 시판 키트가 당업자에게 잘 알려져 있다. 추가적으로, 항체 디스플레이 도서관을 생성하고 스크리닝하는데 사용되는 방법 및 시약의 예는 문헌에 기재되어 있다. 예를 들어, “복합 항체 디스플레이” 방법은 특정 항원 특이성을 가지는 항체 단편을 확인 및 분리하기 위해 개발되었고, 모노클로날 항체를 제조하는데 이용될 수 있다(복합 항체 디스플레이에 관해서는, 예를 들어, Sastry et al. (1989) Proc.Natl. Acad. Sci. USA 86:5728 ; Huse et al. (1989) Science 246: 1275; Orlandi et al. 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3833를 참조). 상술한 바와 같이 면역원으로 동물을 면역화한 후에, 생성된 B-세포 풀의 항체 레페르토이르(repertoire)가 클로닝된다. 올리고머 프라이머의 혼합물 및 PCR을 이용하여 다양한 이뮤노글로불린 분자 집단으로부터 가변영역의 DNA 서열을 얻는 방법은 일반적으로 알려져 있다. 예를 들어, 5' 선도 (신호 웨პ티드) 서열 및/또는 골격1 (FR1) 서열, 및 보존된 3' 불변영역에 대한 프라이머에 대응하는 혼합된 올리고뉴클레오티드 프라이머가 다양한 뮤린 항체로부터 중쇄 및 경쇄 가변영역의 PCR 증폭에 사용될 수 있다(Larrick et al. (1991) Biotechniques 11: 152-56). 유사한 전략이 또한 인간 항체로부터 인간 중쇄 및 경쇄 가변영역을 중복하는데 사용될 수 있다(Larrick et al.(1991) Methods : Companion to Methods in Enzyfnology 2: 106-10).

폴리클로날 세럼 및 항체가 적합한 개체를 본 발명의 폴리펩티드로 면역화함으로써 제조될 수 있다. 면역화된 개체의 항체 역기는 고정화된 식별 단백질을 이용하여 ELISA와 같은 표준 방법에 의해 시간에 따라 모니터할 수 있다. 바람직하다면, 본 발명의 폴리펩티드에 대항하게 지시된 항체 분자는 개체 또는 배양물로부터 분리될 수 있고, IgG 분획을 얻기 위해 단백질 A 크로마토그래피와 같은 잘-알려진 기술을 이용하여 추가로 정제할 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드에 대한 항체 단편은 당업계에 잘 알려진 방법에 따라 항체를 절단함으로써 제조된다. 예를 들어, 면역학적으로 활성인 Fab 및  $F(ab')_2$  단편은 항체를 펩신과 같은 효소로 처리함으로써 제조된다.

추가적으로, 인간 및 비인간 부분을 모두 포함하는 본 발명의 폴리펩티드에 대한 키메라, 인간화된 및 단일-사슬 항체는 표준 DNA 기술 및/또는 재조합 복합 이뮤노글로불린 도서관을 이용하여 제조될 수 있다. 인간화된 항체는 또한 내재 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄 유전자를 발현하지 못하지만 인간 중쇄 및 결쇄 유전자를 발현시킬 수 있는 트랜스제닉 마우스를 이용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, GITRL에 대항하도록 지시된 인간 모노클로날 항체(mAbs)는 뮤린 이뮤노글로불린 유전자보다는 인간 이뮤노글로불린 유전자를 보유하는 트랜스제닉 마우스를 이용하여 제조될 수 있다. 관심 항원으로 면역화된 이런 트랜스제닉 마우스로부터의 비세포(splenocyte)는 후에 인간 단백질에서 유래한 에피토프에 대해 특이적 친화성을 가진 인간 mAbs를 분비하는 하이브리도마를 제조하는데 사용될 수 있다(예를 들어, Wood et al., WO 91/00906; Kucherlapati et al., WO91/10741 ; Lonberg et al. WO 92/03918; Kay et al., WO 92/03917; Lonberg et al. (1994) Nature 368: 856-59; Green et al. (1994) Nat. Genet. 7: 13-21; Morrison et al. (1994) Proc.Natl. Acad. Sci. USA 81 : 6851-55; Bruggeman (1993)YearImmunol 7 : 33-40; Tuallion et al. (1993) Proc.Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-24 ; Bruggeman et al. (1991)Eur. J. Immunol. 21: 1323-26를 참조).

키메라 이뮤노글로불린 사슬을 포함하는 키메라 항체는 당업계에 알려진 재조합 DNA 기술로 제조될 수 있다. 예를 들어, 뮤린 (또는 다른 종) 모노클로날 항체 분자의 Fc 불변영역을 코딩하는 유전자는 뮤린 Fc를 코딩하는 영역을 제거하기 위해 제한효소로 소화되고, 인간 Fc 불변영역을 코딩하는 유전자의 균등 부분이 치환된다(Robinson et al., International Patent Publication PCT/US86/02269; Akira, et al., European Patent Application 184, 187; Taniguchi, European Patent Application 171,496; Morrison et al., European Patent Application 173,494; Neuberger et al., WO 86/01533; Cabilly et al., U.S. Patent No. 4,816,567; Cabilly et al., European Patent Application 125,023; Better et al. (1988) Science 240: 1041-43; Liu et al. (1987) Proc.Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-43; Liu et al. (1987) J.Immunol. 139: 3521-26; Sun et al. (1987) Proc.Natl. Acad. Sci. USA 84: 214-18; Nishimura et al. (1987) Cancer Res. 47: 999-1005; Wood et al. (1985) Nature 314: 446-49; 및 Shaw et al. (1988)J.Natl.Cancer Inst. 80: 1553-59를 참조).

항체 또는 이뮤노글로불린 사슬은 당업계에 공지된 방법에 의해 인간화된다. 인간화된 이뮤노글로불린 사슬을 포함하는 인간화된 항체는 인간 Fv 가변영역의 균등 서열과의 항원 결합에 직접 관여하지 않는 Fv 가변영역의 서열을 대체함으로써 제조될 수 있다. 인간화된 항체를 제조하는 일반적인 방법이 Morrison (1985) Science 229: 1202-07; Oi et al. (1986) BioTechniques 4: 214; Queen et al., U.S. Patent Nos. 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762에 기재되어 있으며, 전체 내용이 참고자료로 여기에 포함되어 있다. 이러한 방법은 적어도 하나의 중쇄 또는 경쇄중의 이뮤노글로불린 Fv 가변영역의 전부 또는 일부를 코딩하는 핵산서열의 분리, 조작 및 발현을 포함한다. 그러한 핵산 서열의 소스는 당업자에게 잘 알려져 있고, 예를 들어 기결정된 표적에 대한 항체를 생산하는 하이브리도마로부터 얻을 수 있다. 그 후, 인간화된 항체 또는 그의 단편을 코딩하는 재조합 DNA는 적절한 발현벡터로 클로닝될 수 있다.

인간화된 또는 CDR-이식된 항체 분자 또는 이뮤노글로불린은 CDR 이식 또는 CDR 치환에 의해 제조될 수 있고, 이뮤노글로불린 사슬에서 하나, 두개 또는 전체 CDR이 교체될 수 있다. 예를 들어, U.S. Patent No. 5,225,539; Jones et al. (1986) Nature 321: 552-25; Verhoeyan et al. (1988) Science 239: 1534 ; Beidler et al.(1988) J.Immunol. 141: 4053-60; Winter, U.S. Patent No. 5,225,539를 참조, 전체 내용이 참고자료로 여기에 포함되어 있다. Winter는 본 발명의 인간화된 항체를 제조하는데 사용될 수 있는 CDR-이식 방법에 대해 기재하고 있고(UK Patent Application GB 2188638A; Winter, U.S. Patent No. 5,225,539), 그 내용이 참고자료로 여기에 포함되어 있다. 특정 인간 항체의 전체 CDR이 비인간 CDR의 적어도 일부로 대체되거나, 또는 CDR의 일부만이 비인간 CDR로 대체될 수 있다. 단지 기결정된 항원에 대한 인간화된 항체의 결합에 필요한 수의 CDR을 대체하는 것이 필요하다.

예를 들어, 결실, 첨가 또는 항체의 다른 부분(예를 들어, 불변영역)의 치환에 의해 수정되어진 모노클로날, 키메라 및 인간화된 항체가 또한 본 발명의 범위내에 속한다. 예를 들어, 항체는 다음과 같이 수정될 수 있다: (i) 불변영역의 결실; (ii) 불

변영역을 다른 불변영역(예를 들어, 반감기, 안정성 또는 항체에 대한 치환성을 높이는 불변영역, 또는 다른 종 또는 항체 클래스로부터 유래한 불변영역)으로 대체; 또는 (iii) 예를 들어, 글리코실레이션 사이트, 작동 세포 기능, Fc 수용체(FcR) 결합, 보체 고정 등을 변경하기 위해 불변영역에 있는 하나 이상의 아미노산을 수정.

항체 불변영역을 변경하는 방법은 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 세포상의 FcR 또는 보체의 C1 성분과 같은 작동 리간드에 대한 변경된 친화성등과 같은 변경된 기능을 가지는 항체는 항체의 불변영역에 있는 적어도 하나의 아미노산 잔기를 다른 잔기로 대체함으로써 제조될 수 있다(예를 들어, EP 388,151Al, U.S. 5,624,821 및 U.S. 5,648,260를 참조, 전체내용이 참고자료로 여기에 포함되어 있다). 뮤린(또는 다른 종) 이류노글로불린에 대한 유사한 타입의 변경이 이러한 기능을 감소시키거나 제거하기 위해 적용될 수 있다. 그러한 변경은 당업계에 잘 알려져 있다.

예를 들어, 특정 잔기(들)을 적합한 기능을 결사슬에 가지는 잔기(들)로 대체함으로써 또는 글루타메이트 또는 아스파테이트와 같은 하전된 기능기 또는 페닐알라닌, 티로신, 트립토판 또는 알라닌과 같은 방향족 비극성 잔기를 도입함으로써 FcR(예를 들어, Fc 감마 R1) 또는 C1q 결합에 대한 항체의 Fc 영역의 친화성을 변경시키는 것이 가능하다(예를 들어, U.S. 5,624,821를 참조).

본 발명의 항-GITRL 항체는 상청액, 세포 용해물 또는 세포 표면 상에 있는 GITRL 폴리펩티드의 분리, 정제 및/또는 검출에 유용할 수 있다. 본 발명에 개시된 항체는 또한 임상 시험 방법의 일부로서 또는 GITRL 단백질 수준을 진단학적으로 모니터하거나, GITRL 항체의 항원을 포함하는 세포 또는 조직에 대한 치료 조절자를 임상적으로 표적화하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 저분자와 같은 치료제 또는 본 발명의 다른 치료제가 GITRL을 발현하는 세포 또는 조직에 치료제를 표적화하기 위해 GITRL 항체에 연결될 수 있다. GITRL 단백질에 결합하는 중화 또는 비중화 항체(바람직하게는 모노클로날 항체)는 도한 예를 들어 자가면역 질병과 같은 면역계의 조절곤란과 관련된 상태를 치료에 유동할 수 있다. 이러한 중화 모노클로날 항체는 GITRL이 GITR에 결합하는 것을 차단할 수 있다. 본 발명은 GITRL과 특이적으로 반응하는 항체를 포함하는 조성물을 추가로 제공한다. 유사하게, 항-GITR 항체는 GITR 폴리펩티드의 분리, 정제 및/또는 검출, 또는 GITR 수준의 진단학적 모니터링, 또는 GITR을 포함하는 세포 또는 조직에 대한 치료 조절자의 임상적 표적화에 유용할 수 있다. GITR에 대한 작용성 항체(바람직하게는 모노클로날 항체)는 또한 예를 들어 암 또는 전염병과 같은 면역계의 조절곤란과 관련된 상태의 치료에 유용할 수 있다. 이러한 작용성 항체는 GITR 활성을 유도할 수 있다. 따라서, 본 발명은 GITR에 대한 항체를 포함하는 조성물을 추가로 제공한다.

## GITRL 스크리닝 에세이

본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드는 GITRL의 활성을 조절할 수 있는 약리물질 또는 약제를 위한 선도 화합물을 동정하기 위한 스크리닝 에세이에 사용될 수 있고, 이것에 의해 GITR은 세포 또는 기관에서 면역 반응의 잠재적인 조절자가 된다. 예를 들어, GITRL(천연 또는 재조합)을 함유하는 샘플은 복수의 시험 화합물(생물학적 약제 또는 저 유기 분자) 중 하나와 접촉될 수 있고, 각각의 처리된 샘플의 GITRL 활성을 비처리된 샘플 또는 다른 시험 화합물과 접촉시킨 샘플의 GITRL 활성과 비교할 수 있다. 그러한 비교를 통해 시험 화합물 중 어떤 것이 다음과 같은 결과를 일으키는지 확인한다: 1) GITRL의 발현 또는 활성 수준을 실질적으로 감소시키고, 그로 인해 GITRL의 저해를 나타낸다(예를 들어, 면역 억제를 저장하거나 증가시키는 화합물), 또는 2) GITRL의 발현 또는 활성 수준을 실질적으로 증가시키고, 그로 인해 GITRL의 활성화를 나타낸다(예를 들어, 면역 억제를 반전시키는 화합물). 다른 구체예에서, GITRL 활성을 조절하는 시험 화합물의 동정은 BIACORE (Biacore International AB, Uppsala, Sweden), BRET (bioluminescence resonance energy transfer), FRET (fluorescence resonance energy transfer) 에세이, ELISA 및 세포-기초 에세이와 같은 고-처리 스크리닝 에세이를 이용하여 수해될 수 있다.

## 저분자

자가면역 질병, 염증성 질병, 또는 이식거부으로 고통받는(또는 위험이 있는) 기관(또는 개체)에서, 또는 그러한 질병에 관련된 기관(또는 개체)의 세포에서 감소된 GITR 활성은 또한 GITR을 길항(즉, 활성을 저해)하는 저분자(통상 유기 저분자)의 사용을 통해 성취될 수 있다. 신규한 길항성 저분자가 상술한 스크리닝 방법에 의해 동정될 수 있고, 후술하는 본 발명의 치료 방법에 사용될 수 있다. 반대로, 암 또는 전염병으로 고통받는(또는 위험이 있는) 기관(또는 개체)에서, 또는 그러한 질병에 관련된 기관(또는 개체)의 세포에서 증가된 GITR 활성은 또한 GITR을 작용(즉, 활성을 증가)하는 저분자(통상 유기 저분자)의 사용을 통해 성취될 수 있다. 신규한 작용성 저분자가 상술한 스크리닝 방법에 의해 동정될 수 있고, 후술하는 바와 같이 암 및/또는 전염병의 치료 방법에 사용될 수 있다.

자가면역 질병 및 암을 진단, 예후 및 진행 감시 방법.

동물 모델(특히, 뮤린 모델)에서 시험된 면역학적 메카니즘이 종종 인간 면역계에도 적용될 수 있다는 것은 당업계에 잘 알려져 있다. 그와 같이, 여기에 개시된 실시예가 뮤린 모델에서 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 조절 세포에 의한 면역 억제에서 GITR의 역할을 나타내고 있지만, 예를 들어 자가면역 질병, 염증성 질병 및 이식거부, 암 및 전염병과 같은 면역계의 조절곤란과 관련된 질병의 진단, 예후, 모니터링에 관해 개시된 방법은 인간에서 그런 질병의 진단, 예후 및 감시 특히 유용할 것이다. 개시된 방법을 실시함에 있어, 당업자는 GITR 및 GITRL의 인간 상동물, 및 인간 GITR 작용체 및 길항제가 인간에서 그런 질병의 진단, 예후, 및 감시하는 청구된 방법에 사용도리 수 있다는 것을 인식할 것이다.

본 발명은 GITR 활성의 상향조절(예를 들어, GITRL의 상향조절)을 검출함으로써 개체에서 자가면역 질병을 진단, 예후 및 진행 감시를 위한 방법을 제공하고, 인간 개체에서 그러한 방법을 사용을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 당업자는 이러한 방법이 염증성 질병 및 이식거부에도 적용될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 이러한 방법은 여기에 개시된 GITRL 폴리뉴클레오티드 또는 그의 단편, GITRL 폴리펩티드 또는 그의 부분(그의 융합 단백질을 포함) 또는 GITRL 폴리펩티드 또는 그의 유도체에 대한 항체, 또는 GITRL 폴리뉴클레오티드 및/또는 폴리펩티드의 조절자를 포함하는 그룹의 적어도 하나를 포함하는 팩키지된 진단 키트를 이용하여 수행될 수 있고, 예를 들어 임상 환경에서 편리하게 사용될 수 있다. 추가적으로, 당업자는 GITRL의 상향조절이 또한 면역 세포의 수를 세는 것과 같은 간접적인 방법에 의해 검출될 수 있다는 것을 인식할 것이다.

“진단적” 또는 “진단”은 병적 상태의 존재 또는 부존재를 확인하는 것을 의미한다. 진단 방법은 개체(인간 또는 비인간 포유동물)로부터 얻은 생물학적 샘플에서 GITRL 유전자 산물(예를 들어, mRNA, cDNA, 또는 폴리펩티드(그의 단편을 포함))의 시험양 결정하고, 시험양을 GITRL 유전자 산물에 대한 정상 값 또는 범위(즉, 자가면역 질병이 없는 것으로 알려진 개체(들)로부터 얻은 값 또는 범위)와 비교함으로써 GITRL의 상향조절을 검출하는 것을 포함한다. 특정 진단 방법이 자가면역 질병에 대해 명확한 진단을 제공하는 것은 아니지만, 상기 방법에서 양성반응이 나온다면 진단에 도움을 주기에는 충분하다.

본 발명은 또한 GITR 활성의 상향조절(예를 들어, GITRL의 상향조절)을 검출함으로써 그러한 자가면역 질병의 예후 방법을 제공한다. “예후” 또는 “예측하는”은 가능성 있는 발달 및/또는 병적 상태의 심각성을 예측하는 것을 의미한다. 예후 방법은 개체로부터 얻은 생물학적 샘플에서 GITRL 유전자 산물(예를 들어, mRNA, cDNA, 또는 폴리펩티드(그의 단편을 포함))의 시험양 결정하고, 시험양을 GITRL 유전자 산물에 대한 예후 값 또는 범위(즉, 자가면역 질병의 심각성이 다양한 개체(들)로부터 얻은 값 또는 범위)와 비교하는 것을 포함한다. 시험 샘플내에서 GITRL 유전자 산물의 다양한 양은 자가면역 질병을 위한 어떤 예후와 일치한다. 특정 예후 수준에 있는 GITRL 유전자 산물의 양의 검출은 개체에 대한 예후를 제공한다.

본 발명은 또한 GITR 활성의 상향조절(예를 들어, GITRL의 상향조절)을 검출함으로써 그러한 자가면역 질병의 진행 또는 과정의 감시 방법을 제공한다. 감시 방법은 개체로부터 제1 및 제2 시기에 채취한 생물학적 샘플의 GITRL 유전자 산물의 시험양을 결정하고, 그 양을 비교하는 것을 포함한다. 제1 및 제2 시기간의 GITRL 유전자 산물의 변화는 자가면역 질병의 과정중에 변화가 있음을 나타내고, 양의 감소는 자가면역 질병이 회복되는 것을 나타내며, 양의 증가는 자가면역 질병의 진행을 나타낸다. 이런 감시 에세이는 자가면역 질병에 대해 치료를 받고 있는 환자에서 또한 특정 치료제의 개입의 효과를 평가하는데 유용하다.

위에서 설명한 방법에서 GITRL의 증가된 발현은 체액(예를 들어, 전혈, 혈장 및 오줌), 세포(예를 들어, 전채 세포, 세포 분획 및 세포 추출물) 및 조직을 포함하는 다양한 생물학적 샘플에서 검출될 수 있다. 생물학적 샘플은 또한 생검 및 조직학적 목적으로 취해진 동결 절편과 같은 조직 절편을 포함한다. 바람직한 생물학적 샘플은 피, 혈장, 림프, 조직 생검, 오줌, CSG(뇌척수액), 윤활액 및 BAL(기관지 폐포 세척)을 포함한다. 생물학적 샘플을 분석하기 위해 세포 또는 조직을 개체로부터 제거할 필요는 없을 것으로 예측된다. 예를 들어, GITRL 유전자 산물에 결합하는 적절하게 표지된 물질(예를 들어, 항체, 핵산)은 개체에 투입될 수 있고, 표준 이미지 기술(예를 들어, CAT, NMR(MRI) 및 PET)을 이용하여 가시화(표적에 결합한 경우)될 수 있다.

본 발명의 진단 및 예후 에세이에서, GITRL 유전자 산물은 검출되고 정량화되어 시험값을 제공한다. 그 후, 시험값은 정상 값 또는 범위와 비교된다. 정상 값 또는 범위보다 상당히 많은 양은 자가면역 질병에 대한 진단에서 양성신호이다. GITRL 유전자 산물을 검출 및 정량하는 특정 방법이 아래에 기재되어 있다.

GITRL 유전자 산물의 정상 값 또는 기저 수준은 어느 특정 샘플 타입 및 집단에 대해 결정된다. 일반적으로, GITRL 단백질 또는 mRNA의 기저(정상) 수준은 정상(즉, 건강한) 개체의 생물학적 샘플 타입에서 GITRL 단백질 또는 mRNA의 양을

측정함으로써 결정된다. 대체적으로, GITRL 유전자 산물의 정상 값은 병들은 (또는 병든 가능성 있는) 세포 또는 조직이 채취된 개체와 동일한 개체로부터 채취된 건강한 세포 또는 조직에서 양을 측정함으로써 결정된다. GITRL 유전자 산물(정상양 또는 시험양)의 양은 세포당, 총 단백질당 또는 부피에 기초하여 결정되거나 표현될 수 있다. 샘플의 세포양을 결정하기 위해, 생물학적 샘플이 취해진 타입의 세포에서 구성적으로 발현되는 유전자 산물 또는 발현수준이 알려진 다른 유전자 산물의 수준을 측정할 수 있다.

이 방법의 많은 적용을 위해 상대값으로도 충분하기 때문에, 본 발명의 에세이 방법이 반드시 GITRL 유전자 산물의 절대값 측정을 요구하지 않는다는 것이 예측될 것이다. 또한, GITRL 유전자 산물의 양 또는 풍부함 외에 변이체 또는 비정상 GITRL 유전자 산물 또는 그들의 발현 패턴(예를 들어, 변이된 전사, 트런케이션된(truncated) 폴리펩티드)이 정상 유전자 산물 및 발현 패턴과 비교함으로써 확인될 수 있다.

본 발명의 진단, 예후, 및 감시 에세이는 생물학적 샘플에서 GITRL 유전자 산물을 검출 및 정량을 포함한다. GITRL 유전자 산물을 GITRL mRNA 및 GITRL 폴리펩티드를 포함하고, 양자는 당업자에게 잘 알려진 방법을 이용하여 측정될 수 있다.

예를 들어, GITRL mRNA는 노던 혼성화, 인 시츄 혼성화, 도트 앤 슬롯 블롯(dot and slot blots) 및 올리고뉴클레오티드 어레이와 같은 혼성화-기초 에세이를 이용하여 직접적으로 검출되고 정량될 수 있다. 혼성화-기초 에세이는 프로브 핵산이 표적 핵산에 혼성화하는 에세이를 지칭한다. 일부 방법에서, 표적, 프로브 또는 양자 모두 고정된다. 고정된 핵산은 DNA, RNA, 또는 다른 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드일 수 있고, 천연 또는 비천연 발생 뉴클레오티드, 뉴클레오티드 유사체 또는 골격을 포함할 수 있다. 본 발명에 사용되는 핵산 프로브 서열을 선택하는 방법은 GITRL의 핵산 서열에 기초하고 있으며, 이는 당업계에 잘 알려져 있다.

대체적으로, GITRL mRNA는 검출 및 정량 전에 증폭될 수 있다. 그런 증폭-기초 에세이는 당업계에 잘 알려져 있고, 폴리모라제 체인 리액션(PCR), 리버스-트랜스크립션-PCR (RT-PCR), PCR-엔자임-링키드 이뮤노소벤트 에세이(PCR-ELISA), 및 리가아제 체인 리액션(LCR)을 포함한다. 증폭된 GITRL 유전자 산물(예를 들어, mRNA 또는 cDNA)을 제조하고 검출하기 위한 프라이머 및 프로브는 GITRL의 핵산 서열에 기초하여 당업자가 과도한 실험없이 쉽게 설계 및 제조할 수 있다. 증폭된 GITRL 유전자 산물은 예를 들어 젤 전기영동; 프로브 핵산과의 혼성화; 시퀀싱; 형광, 인광 또는 방사성 신호의 검출; 또는 잘 알려진 다양한 방법중의 어느 것에 의해 즉시 분석될 수 있다. 추가적으로, 표적 핵산 서열의 증폭에 의해 제조된 신호를 증가시키는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 당업자는 GITRL 유전자 산물의 정량이 바람직하다면 어떤 증폭 방법이 사용되는지에 관계없이 당업계에 알려진 다양한 정량 방법(예를 들어, 정량 PCR)이 사용될 수 있다는 것을 인식할 것이다.

GITRL 폴리펩티드 (또는 그의 단편)은 상술한 항-GITRL 항체를 사용하는 다양한 공자의 면역학적 에세이를 이용하여 검출될 수 있다. 면역학적 에세이는 GITRL 폴리펩티드 (또는 그의 단편)에 특이적으로 결합하는 항체(예를 들어, 폴리클로날, 모노클로날, 키메라, 인간화된, scFv 및 그의 단편)를 사용하는 에세이를 지칭한다. 본 발명의 실시에 적합한 그런 공자의 면역학적 에세이는 ELISA, 라디오이뮤노에세이(RIA), 이뮤노프리시피테이션, 이뮤노플루오레슨스, 플루오레슨스-액티베이티드 셀 소팅(FACS), 및 웨스턴 블로팅을 포함한다. GITRL 폴리펩티드는 표지된 GITR을 이용하여 또한 검출될 수 있다.

당업자는 전술한 방법이 자가면역 질병 및 (염증성 질병과 같은) 다른 질병 (류마티스 관절염, 골관절염, 다발 경화증, 자가면역 위염, 전신홍반 루프스, 건선 과 다른 염증성 피부병, 타입 I 당뇨병, 천식, 알레르기, 및 크론병과 궤양 대장염을 포함하는 염증성 대장 질병을 포함하지만 이에 한정되지는 않음)에 적용될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

당업자는 또한 전술한 방법 또는 그의 변형된 방법이 GITR 활성의 하향조절(예를 들어, GITRL의 하향조절)을 검출함으로써 개체에서 다양한 암 및 전염병의 진단, 예후 및 진행 감시(예를 들어, GITRL의 수준 감소를 직접적 또는 간접적으로 포함)에 사용될 수 있다는 것을 인식할 것이고, 그러한 방법의 인간 개체에서의 사용을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.

## 치료에 있어서 GITRL 및 관련 분자의 용도

본 출원인은 GITRL 또는 다른 GITR 작용제에 의한 GITR의 작용 T 세포에 대한 결합이 공자극(costimulatory) 신호를 작용 T 세포에 제공하는 것을 처음으로 인식하였다고 믿고 있고, 여기에서 그러한 신호는 작동 T 세포를 CD4+ CD25+ 조절 T 세포에 의한 억제에 덜 민감하게 만들고, 항-CD3 또는 다른 활성 신호에 반응하여 작동 T 세포의 증식능력을 증가시킨다. 뮤린 모델이 메카니즘을 발견하는데 사용되었지만, 뮤린에서 연구된 면역학적 메카니즘이 종종 인간 면역계에도 적용된다는 것은 당업계에 잘 알려져 있다. 이와 같이, 면역계의 조절곤란과 관련된 질병(예를 들어, 자가면역 질병, 염증성

질병 및 이식거부, 및 암 및 전염병)을 치료하기 위한 GITRL 및 관련 분자(즉, GITR 작용제 또는 GITR 길항제)의 이용은 특히 인간으로부터 그러한 질병을 치료하는데 유용하다. 개시된 방법을 실시하는 경우에, 당업자는 GITR 및 GITRL의 인간 상동물, 및 인간 GITR 작용제 및 길항제가 GITRL 및 GITRL-관련 단백질(즉, GITR 작용제 및 길항제)을 이용하여 인간으로부터 자가면역 질병, 염증성 질병 및 이식거부, 암 및 전염병을 치료하는 청구된 방법에 이용될 수 있다는 것을 인식할 것이다.

여기에 개시된 GITRL-관련 분자(즉, 여기에 개시된 방법을 이용하여 확인되는 GITRL 폴리뉴클레오티드 및/또는 폴리펩티드의 조절자를 포함하는 GITR 작용제 및 길항제)가 예를 들어 GITRL 길항제(예를 들어, GITRL 저해 폴리뉴클레오티드, 길항성 저분자, 중화 항-GITR 항체 및/또는 중화 항-GITRL 항체)를 투여하여 자가면역 질병을 치료하거나, 예를 들어 GITRL 작용제(예를 들어, GITRL 폴리뉴클레오티드, GITRL 폴리펩티드 또는 그의 융합 단백질, 작용성 저분자 및/또는 작용성 항-GITR 항체)를 투여하여 암을 치료하기 위해 시험판내, 생체외로 이용되거나 또는 약제학적 조성물에 포함되어 개체에 생체내 투여될 수 있다. 그러한 GITRL 및/또는 관련 분자(조절자를 포함)은 마우스 GITRL 및 그의 상동물 ( 및 그런 분자에 대한 항체)을 포함하지만 이에 한정되지는 않고, 그런 상동물은 인간 GITRL을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. GITRL 및/또는 GITRL 관련 분자의 투여 여부를 결정함에 있어 고려되는 다양한 약리계놈학적 접근방법이 당업자에게 잘 알려져 있고, 게놈-와이드 희합(genome-wide association), 후보 유전자 접근(candidate gene approach) 및 유전자 발현 프로파일링(gene expression profiling)을 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물은 그의 목적된 투여 경로(예를 들어, 불활성 희석제 또는 식용 담체를 일반적으로 포함하는 경구 조성물)에 적합하게 제형화될 수 있다. 투여 경로의 다른 비제한적인 예는 비경구적(예를 들어, 정맥내), 진피내, 피하, 경구(예를 들어, 흡입), 경피(국소), 점막통과 및 직장 투여를 포함한다. 각 목표 경로에 적합한 약제학적 조성물이 당업계에 잘 알려져 있다.

GITR 작용제 또는 길항제는 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 약제학적 조성물로 사용될 수 있다. 그런 조성물은 GITR 작용제 또는 길항제 및 담체에 추가하여 다양한 희석제, 충진제, 염, 완충액, 안정화제, 가용화제 및 당업계에 알려진 다른 물질을 함유할 수 있다. 용어 “약제학적으로 허용되는”은 활성 성분(들)의 생물학적 활성 효과에 간섭하지 않는 비독성 물질을 의미한다. 담체의 특성은 투여 경로에 의존할 것이다.

본 발명의 약제학적 조성물은 또한 사이토카인, 림포카인 또는 M-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, G-CSF, 간상 세포 인자, 및 적혈구 생성 인자와 같은 조혈인자를 함유할 수 있다. 또한, 약제학적 조성물은 플라스미노겐 활성화제 및 인자 VIII와 같은 혈전용해 또는 항혈전 인자를 함유 할 수 있다. 약제학적 조성물은 뒤에서 자세히 기술될 다른 항-염증성 물질을 추가로 포함할 수 있다. 그러한 추가적 인자 및/또는 물질은 GITR 작용제 또는 길항제와 상승효과를 나타내기 위해 또는 GITR 작용제 또는 길항제에 의해 야기되는 부작용을 최소화하기 위해 약제학적 조성물에 포함될 수 있다. 반대로, GITR 작용제 또는 길항제는 사이토카인, 림포카인, 다른 조혈인자, 혈전용해 또는 항혈전인자, 또는 항-염증성 물질의 부작용을 최소화하기 위해 특정 사이토카인, 림포카인, 다른 조혈인자, 혈전용해 또는 항혈전인자, 또는 항-염증성 물질의 제형에 포함될 수 있다.

본 발명의 약제학적 조성물은 리포솜의 형태로 있을 수 있고, 여기에서 GITR 작용제 또는 길항제는 약제학적으로 허용되는 다른 담체외에 수용액에서 미셀, 불용성 단층, 액정 또는 라멜마 층의 응집 형태로 존재하는 지질과 같은 양친매성 물질과 결합된다. 리포솜 제형에 적합한 지질은 모노글리세리드, 디글리세리드, 설파티드, 리소래시틴, 포스포리피드, 사포닌, 바일산 등을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 그런 리포솜 제형의 제조는 당업계의 수준에 속하고, 예를 들어, U.S. Pat. No. 4,235,871; U.S. Pat. No. 4,501,728; U.S. Pat. No. 4,837,028; 및 U.S. Pat. No. 4,737,323에 개시되어 있고 전체내용이 참고자료로 여기에 포함되어 있다.

여기에서 사용되는, 용어 “치료학적으로 유용한 양”은 의미있는 환자 유익(예를 들어, 증상의 개선, 치료 또는 그런 상태의 치료 속도의 증가)을 나타내는데 충분한 약제학적 조성물 또는 방법에서 각 활성 성분의 총량이다. 단독으로 투여된 개별 활성 성분에 적용된다면, 상기 용어는 그 성분 단독을 나타낸다. 병용되어 적용된다면, 상기 용어는 순차적으로 또는 동시에 병용하여 투여하든지간에 치료효과를 나타내는 활성 성분의 병용된 양을 지칭한다.

본 발명에 따른 치료방법 또는 용도를 실시함에 있어서, 치료학적으로 유효량의 GITR 작용제(예를 들어, GITRL 폴리뉴클레오티드, 또는 그로부터 발현된 GITRL 폴리펩티드) 또는 GITR 길항제(예를 들어, 중화 항-GITR 항체 또는 중화 항-GITR 항체)는 예를 들어 포유동물(예를 들어, 인간)과 같은 개체에 투여될 수 있다. GITR 작용제 또는 길항제는 본 발명의 방법에 따라 단독으로 또는 사이토카인, 림포카인 또는 다른 조혈인자 또는 항-염증성 물질을 채용하는 처리와 같은 다른 치료와 병용하여 투여될 수 있다. 하나 이상의 물질과 공투여되는 경우에 GITR 작용제 또는 길항제는 제2 약물과 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 순차적으로 투여되는 경우에, 주치의는 적절한 투여순서(예를 들어, GITRL 폴리펩티드(또는 그의 융합 단백질) 또는 중화 항-GITRL 항체를 다른 약물과 병용하여)를 결정할 것이다.

치료학적으로 유효량의 GITR 작용제 또는 길항제가 경구로 투여되는 경우에 결합제는 정제, 캡슐, 파우더, 용액, 엘리시르의 형태일 것이다. 정제 형태로 투여되는 경우에, 본 발명의 약제학적 조성물은 추가적으로 젤라틴 또는 보강제와 같은 고형 담체를 함유할 수 있다. 정제, 캡슐 및 파우더는 약 5 내지 95%의 결합제 및 바람직하게는 25% 내지 90%의 결합제를 함유한다. 액체 형태로 투여되는 경우에 물, 석유, 동물성유, 땅콩유, 미네랄유, 대두유, 참깨유와 같은 식물성유 또는 합성유와 같은 액체 담체가 첨가될 수 있다. 약제학적 조성물의 액체 형태는 추가적으로 생리 식염수, 텍스트로스, 다른 사카라이드 용액, 에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 또는 폴리에틸렌글리콜과 같은 글리콜을 포함할 수 있다. 액체 형태로 투여되는 경우에 약제학적 조성물은 약 0.5 내지 90 중량%의 결합제 및 바람직하게는 약 1 내지 50 중량%의 결합제를 포함한다.

치료학적으로 유효량의 GITR 작용제 또는 길항제는 정맥, 피부 또는 피하 주사에 의해 투여되는 경우에 GITR 작용제 또는 길항제는 피로젠-프리, 비경구적으로 허용되는 수용액의 형태이다. 그런 비경구적으로 허용되며 적절한 pH, 등장성, 안정성 등을 가지는 단백질 용액의 제조는 당업자의 기술범위 내에 있다. 정맥, 피부 또는 피하 주사를 위한 바람직한 약제학적 조성물은 GITR 작용제 또는 길항제외에 소듐 클로라이드 주사, 링거 주사, 텍스트로스 주사, 텍스트로스 및 소듐 클로라이드 주사, 락테이티드 링거 주사, 또는 당업계에 알려진 다른 운반체와 같은 등장성 운반체를 포함해야 한다. 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 안정화제, 보존제, 완충액, 항산화제 또는 당업자에게 알려진 다른 첨가제를 포함할 수 있다.

본 발명에 따른 약제학적 조성물중의 GITR 작용제 또는 길항제의 양은 치료하려는 상태의 성질 및 심각성 및 환자가 받은 이전 치료의 성질에 따라 좌우될 것이다. 최종적으로, 주치의가 각 환자에 대한 GITR 작용제 또는 길항제의 양을 결정할 것이다. 초기에 주치의는 GITR 작용제 또는 길항제를 적은 양 투여할 것이고, 환자의 반응을 관찰할 것이다. 환자에 대해 최적의 치료효과가 얻어질 때까지 GITR 작용제 또는 길항제가 더 많은 양으로 투여될 수 있을 것이고, 그 시점에서 투여량은 일반적으로 더 이상 증가하지 않을 것이다. 본 발명의 방법을 실시하는데 사용되는 다양한 약제학적 조성물은 예를 들어 GITRL 폴리펩티드 또는 중화 항-GITRL 항체를 kg체중당 약 0.1 $\mu$ g 내지 약 100mg 함유해야 할 것으로 고려된다.

본 발명의 약제학적 조성물을 이용한 정맥내(i.v.) 치료의 지속기간은 치료되는 질병의 심각성 및 각 개별 환자의 상태 및 특이 반응에 따라 달라질 것이다. GITR 작용제 또는 길항제의 각 적용의 지속기간은 12 내지 24시간의 연속 정맥내 투여 범위내에 있을 것이다. 또한, 본 발명의 약제학적 조성물을 이용한 피하(s.c.) 치료도 고려된다. 이런 치료는 매일, 매주 또는 보다 바람직하게는 2주단위 또는 월달위로 투여될 수 있다. GITR 작용제 또는 길항제가 저분자인 경우에 치료는 매일, 하루에 두 번, 하루에 세 번 등과 같이 투여될 수 있다. 최종적으로 주치의는 본 발명의 약제학적 조성물을 이용하여 i.v. 또는 s.c. 치료의 적절한 치료기간 또는 저분자를 이용한 치료 및 치료제의 투여시기를 결정할 것이다.

본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 단백질은 뒤에서 확인될 하나 이상의 용도 또는 생물학적 활성(여기에는 인용된 에세이와 관련된 것을 포함)을 나타낼 것으로 예측된다. 본 발명의 단백질에 대해 기재된 용도 또는 활성은 투여 또는 그런 단백질의 용도로서 제공되고, 투여 또는 그런 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 용도(예를 들어, 유전자 치료 또는 DNA 도입에 적합한 벡터와 같은)로서 제공된다.

#### 면역 반응을 증가시키기 위한 GITRL 및 다른 GITRL 작용제의 용도

한 측면으로, 본 발명은 면역세포 또는 면역세포 집단(population)을 GITR 작용제(예를 들어, GITR의 활성을 강하게하거나 활성화하는 본 발명의 GITRL 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드(예를 들어, 그의 융합 단백질) 및/또는 작용성 항-GITR 항체)와 접촉시킴으로써 면역세포 증식(예를 들어, T 세포(예를 들어, 작동 T 세포))을 증가시키는 방법을 제공한다. 이런 방법은 적어도 부분적으로는 작용성 항-GITR 항체가 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 세포 증식에 대한 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포-매개 억제를 반전시킨다는 발견에 기초하고 있다(실시예 5). 상기 방법은 또한 부분적으로 예를 들어 GITRL 또는 작용성 항-GITR 항체에 의한 GITR 결합이 작동 T 세포(예를 들어, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포)의 증식을 유도한다는 발견에 기초하고 있다(실시예 9 및 13). 본 출원인은 또한 GITRL에 의한 GITR 결합이 작동 T 세포(예를 들어, CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포)에 공자극 신호를 제공하고, 이로 인해 작동 T 세포가 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 조절 T 세포에 의해 매개된 억제에 대해 극복 능력이 증가되고, 항-CD3에 반응하여 증식한다(실시예 11 및 13); 즉, GITR 작용제(예를 들어, GITRL 폴리펩티드, 그의 활성단편 및/또는 작용성 항-GITR 항체)에 의한 작동 T 세포상에 발현된 GITR의 결합은 작동 T 세포를 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 조절 T 세포에 의한 억제에 덜 민감하게 만든다. 따라서, 작동 T 세포에서 GITR 활성을 자극하는 GITR 작용제는 생체내 면역 반응을 상향조절하기 위해(예를 들어, 암 및 전염병의 치료에 사용하기 위해) 그 자체로 또는 항원(예를 들어, 보강제(예를 들어, 백신 보강제)과 병용하여 사용될 수 있다.

한 구체예에서, GITR 작용제(예를 들어, GITRL 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 그의 활성단편 및/또는 융합 단백질, 작용성 저분자 및/또는 작용성 항-GITR 항체)는 다양한 면역 결핍 및 질병(중증 복합 면역 결핍병(SCID) 포함)의 치료(예를 들어, T 세포의 성장 및 증식을 상향조절)에 유용할 수 있다. 이런 면역 결핍병은 유전적이거나 또는 바이러스(예를 들어, HIV) 및 세균 또는 진균 감염에 의해 야기될 수 있고, 또는 자가면역 질병으로부터 야기될 수 있다. 보다 구체적으로는 바이러스, 세균, 진균 또는 다른 감염(HIV, 간염 바이러스, 포진성 바이러스, 항산균, 리슈만편모충 종, 말라리아 종, 및 칸디다증과 같은 다양한 진균에 의한 감염)에 의해 야기된 전염병은 본 발명의 폴리펩티드를 이용하여 치료될 수 있다. 물론, 이런 견지에서, 본 발명의 단백질은 또한 면역계에 대한 부스트(boost)가 바람직한 경우(즉, 암의 치료)에 유용할 수 있다.

항원 제시 세포(APC) 항원의 상향조절(예를 들어, B7.1, B7.2, 및 B7.3의 상향조절)은 면역 반응을 상향조절하는 수단으로서 또한 치료에 유용할 수 있다. 면역반응의 상향조절은 존재하는 면역반응을 증가시키거나, 초기 면역 반응을 유도한다. 예를 들어, 가지세포 항원 제시 기능을 자극함으로써 면역 반응을 증가시키는 것은 바이러스 감염의 경우에 유용하다. 추가적으로, 인플루엔자, 보통 감기, 및 뇌염과 같은 전신 바이러스 질병(systemic viral disease)은 자극 형태의 항원 제시 분자(예를 들어, 가지세포 항원)를 전신에 투여함으로써 개선될 수 있다.

대체적으로, 항바이러스 면역 반응은 환자로부터 T 세포를 제거하고, T 세포를 생체외에서 바이러스 항원-펄스 프로페셔널 APC(예를 들어, B 세포, 마크로파지 및/또는 가지세포) 및 GITR 작용제(예를 들어, GITRL 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 그의 활성 단편 및/또는 융합 단백질, 작용성 저분자 및/또는 작용성 항-GITR 항체)와 함께 공자극함으로써 감염된 환자에서 증가될 수 있다. GITR 작용제(예를 들어, GITRL 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 그의 활성 단편 및/또는 융합 단백질, 작용성 저분자 및/또는 작용성 항-GITR 항체)는 수용성 단백질로서 또는 APC에 의해 발현되어 제공될 수 있다. 항바이러스 면역 반응을 증가시키는 또 다른 방법은 환자로부터 감염된 세포를 분리하고, 이들을 여기에 기재된 본 발명의 GITRL 단백질을 코딩하는 핵산으로 트랜스펙션시켜, 세포가 이들의 표면에서 단백질의 전부 또는 일부를 발현시키고, 트랜스펙션된 세포를 환자에 재도입시키는 것이다. 감염된 세포는 이제 작동 T 세포에 대해 생체내 공자극 신호를 전달할 수 있고(감염된 세포에 의한 GITRL 단백질 또는 그의 활성 단편의 발현), 작동 T 세포상의 GITR에 대한 이런 GITRL 단백질의 결합은 작동 T 세포를 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 조절 T 세포에 의한 조절에 대해 덜 민감하게 할 수 있다.

다른 적용에서, APC 항원 기능의 상향조절 또는 증가는 종양 면역의 유도에 유용할 수 있다. 본 발명의 적어도 하나의 웨პ티드를 코딩하는 핵산으로 트랜스펙션된 종양세포(예를 들어, 육종, 악성 흑색종, 림프종, 백혈병, 신경모세포종, 및 암종)는 개체에 종양-특이적 내성을 극복하기 위해 개체에 투여될 수 있다. 바람직하다면, 종양세포는 웨პ티드의 조합을 발현시키도록 트랜스펙션될 수 있다. 예를 들어, 환자로부터 채취한 종양세포는 생체외에서 GITR 작용제(예를 들어, GITR 폴리펩티드, 그의 활성 단편 및/또는 융합 단백질, 작용성 저분자 및/또는 작용성 항-GITR 항체)를 단독으로 발현하도록 지시된 또는 B7.2-유사 활성을 단독으로 가지는 웨პ티드와 조합하여 발현하도록 지시된 또는 B7.1-유사 활성을 웨პ티드 등과 접합하여 발현하도록 지시된 발현 벡터로 트랜스펙션될 수 있다. 트랜스펙션된 종양세포는 환자에게 되돌려지고, 트랜스펙션된 세포의 표면상에 웨პ티드 발현을 야기한다. 대체적으로 유전자 치료 기술은 생체내에서 트랜스펙션을 위한 종양세포를 표적화하는데 사용될 수 있다.

종양세포의 표면상에 APC 항원(예를 들어, B7.1, B7.2, 등) 활성을 가지는 웨პ티드와 병용하여 GITR 작용제(예를 들어, GITR 폴리펩티드, 그의 활성 단편 및/또는 융합 단백질, 작용성 저분자 및/또는 작용성 항-GITR 항체)의 존재는 트랜스펙션된 종양세포에 대한 T 세포-매개 면역 반응을 유도하는데 필요한 공자극 신호를 T 세포에 제공한다. 추가적으로, MHC 클래스 I 또는 MHC 클래스 II 분자를 결실한 또는 충분한 양의 MHC 클래스 I 또는 MHC 클래스 II 분자를 재발현시키는데 실패한 종양세포는 MHC 클래스 Ia 사슬 단백질 및 β2 마이크로글로불린 단백질 또는 MHC 클래스 IIa 사슬 단백질 및 MHC 클래스 IIβ 사슬 단백질(또는 인간 HLA 핵산에 대응하는)의 전부 또는 일부(예를 들어, 세포질-도메인 트런케이티드 부분)를 코딩하는 핵산으로 트랜스펙션될 수 있고, 이에 의해 세포 표면에 MHC 클래스 I 또는 MHC 클래스 II(또는 HLA 분자에 대응하는)를 발현한다. GITR 작용제(예를 들어, GITR 폴리펩티드, 그의 활성 단편 및/또는 융합 단백질, 작용성 저분자 및/또는 작용성 항-GITR 항체) 및/또는 APC 항원(예를 들어, B7.1, B7.2 등) 활성을 가지는 웨პ티드와 결합하여 적당한 클래스 I 또는 클래스 II MHC의 발현은 트랜스펙션된 종양세포에 대하여 T 세포-매개 면역반응을 유도한다. 임의적으로, 종양 연관 항원의 제시를 촉진하고 종양 특이적 면역을 유도하기 위해, 불변 사슬과 같은 MHC 클래스 II-연관 단백질의 발현을 차단하는 안티센스 구조를 코딩하는 유전자가 GITR 작용제(예를 들어, GITR 폴리펩티드, 그의 활성 단편 및/또는 융합 단백질, 작용성 저분자 및/또는 작용성 항-GITR 항체) 및/또는 APC 항원 활성을 가지는 웨პ티드를 코딩하는 DNA와 함께 또한 공트랜스펙션될 수 있다. 따라서, 인간 개체에서 T 세포-매개 면역 반응의 유도는 개체에서 종양-특이적 내성을 극복하는데 충분할 수 있다.

다른 구체예에서, 본 발명의 GITR 작용제(예를 들어, GITR 폴리펩티드, 그의 활성 단편 및/또는 융합 단백질, 작용성 저분자 및/또는 작용성 항-GITR 항체)는 백신 보강제로 사용될 수 있다. 보강제는 그 자체로 약한 면역원의 다양한 항체에 대한 면역 반응의 발달 및 프로파일을 증가시키고 및/또는 조절할 수 있는 능력을 갖는 면역 조절 화합물이다. 사이토카인 및/또는 림포카인은 보강제로 사용될 수 있다. 보강제의 적절한 선택은 보강제의 부존재하에서는 발달할 수 없는 우수한 체액 및 세포 면역 반응을 유도할 수 있다. 특히, 보강제는 백신에서 서브유니트 및 펩티드 항원에 대한 면역 반응을 증가시키는 중요한 효과를 가지고 있다. 그들의 자극 활성은 또한 단백질 항원에 대항하여 지식된 항원-특이적 면역 반응의 발달에 유익하다. 강력한 점막 반응, 높은 혈청 역가, CTR의 유도(세포독성 T 림프구) 및 활발한 세포 반응을 요구하는 다양한 항원에 대해, 보강제 및 사이토카인/림포카인 조합은 대부분의 항원 제제에 의해 제공되지 않는 자극을 제공한다.

여기에서 사용되는, 문구 “백신 보강제” 또는 “백신 치료”는 항원(예를 들어, 바이러스, 기생충 및 세균 폴리펩티드, 단백질 또는 펩티드), 또는 다른 항원(예를 들어, 종양 또는 암 세포 폴리펩티드, 단백질 또는 펩티드), 또는 항원에 대한 면역 반응을 증가, 억제 또는 그렇지 않으면 조절하는 항원을 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 병용되는 GITRL 작용제(예를 들어, GITRL 폴리뉴클레오티드, GITRL 폴리펩티드 또는 그의 활성 단편, 그의 융합 단백질, 및/또는 작용성 항-GITR 항체)의 용도를 의미한다. 이 정의에서, “병용”은 항원과 결합되거나 동시(결합 또는 비결합)에 또는 순차적으로 사용되는 것을 의미한다.

용어 “백신 보강제 조성물”주사할 수 있는 액체 용액 또는 혼탁액을 제조하는 통상적인 방법에 따라 면역학적으로 허용되는 희석제 또는 담체를 추가적으로 포함하는 백신 보강제를 지칭한다. 백신 보강제 조성물은 GITR 작용제에 의해 유도되는 면역 반응을 보다 증가시키는 물질을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 백신 보강제 조성물은 3-O-데아세틸화된 모노포스포릴 리피드 A(MPL<sup>R</sup>; Corixa Corporation, Seattle, WA) 또는 모노포스포릴 리피드 A 및 그의 유도체 및 유사체를 추가로 포함할 수 있다. MPL은 1-100 $\mu$ g/투여량 범위로 사용될 수 있다.

백신 치료에 사용되는 항원은 단백질, 펩티드 또는 면역원으로부터 유도된 폴리펩티드 및 비면역원 단백질, 그리고 다음 중의 어느 것을 포함한다: 사카라이드, 단백질, 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드, 또는 다른 매크로분자 성분, 또는 그의 단편. 이 섹션에서 사용되는 “펩티드”는 적어도 6개의 아미노산 시리즈를 포함하고 적어도 하나의 항원 결정부위를 포함하고 있으며, “폴리펩티드”는 펩티드보다 긴 분자이지만 풀-렌스 단백질을 구성하지는 않는다. 여기에서 사용되는, “단편”은 부분을 포함하지만, 사카라이드, 단백질, 폴리펩티드 또는 올리고뉴클레오티드 또는 다른 매크로분자 성분보다는 작다.

여기에서 사용되는, 용어 “유효량의 보강제 양”은 척추동물 숙주에서 증가된 면역 반응의 유도에 적합한 여기에 개시된 보강제의 병용량이다. 특정 투여량은 숙주의 나이, 체중 및 의료상태 및 항원 및 투여방법에 따라 달라질 것이다.

본 발명의 백신 보강제 조성물은 코안, 경구, 질, 직장, 비경구, 진피내, 경피(예를 들어, International application WO 98/20734를 참조, 여기에 참고자료로 포함되어 있다), 근육내, 복막내, 피하조직내, 정맥내, 동맥내 투여를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다양한 경로에 의해 인간 또는 비인간 척추동물에 투여될 수 있다. 항원 성분의 양 및 항원 조성물의 성분은 부분적으로 항원의 동정 및 개체의 나이, 체중, 및 의료상태 및 투여방법에 따라 다양하게 된다. 다시 얘기하면, 적절한 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정된다. 필수적인 것은 아니지만, 항원 및 보강제의 조합이 동시에 투여되는 것이 바람직하다. 항원 조성물에 대한 투여 횟수 및 투여 요법은 또한 당업자에 의해 쉽게 결정된다. 어떤 예에서, 병용되는 보강제의 보강 성질은 필요한 투여 횟수 또는 투여 요법의 시간 경과를 감소시킬 수 있다.

본 발명의 보강제의 병용은 광범위한 병원 미생물 유래의 광범위한 항원과 병용하여 사용하는데 적합하고, 바이러스, 세균, 진균 또는 인간 및 비인간 척추동물을 감염시키는 기생 미생물, 또는 암 또는 종양세포(예를 들어, 육종, 악성 흑색종, 림프종, 백혈병, 신경모세포종, 및 암종) 유래의 항원을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 항원은 단백질 유래의 펩티드 또는 폴리펩티드, 및 다음 중의 어느 것의 단편을 포함할 수 있다: 사카라이드, 단백질, 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드, 암 또는 종양 세포, 또는 다른 매크로분자 성분. 어떤 예에서, 하나 이상의 항원이 항원 조성물에 포함된다.

본 발명의 보강제 병용물을 포함하는 바람직한 바이러스 백신은 이에 한정되지는 않지만 Human immunodeficiency virus, Simian immunodeficiency virus, Respiratory syncytial virus, Parainfluenza virus types 1-3, Influenza virus, Herpes simplex virus, Humancytomegalovirus, Hepatitis A virus, Hepatitis B virus, Hepatitis C virus, Human papillomavirus, poliovirus, rotavirus, caliciviruses, Measles virus, Mumps virus, Rubella virus, adenovirus, rabies virus, canine distemper virus, rinderpest virus, coronavirus, parvovirus, infectious rhinotracheitis viruses, feline

leukemia virus, feline infectious peritonitis virus, avian infectious bursal disease virus, Newcastle disease virus, Marek's disease virus, porcine respiratory and reproductive syndrome virus, equine arteritis virus 및 다양한 Encephalitis viruses에 의해 야기된 질병을 예방 및/또는 치료하도록 지시된 것을 포함한다.

본 발명의 보강제 병용물을 포함하는 바람직한 세균 백신은 이에 한정되지는 않지만 *Haemophilus influenzae*(typable 및 nontypable 모두), *Haemophilus somnus*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus faecalis*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria naefai*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Bordetella pertussis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellular complex*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tetani*, *Leptospira interrogans*, *Borrelia burgdorferi*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* 및 *Mycoplasma gallisepticum*에 의해 야기된 질병을 예방 및/또는 치료하도록 지시된 것을 포함한다.

본 발명의 보강제 병용물을 포함하는 진균 병원에 대한 바람직한 백신은 이에 한정되지는 않지만 *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Candida*, *Coccidioides*, *Cryptococcus* 및 *Histoplasma*에 의해 야기된 질병을 예방 및/또는 치료하도록 지시된 것을 포함한다.

본 발명의 보강제 병용물을 포함하는 기생충에 대한 바람직한 백신은 이에 한정되지는 않지만 *Leishmania major*, *Ascaris*, *Trichuris*, *Giardia*, *Schistosoma*, *Cryptosporidium*, *Trichomonas*, *Toxoplasma gondii* 및 *Pneumocystis carinii*에 의해 야기된 질병을 예방 및/또는 치료하도록 지시된 것을 포함한다.

본 발명의 보강제 병용물을 포함하고 척추동물 숙주에서 치료적 또는 예방적 항암 효과를 유도하기 위한 바람직한 백신은 이에 한정되지는 않으나 전립선 특이 항원(PSA), 전립선-특이 막 항원(PSMA), 암배아 항원(CEA), MUC-1, Her2, CA-125, MAGE-3, EGFR, HELP, GCC, CD66-c, 프로스타신, TMRSS3, TADG 12 및 TADG 15을 포함하는 암 항원 또는 종양-연관 항원을 이용하는 것을 포함한다.

HIV 및 SIV의 경우에, 항원 조성물은 적어도 하나의 단백질, 폴리펩티드, 펩티드 또는 상기 바이러스에서 유래된 단편을 포함한다. 일부 경우에, 멀티플 HIV 또는 SIV 단백질, 폴리펩티드, 펩티드 및/또는 단편은 항원 조성물에 포함된다.

본 발명에 따른 보강제 병용 제제는 또한 폴리뉴클레오티드 백신(또한 DNA 백신으로 알려짐)내의 보강재로서의 포함률로 적합하다. 그런 백신은 부피비카인(bupivacaine)과 같은 촉진제(facilitating agent)를 추가로 포함할 수 있다(U.S. Patent No. 5,593, 972를 참고, 여기에 참고자료로 포함되었다).

1) 항원 표시 세포 기능(예를 들어, 수지세포 기능)을 자극; 2) 환자로부터 T 세포를 제거하고, 그것을 생체외에서 공자극 하며, 개체에 재이식; 3) 종양 면역을 유도하도록 종양세포를 트랜스페션; 및 4) 백신 보강제를 이용하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, Cerundolo et al. (2004) Dendritic cells: a journey from laboratory to clinic. Nat.Immunol. 5(1) : 7-10; Ko et al. (2003) Immunotherapy of malignant diseases. Int. Arch.Allergy Immunol. 132: 294-309; Valmori et al. (1999) An antigen-targeted approach to adoptive transfer therapy of cancer.Cancer Res. 59: 2167- 73를 참조).

#### 면역 세포 활성을 감소시키는 GITR 길항제의 용도

다른 측면으로, 본 발명은 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 조절 T 세포에 의한 억제에 대해 작동 T 세포(예를 들어, CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포, 또는 그의 집단)의 감수성을 유지하는 방법을 특징으로 한다. 상기 방법은 T 세포 집단을 면역세포 또는 집단의 활성을 저해하는데 충분한 양의 GITR 길항제(예를 들어, GITRL 저해 폴리뉴클레오티드, 길항성 저분자, 중화 항-GITR 항체 및/또는 중화 항-GITRL 항체)와 접촉시키는 것을 포함한다. GITR 길항제는 또한 면역 반응의 억제가 요구되는 개체에 투여될 수 있다. 이러 상태는 예를 들어 자가면역 질병(예를 들어, 관절염성 질병), 염증성 질병 또는 기관 이식을 포함한다.

이런 방법은 적어도 부분적으로 GITR 활성의 감소(예를 들어, 중화 항-GITRL 항체를 이용함으로써)가 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-매개 억제를 보존한다는 발견에 기초한다(실시예 13)(즉, 중화 항-GITRL 항체가 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 조절 T 세포에 의한 억제에

대해 작동 T 세포(예를 들어, CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포)의 감수성을 유지시킨다). 추가적으로, 본 출원인은 중화 항-GITRL 항체와 작동 T 세포의 배양이 뮤린 실험 자가면역 뇌염(EAE)에서 증상을 개선시킴을 알았다(실시예 14). 따라서, GITR 길항제(즉, GITR 활성을 저해하는 분자(예를 들어, 항-GITRL 항체))가 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포에 의한 억제에 대해 작동 T 세포의 감수성의 생체내 유지(예를 들어, 이식거부, 염증성 질병 및 자가면역 질병을 포함하는 면역 세포-연관 질병을 치료 또는 예방하는데)에 사용될 수 있다.

GITR 길항제를 이용하는 방법은 또한 작동 T 세포의 활성(예를 들어, 증식, 분화, 생존)을 저해하는데 사용될 수 있고, 따라서 다양한 면역 질병을 치료 또는 예방하는데 사용될 수 있다. 치료 또는 예방될 수 있는 질병의 비제한적인 예는 다음을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다: 이식거부, 자가면역 질병(예를 들어, 당뇨병, 관절염(류마티스 관절염, 연소성 류마티스 관절염, 골관절염, 건선 관절염을 포함), 다발 경화증, 뇌척수염, 중증 근육 무력증, 전신 홍반 루프스, 자가면역성 갑상선염, 피부염(아토피성 피부염 및 습진 피부염을 포함), 건선, 쇼그렌 증후군, 크론병, 아프타궤양, 홍채염, 결막염, 각막 결막염, 궤양 대장염, 척추 관절병증, 강직 척추염, 내인 천식, 알레르기 천식, 피부 홍반선 루프스, 공피증, 질염, 직장염, 약물 발진, 나병 역전반응, 나병 결절홍반, 자가면역 포도막염, 알레르기 뇌척수염, 급성 괴사출혈성 뇌병증, 특발성 양쪽 진행성 감각 신경 난청, 재생불량 빈현, 진정 적혈구계 빈혈, 특발성 혈소판 감소증, 다발 연골염, 베게너 육아종증, 만성 활동 간염, 스터븐스-존슨 증후군, 특발 스프루, 편평태선, 그레이브스병, 사코이드증, 원발 쓸개관 간경화증, 후부 포도막염, 및 간질성 폐 섬유증), 이식-대-숙주 병, 및 아토피성 알레르기와 같은 알레르기.

GITR 길항제(예를 들어, 중화 GITRL 항체)의 투여를 포함하는 방법을 이용하여 치료될 수 있는 바람직한 질병은 관절염 질병(예를 들어, 류마티스 관절염, 연소성 류마티스 관절염, 골관절염, 건선 관절염, 및 강직 척추염(바람직하게는, 류마티스 관절염)), 다발 경화증, 타입 I 당뇨병, 루프스 (SLE), IBD, 크론병, 천식, 혈관염, 알레르기, 공피증 및 건선을 포함한다.

다른 구체예에서, GITR 길항제는 단독으로 또는 여기에 기재된 다른 치료제(예를 들어, TNF 길항제)와 병용하여 다발 공수종 및 관련 B 림프 악성(Brenne, A. et al. (2002) Blood 99 (10): 3756-62)을 치료하는데 사용될 수 있다.

GITR 길항제(예를 들어, GITRL 저해 폴리뉴클레오티드, 길항성 저분자 및/또는 GITR 및/또는 GITRL에 대한 중화 항체)를 이용하여, 다양한 방법으로 면역 반응을 조절하는 것이 가능하다. 하향조절은 이미 진행중인 면역반응을 저해하거나 차단하는 형태이고, 면역반응의 유도를 차단하는 것을 포함할 수 있다. 활성화된 T 세포의 기능은 T 세포 반응의 억제 증가 또는 T 세포에서 특이 내성의 유도에 의해 또는 양자 모두에 의해 저해될 수 있다. T 세포 반응의 면역억제는 일반적으로 활성, 비-항원-특이 반응이고 T 세포를 억제물질에 계속적으로 노출할 것을 요구한다. T 세포에서 비반응 또는 무반응의 유도를 포함하는 내성은 일반적으로 항원-특이적이고, 내성물질에 대한 노출이 중단된 뒤에도 지속된다는 점에서 면역억제와 구별된다. 실제로는, 내성은 내성물질의 부존재하에서 특이 항원에 대한 재노출시에 T 세포의 무반응으로 설명된다.

항원 표시 세포 항원(예를 들어, B7.1)의 하나 이상의 기능을 하향조절 또는 차단하는 것 및 따라서 활성화된 T 세포에 의한 높은 수준의 림포카인 합성을 차단하는 것은 조직, 피부 및 기관 이식의 상태 및 이식-대-숙주 병(GVHD)에 유용할 것이다. 예를 들어, T 세포 기능의 차단은 조직 이식시에 감소된 조직 파괴를 나타낼 것이다. 전형적으로, 조직 이식에서, 이식 거부는 T 세포에 의해 외래 물질로 인식되는 것을 통해 시작되고, 이어지는 면역 반응에 의해 이식물이 파괴된다. 이식 전에 GITR 길항제(예를 들어, GITRL 저해 폴리뉴클레오티드, 길항성 저분자, 중화 항-GITR 항체 및/또는 중화 항-GITRL 항체)를 B7 림프구 항원과 면역세포상의 그의 천연 리간드(들)(B7.2 활성을 가지는 웨티드의 수용성 모노머 형태 단독으로, 또는 다른 B 림프구 항원(예를 들어, B7.1) 또는 차단(blocking) 항체의 활성을 가지는 웨티드의 모노머 형태와 결합하여)와의 상호작용을 저 또는 차단하는 물질과 병용하여 투여하는 것은 대응하는 공자극 신호의 전달 없이 면역세포상의 천연 면역세포에 상기 분자의 결합을 유도할 수 있다. 이러한 방식으로 B7 림프구 항원 기능을 차단하는 것은 작동 T 세포와 같은 면역 세포에 의한 사이토카인 합성을 차단하고, 따라서, 면역억제제로서 작용한다. 더욱이, 또한 공자극의 부재는 T 세포를 무반응하게 만들기에 충분하고, 이에 의해 개체에서 내성을 유도한다. B7 림프구 항원-차단제에 의한 장기간의 내성 유도는 이러한 차단제의 반복 투여 필요성을 없앨 수 있다. 개체에서 충분한 면역 억제 또는 내성을 성취하기 위해, B 림프구 항원의 조합 기능을 차단하는 것이 또한 필요하다.

기관 이식거부 또는 GVHD를 예방하는 특정 차단제의 효과는 인간에서의 효과를 예측하게 하는 동물 모델을 이용하여 평가될 수 있다. 사용되는 적절한 계의 예는 래트의 동종간 심장 이식 및 마우스에서 이종간 이자섬 세포 이식을 포함하고, 양자는 Lenschow et al. (1992) Science 257: 789-92 and Turka et al. (1992) Proc.Natl.Acad. Sci. USA 89: 11102-05에 기재되어 있는 것처럼 생체내 CTLA4Ig 융합 단백질의 면역억제 효과를 시험하기 위해 사용되어 왔다. 추가적으로, GVHD에 대한 뮤린 모델(Paul, ed., Fundamental Immunology, Raven Press, New York, 1989, pp. 846-47를 참조)이 상기 질병의 발달시에 B 림프구 항원 기능의 생체내 차단 효과를 결정하기 위해 사용될 수 있다.

APC 항원 기능의 차단은 또한 자가면역 질병을 치료하는데 치료학적으로 유용할 수 있다. 많은 자가면역 질병이 자기 조직에 대해 반응하는 T 세포의 부적절한 활성화의 결과이고, 질병의 병리에 관련된 사이토카인 및 자가항체의 생산을 촉진한다. 자가반응 T 세포의 활성화 차단은 질병 증상을 완화할 수 있다. APC 항원의 수용체:리간드 상호작용을 파괴함으로써 T 세포의 공자극을 차단하는 약물과 병용하여, GITR 길항제(예를 들어, GITRL 저해 폴리뉴클레오티드, 길항성 저분자, 및/또는 GITR 및/또는 GITRL에 대한 중화 항체)의 투여가 T 세포 활성화를 저해하고, 질병단계에 포함될 수 있는 자가항체 또는 T 세포-유도된 사이토카인의 생산을 차단하는데 사용될 수 있다. 추가적으로, 차단제와 병용하여 GITR 길항제(예를 들어, GITRL 저해 폴리뉴클레오티드, 길항성 저분자, 및/또는 GITR 및/또는 GITRL에 대한 중화 항체)는 자가활성 T 세포의 항원-특이 내성을 유도할 수 있고, 이것은 질병으로부터 장기간의 구제를 유도할 수 있다. 자가면역 질병을 예방하거나 완화하는 이러한 약물을 효과는 인간 자가면역 질병에 대해 잘 특성화된 수많은 동물 모델을 이용하여 결정될 수 있다. 이들의 예는 뮤린 실험 자가면역 뇌염(EAE), MRL/lpr/lpr 마우스 또는 NZB 하이브리드 마우스에서 전신 홍반 루프스, 뮤린 자가면역 콜라겐 관절염, NOD 마우스 및 BB 래트의 당뇨병, 및 뮤린 실험 중증 근육 무력증을 포함한다(예를 들어, Paul,ed., Fundamental Immunology, Raven Press, New York, 1989, pp.840-56를 참조).

한 구체예에서, GITR 길항제(예를 들어, GITRL 저해 폴리뉴클레오티드, 길항성 저분자, 및/또는 GITR 및/또는 GITRL에 대한 중화 항체)(그의 약제학적 조성물을 포함)는 병용요법으로 투여될 수 있다, 즉 다른 약물(예를 들어, 자가면역 질병 및 염증성 질병과 같은 병리상태 또는 질병을 치료하는데 유용한 치료제)과 함께 투여된다. 본 명세서중에서, 용어 “병용하여”는 약제가 실질적으로 동시에(동시에 또는 순차적)에 투여되는 것을 의미한다. 순차적으로 투여된다면, 제2 화합물 투여시에 두화합물 중 제1 화합물은 바람직하게는 유효농도로 치료부위에서 여전히 검출될 수 있다.

예를 들어, 병용요법은 하나 이상의 GITR 길항제(예를 들어, GITRL 저해 폴리뉴클레오티드, 길항성 저분자, 및/또는 GITR 및/또는 GITRL에 대한 중화 항체), 함께 조제되거나 및/또는 함께 투여되는 하나 이상의 추가적인 치료제(예를 들어, 뒤에 자세하게 기재되는 하나 이상의 사이토카인 및 성장 인자 저해제, 면역 억제제, 항-염증성 약물, 대사 저해제, 효소 저해제 및/또는 세포독성제 또는 세포증식 억제제)를 포함할 수 있다. 나아가, 여기에 기재된 하나 이상의 GITR 길항제(예를 들어, GITRL 저해 폴리뉴클레오티드, 길항성 저분자, 및/또는 GITR 및/또는 GITRL에 대한 중화 항체)는 여기에 기재된 둘 이상의 치료제와 병용하여 사용될 수 있다. 이런 병용 치료는 유익하게도 투여 치료제를 적은 양 이용할 수 있게 함으로써, 가능한 독성 또는 다양한 단일요법과 관련된 복합증을 피하게 한다. 더욱이, 여기에 개시된 치료제는 GITRL 수용체 경로의 서로 다른 경로에 작용하고, 따라서, GITR 길항제의 효과를 증가시키거나 상승작용을 할 것으로 예측된다(즉, 여기에서 작용 T 세포는 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 조절 T 세포에 의한 억제에 대해 감수성을 유지한다).

GITRL 길항제와 병용하여 사용되는 바람직한 치료제는 자가면역 및 이어지는 염증 반응의 서로 다른 단계에 간섭하는 약물이다. 한 구체예에서, 여기에 기재된 하나 이상의 GITR 길항제(예를 들어, GITRL 저해 폴리뉴클레오티드, 길항성 저분자, 및/또는 GITR 및/또는 GITRL에 대한 중화 항체)는 다른 사이토카인 또는 성장 인자 길항제(예를 들어, 수용성 수용체, 웨티드 저해제, 저분자, 리간드 융합물); 또는 다른 표적에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편(예를 들어, 다른 사이토카인 또는 성장 인자에 결합하는 항체, 그의 수용체, 또는 다른 세포 표면 분자); 및 항-염증성 사이토카인 또는 그의 작용제와 같은 하나 이상의 추가적 약물과 함께 제제되거나 및/또는 함께 투여될 수 있다. 여기에 기재된 GITR 길항제(예를 들어, GITRL 저해 폴리뉴클레오티드, 길항성 저분자, 및/또는 GITR 및/또는 GITRL에 대한 중화 항체)와 병용하여 사용될 수 있는 약물의 비제한적인 예는 하나 이상의 인터루틴(ILs)의 길항제 또는 그의 수용체(예를 들어, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, 및 IL-22의 길항제); 종양괴사인자(TNF), LT, EMAP-II, GM-CSF, FGF 및 PDGF와 같은 사이토카인 또는 성장 인자의 길항제 또는 그의 수용체를 포함한다. GITR 길항제(예를 들어, GITRL 저해 폴리뉴클레오티드, 길항성 저분자, 및/또는 GITR 및/또는 GITRL에 대한 중화 항체)는 또한 예를 들어 CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, 또는 그들의 리간드(CD154 (gp39 또는 CD40L)을 포함), 또는 LFA-1/ICAM-1 및 VLA-4/VCAM-1와 같은 세포 표면 분자에 대한 항체의 저해제와 병용될 수 있다(Yusuf-Makgiansar et al. (2002) Med. Res. Rev. 22: 146-67). 여기에 기재된 GITR 길항제(예를 들어, GITRL 저해 폴리뉴클레오티드, 길항성 저분자, 및/또는 GITR 및/또는 GITRL에 대한 중화 항체)와 병용하여 사용될 수 있는 바람직한 길항제는 IL-1, IL-12, TNFa, IL-15, IL-17, IL-18, 및 IL-22의 길항제를 포함한다.

그런 약물의 예는 IL-12(바람직하게는 인간 IL-12)에 결합하는 키메라, 인간화된, 인간 또는 시험관내 생성된 항체 (또는 그의 항원 결합 단편)와 같은 IL-12 길항제(예를 들어, WO 00/56772에 개시된 항체); IL-12 수용체 저해제, 예를 들어 인간 IL-12 수용체에 대한 항체; 및 IL-12 수용체(예를 들어, 인간 IL-12 수용체)의 수용성 단편. IL-15 길항제의 예는 IL-15 또는 그의 수용체에 대한 항체 (또는 그의 항원 결합 단편), 예를 들어 키메라, 인간화된, 인간 또는 시험관내 생성된 인간 IL-15 (또는 그의 항원 결합 단편) 또는 그의 수용체에 대한 항체, IL-15 수용체의 수용성 단편 및 IL-15 결합 단백질을 포함한다. IL-18 길항제의 예는 IL-18 또는 그의 수용체에 대한 항체 (또는 그의 항원 결합 단편), 예를 들어 키메라, 인간

화된, 인간 또는 시험관내 생성된 인간 IL-18 (또는 그의 항원 결합 단편) 또는 그의 수용체에 대한 항체, IL-18 수용체의 수용성 단편 및 IL-18 결합 단백질(IL-18BP, Mallet et al. (2001) Circ. Res.28)을 포함한다. IL-1 길항제의 예는 Vx740, IL-1 길항제 같은 인터루킨-1-전환-효소(ICE) 저해제, 예를 들어 IL-1RA (Anakinra, Amgen), sIL1RII (Immunex), 및 항-IL-1 수용체 항체 (또는 그의 항원 결합 단편)을 포함한다.

TNF 길항제의 예는 D2E7, (인간 TNFa 항체, U.S. 6,258,562), CDP- 571/CDP-870/BAY-10-3356 (인간화된 항-TNFa 항체; Celltech/Pharmacia), cA2 (키메라 항-TNFa 항체; RemicadeTM, Centocor)와 같은 TNF(예를 들어, 인간 TNFa)에 대한 키메라, 인간화된, 인간 또는 시험관내 생성된 항체 (또는 그의 항원 결합 단편); 항-TNF 항체 단편 (예를 들어, CPD870); TNF 수용체의 수용성 단편, 예를 들어 p55 또는 p75 인간 TNF 수용체 또는 그의 유도체, 예를 들어 75 kdTNFR-IgG (75 kD TNF 수용체-IgG 융합 단백질, Enbrel<sup>TM</sup>; Immunex; 예를 들어, Arthritis & Rheumatism (1994) 37: S295; J. Invest. Med. (1996) 44: 235A를 참조, p55 kdTNFR-IgG (55 kD TNF 수용체-IgG 융합 단백질 (Lenercept); 효소 길항제, 예를 들어 TNFa 전환 효소(TACE) 저해제 (예를 들어, 알파-설포하이드록사믹 애시드 유도체, WO 01/55112, 및 N-히드록시포름아미드 TACE 저해제 GW 3333, -005, 또는 -022); 및 TNF-bp/s-TNFR (수용성 TNF 결합 단백질; 예를 들어, Arthritis & Rheumatism (1996) 39 (9) (supplement): S284; Amer. J.Physiol.-Heart and Circulatory Physiology (1995) 268: 37-42를 참조)를 포함한다. 바람직한 TNF 길항제는 TNF 수용체의 수용성 단편이고, 예를 들어 p55 또는 p75 인간 TNF 수용체 또는 그의 유도체(예를 들어, 75 kdTNFR-IgG, 및 TNFa 전환효소 (TACE) 저해제)이다.

한 구체예에서, 여기에 기재된 GITR 길항제는 다음 중의 하나 이상과 병용하여 투여될 수 있다: IL-13 길항제, 예를 들어 수용성 IL-13 길항제 (sIL-13) 및/또는 IL-13에 대한 항체; IL-2 길항제, 예를 들어 DAB 486-IL-2 및/또는 DAB 389-IL-2 (IL-2 융합 단백질; Seragen; 예를 들어, Arthritis & Rheumatism (1993) 36: 1223을 참조), 및/또는 IL-2R에 대한 항체, 예를 들어 항-Tac (인간화된 항-IL-2R; Protein Design Labs, Cancer Res. (1990) 50 (5): 1495-502). 또한, 다른 병용물은 GITR 길항제(예를 들어, GITRL 저해 폴리뉴클레오티드, 길항성 저분자, 및/또는 GITR 및/또는 GITRL에 대한 중화 항체)과 비고갈 항-CD4 저해제(IDECA-CE9, 1/SB 210396; 비고갈 프리마타이즈드(primatized) 항-CD4 항체; IDEC/SmithKline)을 병용하는 것을 포함한다. 또 다른 바람직한 병용물은 공자극 경로 CD80 (B7.1) 또는 CD86 (B7.2)의 길항제(항체, 수용성 수용체 또는 길항성 리간드 포함); 및 p-셀렉틴 글리코단백질 리간드 (PSGL), 항-염증성 사이토카인, 예를 들어 IL-4 (DNAZ/Schering); IL-10 (SCH 52000; 재조합 IL-10 DNAZ/Schering); IL-13 및 TGF-P, 및 그의 작용제(예를 들어, 작용제 항체)를 포함한다.

다른 구체예에서, 하나 이상의 GITR 길항제는 하나 이상의 항-염증성 약물, 면역 억제제, 대상 저해제 또는 효소 저해제와 함께 조제되거나 및/또는 함께 투여될 수 있다. 여기에 기재된 GITR 길항제(예를 들어, GITRL 저해 폴리뉴클레오티드, 길항성 저분자, 및/또는 GITR 및/또는 GITRL에 대한 중화 항체)와 병용하여 사용될 수 있는 약물 또는 저해제의 비제한적인 예는 이에 제한되지는 않으나 다음중의 하나를 포함한다: 비스테로이드 항-염증성 약물(들)(NSAIDs), 예를 들어 이부프로펜, 테니답(예를 들어, Arthritis & Rheumatism (1996) 39 (9) (supplement): S280), 나프록센 (예를 들어, Neuro. Report (1996) 7: 1209-13), 멜록시캄, 피록시캄, 디클로페낙, 및 인도메타신; 셀파살라진 (예를 들어, Arthritis & Rheumatism (1996) 39 (9) (supplement) :S281); 프레디솔론과 같은 코르티코스테로이드; 사이토카인 억제 항-염증성 약물(들) (CSAIDs); 뉴클레오티드 생합성 억제제, 예를 들어 퓨린 생합성 억제제, 염산 길항제 (예를 들어, 메토트렉세이트 (N-[4-[(2,4-디아미노-6-프테리디닐)메틸]메틸아미노]벤조일]-L-글루탐산); 및 피리딘 생합성 저해제, 예를 들어 디하이드로오로테이트 데하이드로제나아제(DHODH) 저해제 (예를 들어, 레플루노미드(예를 들어, Arthritis & Rheumatism (1996) Vol.39, No. 9 (supplement), S131; Inflammation Research (1996) 45: 103-07). GITR 길항제 (예를 들어, GITRL 저해 폴리뉴클레오티드, 길항성 저분자, 및/또는 GITR 및/또는 GITRL에 대한 중화 항체)와 병용하여 사용되는 바람직한 치료제는 NSAIDs, CSAIDs, (DHODH) 저해제 (예를 들어, 레플루노미드), 및 염산 길항제 (예를 들어, 메토트렉세이트)를 포함한다.

저해제의 추가적인 예가 다음중의 하나 이상을 포함한다: 코르티코스테로이드 (경구, 흡입 및 국소주사); 면역 억제제, 예를 들어 사이클로스포린, 타크롤리무스 (FK-506); 및 mTOR 저해제, 예를 들어 시롤리무스 (라파마이신) 또는 라파마이신 유도체, 예를 들어 수용성 라파마이신 유도체 (예를 들어, 에스터 라파마이신 유도체, 예를 들어, CCI-779 (Elit (2002) Current Opinion Investig. Drugs 3 (8): 1249-53; Huang et al. (2002) Current Opinion Investig. Drugs 3 (2): 295-304); TNFa 또는 IL-1와 같이 전염증성 사이토카인에 의한 신호에 간섭하는 약물 (예를 들어, IRAK, NIK, IKK, p38 또는 MAP 키나아제 저해제); COX2 저해제, 예를 들어 셀레콕시브, 로페콕시브, 및 그의 변이체, 예를 들어 Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S81); 포스포디에스터라아제 저해제, 예를 들어 R973401 (포스포디에스터라아제 타입 IV 저해제; 예를 들어 Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S282); 포스포리파아제 저해제, 예를 들어 세포질 포스포리파아제2 (cPLA2)의 저해제 (예를 들어, 트리플루오로메틸 케톤 유사체 (U.S.

6,350,892)); 혈관 내피 세포 성장인자 또는 성장 인자 수용체의 저해제, 예를 들어 VEGF 저해제 및/또는 VEGF-R 저해제; 및 혈관신생의 저해제. GITR 길항제(예를 들어, GITRL 저해 폴리뉴클레오티드, 길항성 저분자, 및/또는 GITR 및/또는 GITRL에 대한 중화 항체)와 병용하여 사용되는 바람직한 치료제는 면역 억제제, 예를 들어 사이클로스포린, 타크롤리무스(FK- 506); mTOR 저해제, 예를 들어 시롤리무스(라파마이신) 또는 라파마이신 유도체, 예를 들어 수용성 라파마이신 유도체(예를 들어, 에스터 라파마이신 유도체, 예를 들어, CCI- 779); COX2 저해제, 예를 들어 셀레콕시브 및 그의 변이체; 및 포스포리파아제 저해제, 예를 들어 세포질 포스포리파아제2(cPLA2)의 저해제, 예를 들어, 트리플루오로메틸 케톤 유사체이다.

GITRL 길항제와 병용되어 사용될 수 있는 치료제의 추가적인 예는 다음 중의 하나 이상을 포함한다: 6-머캅토퓨린(6-MP); 아자티오프린 설파살라진; 메살라진; 올살라진 클로로퀴닌/하이드록시클로로퀸; 펜실라민; 아우로티오르날레이트(근육내 및 경구); 아자티오프린; 코키신; 베타-2 아데노수용체 작용제(살부타몰, 테르부탈린, 살메테랄); 크산틴(테오필린, 아미노필린); 크로모글리케이트; 네도크로밀; 캐토티펜; 이프라트로피움 및 옥시트로피움; 마이코페놀레이트 모페틸; 아데노신 작용제; 항혈전제; 보체 저해제; 및 아드레날린성 약제.

특정 면역 질병을 치료 또는 예방하기 위해 다른 치료제와 병용하는 여기에 개시된 GITR 길항제의 용도는 뒤에서 더 자세히 논의될 것이다.

GITR 길항제와 병용하여 사용될 수 있는 관절염 질병(예를 들어, 류마티스 관절염, 염증성 관절염, 류마티스 관절염, 연소성 류마티스 관절염, 골관절염 및 건선 관절염)의 치료 또는 예방용 약물의 비제한적인 예는 다음 중의 하나 이상을 포함한다: 여기에 개시된 것과 같은 IL-12 길항제, NSAIDs; CSAIDs; 여기에 개시된 것과 같은 TNFs(예를 들어 TNFa) 길항제; 여기에 개시된 것과 같은 비고갈 항-CD4 항체; 여기에 개시된 것과 같은 IL-2 길항제; 항-염증성 사이토카인, 예를 들어 IL-4, IL-10, IL-13 및 TGFa, 또는 그의 작용제; 여기에 개시된 것과 같은 IL-1 또는 IL-1 수용체 길항제; 여기에 개시된 것과 같은 포스포디에스터라아제 저해제; 여기에 개시된 것과 같은 COX-2 저해제; 일로프로스트(예를 들어, Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S82); 메토트렉세이트; 탈리로미드(예를 들어, Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S282) 및 탈리로미드-관련 약물(예를 들어, Celgen); 레플루노미드; 플라스미노겐 활성화 저해제, 예를 들어 트라넥사믹 애시드; 예를 들어, Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S284); 사이토카인 저해제, 예를 들어 T-614; 예를 들어, Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S282); 프로스타글란딘 E1(예를 들어, Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S282); 아자티오프린(예를 들어, Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S281); 인터루킨-1 전환 효소(ICE)의 저해제; zap-70 및/또는 Ick 저해제(저해제 of the 티로신 키나아제 zap-70 또는 Ick의 저해제); 여기에 개시된 것과 같은 혈관 내피 세포 성장인자 또는 혈관 내피 세포 성장인자 수용체의 저해제; 여기에 개시된 것과 같은 혈관신생의 저해제; 코르티코스테로이드 항-염증성 약물(예를 들어, SB203580); TNF-컨버타제 저해제; IL-11(예를 들어, Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S296); IL-13(예를 들어, Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S308); IL-17 저해제(예를 들어, Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S120); 금; 페니실라민; 클로로퀸; 하이드록시클로로퀸; 클로람부실; 사이클로포스파미드; 사이클로스포린; 전립프 조사; 항 가슴세포 글로불린; CD5-독소; 경구 투여되는 웨티드 및 콜라겐; 로벤자리드 디소듐; 사이토카인 조절제(CRAs) HP228 및 HP466(Houghton Pharmaceuticals, Inc.); ICAM-1 안티센스 포스포로티오에이트 올리고데옥시뉴클레오티드(ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); 수용성 보체 수용체 1(TP10; T Cell Sciences, Inc.); 프레드니손; 오르고테인; 글리코아미노글리칸 폴리설페이트; 미노사이클린; 항-IL2R 항체; 해산 및 식물 리피드(생선 및 식물 종자 지방산; 예를 들어, DeLuca et al. (1995) Rheum. Dis. Clin. North Am. 21: 759-772를 참조); 아루라노핀; 폐닐부타존; 메클로페나미카시드; 플루페남산; 정맥내 면역 글로불린; 질레우톤; 마이코페놀산(RS-61443); 타크롤리무스(FK-506); 시롤리무스(라파마이신); 아미프릴로스(테라페틴); 클라드리빈(2-클로로데옥시아데노신); 및 아자리빈. 바람직한 병용물은 하나 이상의 GITR 길항제(예를 들어, GITRL 저해 폴리뉴클레오티드, 길항성 저분자, 및/또는 GITR 및/또는 GITRL에 대한 중화 항체)와 병용하여 메토트렉세이트 또는 레플루노미드를 포함하고, 온화한 또는 심각한 류마티스 관절염의 경우에는 사이클로스포린을 병용한다.

관절염 질병을 치료하기 위해 GITR 길항제와 병용하여 사용되는 저해제의 바람직한 예는 다음을 포함한다: TNF 길항제(예를 들어, TNF에 결합하는 키메라, 인간화된, 인간 또는 시험관내-생성된 항체, 또는 그의 항원 결합 단편; TNF 수용체의 수용성 단편, 예를 들어 p55 또는 p75 인간 TNF 수용체 또는 그의 유도체, 예를 들어 75 kdTNFR-IgG(75 kD TNF 수용체-IgG 융합 단백질, Enbrel<sup>TM</sup>), p55 kD TNF 수용체-IgG 융합 단백질; TNF 효소 길항제, 예를 들어 TNFa 전환 효소(TACE) 저해제); IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-22의 길항제; T 세포 및 B 세포-고갈 약제(예를 들어, 항-CD4 또는 항-CD22 항체); 저분자 저해제, 예를 들어 메토트렉세이트 및 레플루노미드; 시롤리무스(라파마이신) 및 그의 유도체, 예를 들어 CCI-779; cox-2 및 cPLA2 저해제; NSAIDs; p38 저해제, TPL-2, Mk-2 및 NFkb 저해제; RAGE 또는 수용성

RAGE; P-셀렉틴 또는 PSGL-1 저해제(예를 들어, 저분자 저해제, 그에 대한 항체, 예를 들어 P-셀렉틴에 대한 항체); 에스트로겐 수용체 베타(ERB) 작용제 또는 ERB-NFkb 길항제. 하나 이상의 GITR 길항제(예를 들어, GITRL 저해 폴리뉴클레오티드, 길항성 저분자, 및/또는 GITR 및/또는 GITRL에 대한 중화 항체)와 함께 조제되거나 및/또는 함께 투여될 수 있는 가장 바람직한 추가 치료제는 다음중의 하나를 포함한다: TNF 수용체의 수용성 단편, 예를 들어 p55 또는 p75 인간 TNF 수용체 또는 그의 유도체, 예를 들어 75 kdTNFR-IgG (75 kD TNF 수용체-IgG 융합 단백질, Enbrel<sup>TM</sup>); 메토트렉세이트, 레플루노미드, 또는 시롤리무스 (라파마이신) 또는 그의 유사체, 예를 들어 CCI-779.

GITR 길항제와 병용하여 사용될 수 있는 다발 경화증의 치료 또는 예방용 약물의 비제한적인 예는 다음을 포함한다: 인터페론, 예를 들어 인터페론-알파1a (예를 들어, Avonex<sup>TM</sup>; Biogen) 및 인터페론-1b(Betaseron<sup>TM</sup>; Chiron/Berlex); 공중합체 1(Cop-1; 코팍손; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); 고압 산소; 정맥내 이뮤노글로불린; 클라드리빈; 여기에 기재된 TNF 길항제; 코르티코스테로이드; 프레드니솔론; 메틸프레드니솔론; 아자티오프린; 사이클로포스파미드; 사이클로스포린; 메토트렉세이트; 4-아미노피리딘; 및 티자니딘.

GITR 길항제(예를 들어, GITRL 저해 폴리뉴클레오티드, 길항성 저분자, 및/또는 GITR 및/또는 GITRL에 대한 중화 항체)와 병용하여 사용될 수 있는 추가적인 길항제는 인간 사이토카인 또는 성장인자에 대한 항체 또는 길항제, 예를 들어 TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12 IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-11, GM-CSF, FGF, 및 PDGF를 포함한다. 여기에 기재된 GITR 길항제(예를 들어, GITRL 저해 폴리뉴클레오티드, 길항성 저분자, 및/또는 GITR 및/또는 GITRL에 대한 중화 항체)는 CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 또는 그들의 리간드와 같은 다른 세포 표면 분자에 대한 항체와 병용하여 사용될 수 있다. 또한, GITR 길항제(예를 들어, GITRL 저해 폴리뉴클레오티드, 길항성 저분자, 및/또는 GITR 및/또는 GITRL에 대한 중화 항체)는 여기에 기재된 메토트렉세이트, 사이클로스포린, FK506, 라파마이신, 마이코페놀레이트 모페틸, 레플루노미드, NSAIDs, 예를 들어, 이부프로펜, 프레드니솔론과 같은 코르티코스테로이드, 포스포디에스터라아제 저해제, 아데노신 작용제, 항혈전제, 보체 저해제, 아드레날린성 약제, 여기에 기재된 전염증성 사이토카인에 의한 신호를 간섭하는 약제, IL-1b 전환 효소 저해제 (예를 들어, Vx740), 항-P7s, PSGL, TACE 저해제, 키나아제 저해제와 같은 T 세포 신호 저해제, 메탈 로프로티나아제 저해제, 설파살라진, 아자티오프린, 6-머캅토퓨린, 안지오텐신 전환 효소 저해제, 수용성 사이토카인 수용체 및 그의 유도체, 및 항-염증성 사이토카인 (예를 들어, IL-4, IL-10, IL-13 및 TGF)과 같은 약물과 병용될 수 있다.

GITR 길항제(예를 들어, GITRL 저해 폴리뉴클레오티드, 길항성 저분자, 및/또는 GITR 및/또는 GITRL에 대한 중화 항체)와 병용되어 사용될 수 있는 다발 경화증 치료제의 바람직한 예는 인터페론-b, 예를 들어, IFNb-1a 및 IFNb-1b; 코팍손, 코르티코스테로이드, IL-1 저해제, TNF 저해제, CD40 리간드 및 CD80에 대한 항체, 및 IL-12 길항제를 포함한다.

GITR 길항제(예를 들어, GITRL 저해 폴리뉴클레오티드, 길항성 저분자, 및/또는 GITR 및/또는 GITRL에 대한 중화 항체)와 병용하여 사용될 수 있는 창자병(예를 들어, 크론병, 궤양 대장염)의 치료 또는 예방용 약물의 비제한적인 예는 다음을 포함한다: 부데노시드; 표피 성장인자; 코르티코스테로이드; 사이클로스포린, 설파살라진; 아미노살리실레이트; 6-머캅토퓨린; 아자티오프린; 메트로니다졸; 리폭시제나아제 저해제; 메살라민; 올살라진; 발살라지드; 항산화제; 트롬복산 저해제; IL-1 수용체 길항제; 항-IL-1 모노클로날 항체; 항-IL-6 모노클로날 항체; 성장인자; 엘라스타제 저해제; 피리디닐-이미다졸 화합물; 여기에 기재된 TNF 길항제; IL-4, IL-10, IL-13 및/또는 TGFb 사이토카인 또는 그의 작용제 (예를 들어, 작용제 항체); IL-11; 프레드리솔론, 텍사메타손 또는 부데소니드의 글루쿠로니드- 또는 엑스트란- 접합 프로드럭; ICAM-1 안티센스 포스포로티오에이트 올리고데옥시뉴클레오티드(ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); 수용성 보체 수용체 1 (TP10; T Cell Sciences, Inc.); 슬로우-릴리즈(slow-release) 메살라진; 메토트렉세이트; 혈소판 활성 인자(PAF)의 길항제; 시프로폴록사신; 및 리그노카인.

한 구체예에서, GITR 길항제(예를 들어, GITRL 저해 폴리뉴클레오티드, 길항성 저분자, 중화 항-GITR 항체 및/또는 중화 항-GITRL 항체)는 예를 들어 이식거부 또는 이식-대-숙주병 과 같은 면역 반응 조절에 관련된 다른 표적에 대해 지시된 하나 이상의 항체와 병용하여 사용될 수 있다. 본 발명의 GITR 길항제(예를 들어, GITRL 저해 폴리뉴클레오티드, 길항성 저분자, 중화 항-GITR 항체 및/또는 중화 항-GITRL 항체)와 병용하여 사용될 수 있는 면역 반응의 치료 또는 예방용 약제의 비제한적인 예는 다음을 포함한다: 다른 세포 표면 분자에 대한 항체, CD25(인터루킨-2 수용체-a), CD11a(LFA-1), CD54(ICAM-1), CD4, CD45, CD28/CTLA4, CD80(B7.1) 및/또는 CD86 (B7.2)을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 다른 구체예에서, GITR 길항제(예를 들어, GITRL 저해 폴리뉴클레오티드, 길항성 저분자, 중화 항-GITR 항체 및/또는 중화 항-GITRL 항체)는 사이클로스포린 A 또는 FK506과 같은 일반적인 면역억제제의 하나 이상과 병용하여 사용될 수 있다.

다른 구체예에서, GITR 길항제(예를 들어, GITRL 저해 폴리뉴클레오티드, 길항성 저분자, 및/또는 중화 항-GITRL 항체)는 자가면역 질병, 염증성 질병 또는 이식거부에 대한 백신 보강제로서 사용될 수 있다. 이런 타입의 질병 치료용 보강제의 병용물은 표적화된 자기항원, 즉 자가면역에 포함된 자기항원, 예를 들어 수초 염기성 단백질; 염증성 자기항원, 예를 들어 아밀로이드 웨პ티드 단백질, 또는 이식항원, 예를 들어 동종항원에서 유래한 광범위한 항원과 병용 사용하기에 적합하다. 항원은 단백질로부터 유래한 웨პ티드 또는 폴리웨პ티드 및 다음 중의 어느 것의 단편을 포함한다: 사카라이드, 단백질, 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드, 자가항원, 아밀로이드 웨პ티드 단백질, 이식항원, 알레르기 항원, 또는 다른 매크로분자 성분. 어떤 예에서, 하나 이상의 항원이 항원 조성물에 포함된다.

예를 들어, 척추동물 숙주에서 알레르기 항원에 대한 반응을 조절하기 위한 바람직한 백신(본 발명의 보강제 조성물을 함유)은 알레르기 항원 또는 그의 단편을 포함한다. 그런 알레르기 항원은 U.S. Patent No. 5,830,877 및 공개된 International Patent Application No. WO 99/51259에 기재되어 있고 전체내용이 여기에 참고자료로 포함되어 있으며, 화분, 곤충독, 동물 비듬, 곰팡이 포자 및 (페니실린과 같은) 약물을 포함한다. 백신은 알레르기 반응의 원인으로 알려진 IgE 항체의 생산을 방해한다. 다른 예로, 척추동물 숙주에서 아밀로이드 침착에 의한 질병의 예방 또는 치료용의 바람직한 백신(본 발명의 보강제 조성물을 함유)은 아밀로이드 웨პ티드 단백질(APP)의 부분 함유물을 포함한다. 이런 질병은 알츠하이머병, 아밀로이드병, 아밀로이드성 질병과 같이 다양하게 지칭된다 따라서, 본 발명의 백신은 본 발명의 보강제 병용물에 A $\beta$  웨პ티드 및 A $\beta$  웨პ티드의 단편과, A $\beta$  웨პ티드 또는 그의 단편에 대한 항체를 더한 것을 포함한다.

1) 항원 표시 세포 기능을 하향조절하고; 2) 면역억제를 조절하기 위해 병용치료하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, Xiao et al. (2003) Dendritic cell vaccine design: strategies for eliciting peripheral tolerance therapy of autoimmune diseases. BioDrugs 17: 103-11; Kuwana (2002) Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. Hum. Immunol. 63: 1156-63; Lu et al. (2002) Manipulation of dendritic cells for tolerance induction in transplantation and autoimmune disease. Transplantation 73: S19-S22 ; Rifle et al. (2002) Dendritic cells and second signal blockade: a step toward allograft tolerance. Transplantation 73:S1-S2 ; Mancini et al. (2004) The management of immunosuppression: the art and the science. Crit. Care. Nurs.Q. 27: 61-64를 참조).

따라서, 본 발명의 다른 측면은 GITR 길항제(예를 들어, GITRL 저해 폴리뉴클레오티드, 길항성 저분자, 및/또는 GITR 및/또는 GITRL에 대한 중화 항체)와 다른 치료 화합물의 병용 투여를 수행하기 위한 키트에 관한 것이다. 한 구체예에서, 키트는 약제학적 담체내에 조제된 하나 이상의 결합제 및 하나 이상의 분리된 약제학적 제제내에 적절하게 조제되는 적어도 하나의 약제(예를 들어, 치료제)를 포함한다.

#### 참고문헌

다음의 참고문헌은 본 발명의 명세서에서 인용하고 있는 다양한 저자/년도의 참고문헌을 전부 나타낸다.

Aseffa, A., Gumy, A., Launois, P., MacDonald, H. R., Louis, J. A., and Tacchini- Cottier, F. (2002). The early IL-4 response to Leishmania major and the resulting Th2 cell maturation steering progressive disease in BALB/c mice are subject to the control of regulatory CD4+ CD25+ T cells. J Immunol 169, 3232-3241.

Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. Nature 392, 245-252.

Belkaid, Y., Piccirillo, C. A., Mendez, S., Shevach, E. M., and Sacks, D. L.(2002).

CD4+ CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. Nature 420, 502-507.

Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevach, E. M., and Strober, W., eds. (2003). Current Protocols in Immunology (John Wiley & Sons, Inc.).

Croft, M. (2003). Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? Nat RevImmunol 3,609-620.

Depper, J. M., Leonard, W. J., Drogula, C., Kronke, M., Waldmann, T. A., and Greene, W. C. (1985). interleukin 2 (IL-2) augments transcription of the IL-2 receptor gene. Proc Natl Acad Sci U S A82, 4230-4234.

- Gavin, M. A., Clarke, S. R., Negrou, E., Gallegos, A., and Rudensky, A.(2002). Homeostasis and anergyof CD4 (+) CD25 (+) suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol* 3, 33–41.
- Gilfillan, M. C., Noel, P. J., Podack,E. R., Reiner, S. L., and Thompson, C. B. (1998). Expression of the costimulatory receptor CD30 is regulated by both CD28 and cytokines. *J Immunol* 160, 2180–2187.
- Godfrey, D. I., Kennedy, J., Suda, T., and Zlotnik, A. (1993). A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3- CD4-CD8-triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol* 150, 4244–4252.
- Gurney, A. L., Marsters, S. A., Huang, R. M., Pitti, R. M., Mark, D. T., Baldwin, D. T., Gray, A. M., Dowd, A. D., Brush, A. D., Heldens, A. D., etal. (1999). Identification of a new member of the tumor necrosis factor family and its receptor, a human ortholog of mouse GITR. *Curr Biol* 9, 215–218.
- Hisaeda, H., Maekawa, Y., Iwakawa, D., Okada, H., Himeno,K., Kishihara,K., Tsukumo, S., and Yasutomo, K. (2004). Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4 (+) CD25 (+) regulatory T cells. *Nat Med* 10, 29–30.
- Kim, J. D., Choi, B. K., Bae, J. S., Lee, U. H., Han, I. S., Lee, H. W., Youn, B. S., Vinay, D. S., and Kwon, B. S. (2003). Cloning and characterization of GITR ligand. *Genes Immun* 4,564–569.
- Kursar, M., Bonhagen, K., Fensterle, J., Kohler, A., Hurwitz, R.,Kamradt, T., Kaufmann, S. H., and Mittrucker, H. W. (2002). Regulatory CD4+ CD25+ T cells restrict memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med* 196,1585–1592.
- Kwon, B., Yu, K. Y., Ni, J., Yu, G. L., Jang,1. K., Kim, Y. J., Xing, L., Liu, D., Wang, S. X., and Kwon, B. S. (1999). Identification of a novel activation-inducible pretein of the tumor necrosis factor receptor superfamily and its ligand. *J Biol Chem* 274, 6056–6061.
- Lundgren, A., Suri-Payer, E., Enarsson, K.,Svennerholm, A. M., and Lundin, B. S. (2003). Helicobacter pylori-specific CD4+ CD25high regulatory T cells suppress memory T-cell responses to *H. pylori* in infected individuals. *Infect Immun* 71, 1755–1762.
- Malek, T. R., and Ashwell, J. D. (1985). interleukin 2 upregulates expression of its receptor on a T cell clone. *J Exp Med* 161,1575–1580.
- Maloy, K. J., Salaun, L., Cahill, R., Dougan, G., Saunders, N. J., and Powrie, F. (2003). CD4+ CD25+ T (R) cells suppress innate immune pathology through 사이토카인-dependent mechanisms. *J Exp Med* 197, 111–119.
- McHugh, R. S., and Shevach, E. M. (2002). The role of suppressor T 세포 in regulation of immune responses.*J Allergy Clin Immunol* 110, 693–702.
- McHugh, R. S., Witters, M. J., Piccirillo, C. A., Young, D. A., Shevach, E. M., Collins, M., and Byrne, M. C. (2002). CD4 (+) CD25 (+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16, 311–323.
- Nakano, H., Yanagita, M., and Gunn, M. D.(2001). CD11c (+)B220 (+)Gr-1 (+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 194,1171–1178.
- Ouyang, W.,Ranganath, S. H., Weindel, K., Bhattacharya, D., Murphy, T. L., Sha, W. C., and Murphy, K. M.(1998). Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity* 9, 745–755.

Piccirillo, C. A., and Shevach, E. M. (2001). Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+ CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol* 167, 1137–1140.

Rogers, P. R., Song, J., Gramaglia, I., Killeen, N., and Croft, M. (2001). OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. *Immunity* 15, 445–455.

Ronchetti, S., Nocentini, G., Riccardi, C., and Pandolfi, P. P. (2002). Role of GITR in activation response of T lymphocytes. *Blood* 100, 350–352.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155, 1151–1164.

Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y., and Sakaguchi, S. (2002).

Stimulation of CD25 (+) CD4 (+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 3, 135–142.

Suvas, S., Kumaraguru, U., Pack, C. D., Lee, S., and Rouse, B. T. (2003).

CD4+ CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med* 198, 889–901.

Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J., and Sakaguchi, S. (1998). Immunologic self-tolerance maintained by CD25+ CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 10, 1969–1980.

Thornton, A. M., and Shevach, E. M. (1998). CD4+ CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188, 287–296.

Tone, M., Tone, Y., Adams, E., Yates, S. F., Frewin, M. R., Cobbold, S. P., and Waldmann, H. (2003). Mouse glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand is costimulatory for T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15059–15064.

Uraushihara, K., Kanai, T., Ko, K., Totsuka, T., Makita, S., Iiyama, R., Nakamura, T., and Watanabe, M. (2003). Regulation of murine inflammatory bowel disease by CD25+ and CD25-CD4+ glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene+ regulatory T cells. *J Immunol* 171, 708–716.

Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L., and Shortman, K. (2000). CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol* 164, 2978–2986.

Vremec, D., and Shortman, K. (1997). Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *J Immunol* 159, 565–573.

Yu, K. Y., Kim, H. S., Song, S. Y., Min, S. S., Jeong, J. J., and Youn, B. S. (2003). Identification of a ligand for glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor constitutively expressed in dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 310, 433–438.

### 도면의 간단한 설명

도 1은 마우스 (m) 및 인간 (h) GITRL의 아미노산 서열 열라인먼트를 나타낸다(BLOSUM62 amino acid substitution matrix에 기초; Henikoff and Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 10915–19 참조).

도2는 GITRL:GITR 결합이 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 증식에 미치는 효과에 대한 실험 결과를 나타낸다. 세포 증식을 평가하기 위한 수단으로 티미딘 편입을 측정하였다(CPM).

도 2a는 작용성 항-GITR 항체가 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 증식을 자극하지만, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 세포의 증식에 대해서는 자극하지 않음을 나타낸다.

도 2b는 GITRL을 발현하는 YB2/0 세포가 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 증식을 자극한 것을 나타낸다.

도 3a는 YB2/0 세포(~50,000)에 의해 발현된 GITRL 및 작용성 항-GITR 항체(2 $\mu$ g/ml)가 갓 분리된 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 억제 T 세포(# 억제자)에 의해 생성된 억제를 반전하는 것(즉, 네가티브 퍼센트 억제)을 나타낸다.

도 3b는 50,000 미만의 GITRL-YB2/0 세포(즉, ~3,000-25,000)가 투여량(dose)-의존 방식으로 억제를 부분적으로 반전할 수 있음을 나타낸다.

도 4는 활성화된 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포가 갓 분리된 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포 대신에 사용되면, GITRL-YB2/0 세포(~50,000)가 억제를 반전하지 못함을 나타낸다; 유사한 결과가 작용성 항-GITR 항체에서 관찰된다.

도 5a 및 5b는 갓 분리된 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포에 의해 생성된 억제에 대한 GITRL-유발 반전이 항-GITRL 항체("항-GITRL"=5F1 항체)의 존재하에 그 자체로 반전(즉, 억제를 재생)될 수 있음을 나타낸다.

도 5b는 대조군 항체("대조군 Ig")가 억제를 재생하지 못함을 나타내는 추가 실험을 포함한다.

도 6는 항-GITRL 항체가 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 존재하에 단지 억제를 증가시킬 수 있음을 나타낸다.

도6a는 항-GITRL 항체 (5F1)의 존재하에 림프절 세포의 증식 억제를 나타낸다.

도 6b는 림프절 세포 집단으로부터 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포가 결실된 경우, 항-GITRL 항체의 억제 활성이 결여됨을 나타낸다.

도 7은 림프 조직에 있는 GITRL 발현 세포의 분포를 나타낸다.

도 7a: 자기구슬을 가진 BALB/c 마우스의 지라에 풍부하고, 항-CD4, 항-CD8 및 항-GITRL 항체에 의해 염색된 CD11c<sup>+</sup> 세포에 대해 플로우 사이토메트릭(flow cytometric) 분석을 하였다. 동형 대조군 항체로 염색된 이런 세포의 형광세기(속이 빈 히스토그램)에 대해 항-GITRL 항체로 염색된 CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, 및 CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>-게이트된 서브셋(gated subsets) (각각 위, 중간, 및 아래쪽 히스토그램 패널)의 형광세기(속이 찬 히스토그램)를 비교함으로써, GITRL 발현이 검출되었다. .

도 7b: 갓 분리된 BALB/c CD11c<sup>+</sup> 지라 DCs (위쪽 히스토그램 패널) 및 CD11c<sup>low</sup>B220<sup>+</sup> 플라스마시토이드(plasmacytoid) DCs (아래쪽 히스토그램 패널)을 항-GITRL mAb (속이 찬 히스토그램) 또는 동형 대조군 항체 (속이 빈 히스토그램)로 염색하고, 플로우 사이토메트릭 분석을 수행하여 지라 가지 세포(DCs) 및 B-1 B 세포에 의한 GITRL의 발현을 검출하였다.

도 7c (위쪽 히스토그램 패널): 항-GITRL 항체로 염색된 전체 비세포 중의 B220<sup>+</sup> B 세포(속이 찬 히스토그램), 및 CD11b<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>-게이트된 복(peritoneal) (perC) B-1 B 세포(실선의 속이 빈 히스토그램)의 형광세기를 동형 대조군으로 염색한 세포(점선의 속이 빈 히스토그램)의 형광세기와 비교하였다.

도 7c (아래쪽 히스토그램 패널): GITRL-항체가 염색된 perC 마크로파지(CD11b<sup>+</sup>B220<sup>-</sup>세포) (속이 찬 히스토그램) 및 동형 항체로 염색된 perC 마크로파지(CD11b<sup>+</sup>B220<sup>-</sup>세포) (속이 빈 히스토그램)의 형광세기를 비교하였다.

도 7d: CD4, CD8, 및 GITRL 또는 동형 대조군의 발현에 대해 가슴샘 세포를 염색하였다. 항-GITRL 항체(속이 찬 히스토그램)로 염색된 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>(위쪽 오른쪽의 4분면), CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>(위쪽 왼쪽의 4분면) 및 CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>(아래쪽 오른쪽의 4분면)의 형광세기가 동형 대조군 항체(속이 빈 히스토그램)로 염색된 이들 세포의 형광세기와 비교되었다.

도 7e: 게이트된(gated) CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>(R1), CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>(R2), CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>(R3) 또는 CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>(R4) 가슴샘 전구체에 의한 GITRL의 발현이 항-GITRL 항체(속이 찬 히스토그램)로 염색된 이들 세포의 형광과 동형 대조군 항체(속이 빈 히스토그램)로 염색된 이들 세포의 형광을 비교함으로써 결정되었다.

도 7f: 비자극된 림프절 세포가 항-CD4, 항-CD8, 항-CD25 및/또는 항-GITRL 항체로 염색되었다. CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>세포(위쪽 왼쪽의 4분면)는, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> 세포(아래쪽 오른쪽의 4분면)은 아님, 이들 세포에 의한 CD25의 발현과 관련하여 보다 묘사되었다. CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>(위쪽 오른쪽 히스토그램 패널), CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>(좀더 밑의 오른쪽 히스토그램 패널) 또는 CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>(아래쪽(중간) 히스토그램 패널)-게이트된 림프절 세포에 의한 GITRL의 발현은 항-GITRL 항체(속이 찬 히스토그램)로 염색된 이들 세포의 형광세기와 동형 대조군 항체(속이 빈 히스토그램)로 염색된 이들 세포의 형광세기를 비교함으로써 결정되었다. 결과는 다섯개의 독립적인 실험으로부터 얻어졌다.

도 8은 자극 후 APC에 의한 GITRL의 하향조절을 나타낸다.

도 8a: polyI: C(10pg/ml), LPS(0.5μg/ml), CpGs(ODN 1826, 1uM), 항-CD40 및 IL-4(10μg/ml 및 20ng/ml, 각각) 및 항-IgM(F(ab')<sub>2</sub> 단편)of 염소-항-IgM u-chain, 1μg/ml)으로 처리 후에, 다른 시간대에서 정제된 지라 B220<sup>+</sup> B 세포 또는 완전(total) 복막 (PerC) B220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> B-1 B 세포에 의한 GITRL의 발현이 결정되었다. 항-GITRL-염색 자극 세포(속이 찬 히스토그램), 항-GITRL-염색 비자극(중간) 세포(실선, 속이 빈 히스토그램) 및 동형 대조군 항체 염색된 세포(파선, 속이 빈 히스토그램)의 형광세기를 나타냈다.

도 8b: 48시간 배양 후에 항-CD3 mAb(0.5μg/ml)으로 처리된 전체 비세포 중에 존재하는 B220<sup>+</sup> B 세포(속이 찬 히스토그램)에 의한 GITRL의 발현이 동형 대조군 항체(파선, 속이 빈 히스토그램)로 염색된 비자극 B220<sup>+</sup> B 세포(실선, 속이 빈 히스토그램) 및 B220<sup>+</sup> B 세포에 의한 GITRL의 발현과 비교되었다.

도 8c: LPS(0.5μg/ml)의 존재하에 또는 부존재하의 배양 후, 정제된 CD11c<sup>+</sup> DCs에 의한 GITRL(위쪽 히스토그램 패널) 및 B7.2(즉, CD86)(아래쪽 히스토그램 패널)의 지정된 시점에서의 발현.

도 8d: 수용성 항-CD3 mAb(0.5μg/ml)의 부존재 또는 존재하에서 48시간 배양 후에, CD4<sup>+</sup> 또는 CD8<sup>+</sup>-발현 세포상에 게이트된 전체 비세포에 의한 GITRL의 발현. 그래프는 2 또는 4개의 독립적인 실험을 나타낸다: 모든 실험은 BALB/c 마우스에서 분리된 조직을 이용하여 수행되었다.

도 9는 GITR/GITRL 상호작용을 차단하는 것이 림프구 증식 저해에 미치는 효과를 나타낸다. 도 9a 및 9b에서 바(bar)는 표준편차(s.d.) 값을 나타낸다.

도 9a: 다른 농도의 수용성 항-CD3(y-축)에서 72시간 배양 후에, CD25<sup>+</sup> 세포를 가지거나 또는 가지지 않은(완전 또는 △25, 각각) 림프절 세포(LN; 1x10<sup>5</sup>) 및 지라세포(Sp; 0.5x10<sup>5</sup>)의 증식(y-축)이 결정되었다. 세포는 정제된 항-GITRL mAb (10μg/ml; 검은색 원) 또는 레트 IgG2<sub>a</sub> 동형 대조군(10μg/ml; 흰색 원)의 존재하에 세포가 배양되었다. 결과는 3개의 독립적인 실험으로부터 얻어졌다.

도 9b: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> 또는 CD8<sup>+</sup> T 세포가 5x10<sup>4</sup> 조사된 (3000R) T-고갈된 APCs 및 5x10<sup>4</sup> 조사된 (8000R) YB2/0-GITRL(흰색 원) 또는 대조군 YB2/0(검은색 원) 세포의 존재하에 배양되었다. 배양은 다른 농도의 수용성 항-CD3 mAb (x-축)으로 활성화되었고, 72시간 배양후에 증식(y-축)이 측정되었다.

도 9c: 조사된 (3000R) T-고갈된 비세포의 존재하에 수용성 항-CD3( $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ )으로 활성화된 후에 다른 시간대에 항-GITR 항체로 염색된 정제 CD4 $^+$ CD25 $^-$ T 세포의 평균 형광(x-축)을 측정하였다. 결과는 적어도 두개의 독립적인 실험으로부터 얻어졌다.

도 10은 CD25 $^-$ T 세포의 의한 GITR의 발현이 억제를 반전시키기 위해 필요함을 나타낸다.

도 10a: 야생형 마우스로부터 얻은 조사된 APC( $5\times 10^4$ ) 및 수용성 항-CD3( $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 및  $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항-GITR 항체(검은색 원) 또는 동형 대조군 항체(흰색 원)를 가지는 배양물에서 배양된 다양한 녹아웃 마우스로부터 얻은 CD4 $^+$ CD25 $^-$  T 세포 ( $5\times 10^4$ ) 및 다양한 녹아웃 마우스[(Aa) CD4 $^+$ CD25 $^-$ :GITR $^{+/+}$ , CD4 $^+$ CD25 $^+$ :GITR $^{+/+}$ ; (Ab) CD4 $^+$ CD25 $^-$ :GITR $^{+/+}$ , CD4 $^+$ CD25 $^+$ :GITR $^{-/-}$ ; (Ac) CD4 $^+$ CD25 $^-$ :GITR $^{-/-}$ , CD4 $^+$ CD25 $^+$ :GITR $^{+/+}$ ; 및 (Ad) CD4 $^+$ CD25 $^-$ :GITR $^{-/-}$ , CD4 $^+$ CD25 $^+$ :GITR $^{+/+}$ ]로부터 얻은 다양한 수의 CD4 $^+$ CD25 $^+$  T 세포 (x-축)의 공배양 증식은  $^3\text{H}$ -티미딘 흡수(cpm; y-축)를 측정하여 결정되었다.

도 10b: 상기(도 10)와 같이 조사된 (3000R) 레트 APC의 존재하에 다양한 수의 마우스 CD4 $^+$ CD25 $^+$  T 세포(x-축) 및 마우스 CD4 $^+$ CD25 $^-$  T 세포(Ba) 또는 레트 CD4 $^+$ CD25 $^-$  T(Bb)의 공배양 증식이 수행되었다. 배양은 레트 및 마우스 항-CD3(각각  $0.25\mu\text{g}/\text{ml}$ )에 대한 항체로 자극되었고,  $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 동형 대조군(Rat IgG; 흰색 원) 또는 항-GITR(DTA-1; 검은색 원) 항체로 처리되었다. 바는 3배수 배양의 증식으로부터 계산되어진 표준편차를 나타낸다.

도 10c: 1:8의 억제자 대 반응자 비율에서 동형 대조군(Rat IgG; 왼쪽 패널) 또는 항-GITR(DTA-1; 오른쪽 패널)을 이용하여 공배양된 항체 CFSE-염색 마우스 CD4 $^+$ CD25 $^+$ (위쪽 패널) 및 레트 CD4 $^+$ CD25 $^-$  T 세포(아래쪽 패널)의 형광(x-축)이 도시되어 있다. 마우스 및 레트 T 세포 서브세트가 특이적 항-CD4 항체로 염색함으로써 구분되었다. 결과는 두개 내지 네개의 독립된 실험으로부터 얻어졌다.

도 11은 내인 조절 T 세포에 의해 매개되는 억제를 극복하는데 필요한 GITR 신호를 나타낸다.

도 11a: B6(야생형), GITR $^{+/+}$ , CD28 $^{-/-}$  및 GITR $^{-/-}$  마우스로부터 얻은 CFSE-표지된 림프 절(LN) 세포( $5\times 10^4$ )가 다른 농도의 수용성 항-CD3 mAb(x-축)로 72시간 배양되었다. 총 LN 세포가 외인 IL-2( $50\text{U}/\text{ml}$ )의 부존재하에(Aa) 또는 존재하에(Ab) 배양되었다. 표준편차를 지시하는 바는 명확성을 위해 생략하였다.

도 11b: CD28 $^{-/-}$ , GITR $^{-/-}$ , GITR $^{+/+}$  또는 GITR $^{+/+}$  동물로부터 분리한 CD4 $^+$  및 CD8 $^+$ -케이트된 림프절 T 세포에 의한 CFSE 희석의 플로우 사이토메트리 분석이 72시간 배양 후에 수행되었다. 결과는  $0.663\mu\text{g}/\text{ml}$  농도의 수용성 항-CD3(도 11a에서와 같이)에 대응한다.

도 11c: 비자극 상태(파선, 빈 히스토그램)로 유지되거나, GITR $^{-/-}$  마우스(실선, 빈 히스토그램), 또는 GITR $^{+/+}$  마우스(채워진 히스토그램)로부터 얻은 H-2D<sup>b</sup> 포지티브 CD4 $^+$ CD25 $^-$  세포에 대해 플로우 사이토메트리 분석이 수행되었다.

1: 2의 억제자 대 반응자 비율로 BALB/c 마우스로부터 얻은 CD4 $^+$ CD25 $^+$  세포의 부존재(왼쪽 히스토그램 패널) 또는 존재(오른쪽 히스토그램 패널)하에, 야생형 마우스로부터 얻은 LN APCs와 함께 24시간 배양 후에 GITR $^{-/-}$  또는 GITR $^{+/+}$  마우스로부터 얻은 CD4 $^+$ CD25 $^-$  세포에 의한 CD25 발현이 결정되었다. 또한,  $\geq 50\text{U}/\text{ml}$  rhIL-2의 부존재(위쪽 히스토그램 패널) 또는 존재(아래쪽 히스토그램 패널)하에 CD25 발현이 결정되었다.

도 12는 CD28-의존 공자극이 GITR 발현 및 반응성을 증가시키는 것을 나타낸다.

도 12a: 플레이트-바운드(plate-bound) 항-CD3 및  $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 플레이트-바운드 햄스터 동형("aCD3") 또는 플레이트-바운드 항-CD28("CD3+CD28")과 함께 72시간 배양 후에 정제된 CD4 $^+$ CD25 $^-$  또는 CD8 $^+$  T 세포( $2.5\times 10^4$ )에 의한 GITR 발현의 플로우 사이토메트리 분석.

도 12b(왼쪽 히스토그램 패널): 항-CD80/86(각  $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 항체 (즉, 항-B7.1/7.2 항체)의 칵테일과 함께 또는 없이, 자극된 T 세포-고갈된 비세포 및 수용성 항-CD3( $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ )의 존재하에 72시간 배양한  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^-$  T 세포의 항-GITR 염색.

도 12b(왼쪽 히스토그램 패널): IL-2 및 IL-2Ra에 대한 항체의 칵테일과 함께 또는 없이, 자극된 T 세포-고갈된 비세포 및 수용성 항-CD3( $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ )의 존재하에 배양한  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^-$  T 세포의 항-GITR 염색.

도 12c: 항-GITR mAb( $24\mu\text{g}/\text{ml}$ ; "DTA-1") 또는 동형 대조군 항체( $2\mu\text{g}/\text{ml}$ ; "레트 IgG")의 첨가와 함께 항-CD80/86 mAbs(각  $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ; "B7")의 존재 또는 부존재하에 증식이 분석되었다. 바는 표준편차를 나타낸다. 결과는 둘 내지 세개의 독립된 실험으로부터 얻어졌다.

도 13은 GITR에 대한 GITRL의 결합이 작동 T 세포에 대한 공자극 신호를 제공하는 것을 나타낸다.

도 13a: HT-2 세포 당 하나 또는 두개의 항-CD3 비드의 부존재 또는 존재하에, 단독,  $1 \times 10^4$  대조군 YB2/0 세포 (벳금친 바) 또는 GITRL-발현 YB2/0 세포 (채워진 바)과 공배양된 작동  $\text{GITR}^+/\text{TCR}^+$  HT-2 T 세포 ( $4 \times 10^4$ )의 증식이  $^3\text{H}$ -티미딘 흡수(y-축)를 측정함으로써 결정되었다.

도 13b: 세포 당 두개의 항-CD3 비드,  $1 \times 10^4$  GITRL-발현 YB2/0 세포 및 항-GITRL 항체(5F1.1; 검은색 원) 또는 동형 대조군 항체(rIgG1; 흰색 원)의 증가하는 농도( $\text{ng}/\text{ml}$ ; x-축)로 공배양된  $4 \times 10^4$  HT-2 세포의 증식이  $^3\text{H}$ -티미딘 흡수( $\text{cpm}$ ; y-축)를 측정함으로써 결정되었다.

도 13c: 세포 당 두개의 항-CD3 비드,  $1 \times 10^4$  GITRL-발현 YB2/0 세포 및 네개의 다른 항체: 5F1.1(검은색 원), MGLT-10(검은색 사각형), MGTL-15(흰색 사각형) 또는 폴리클로날 항체(흰색 사각형)의 증가하는 농도( $\text{ng}/\text{ml}$ ; x-축)로 공배양된  $4 \times 10^4$  HT-2 세포의 증식이  $^3\text{H}$ -티미딘 흡수( $\text{cpm}$ ; y-축)를 측정함으로써 결정되었다.

도 14는 항-GITRL 항체에 의한 GITR-GITRL 결합의 차단이 PLP-유도 실험 자가면역 뇌척수염(EAE)의 입양 전달을 차단하는 것을 나타낸다. 마우스에서 EAE의 발생은 평가되었다.  $150\mu\text{g}$  PLP 웨პ티드로 면역화된 암컷 SLJ 마우스로부터 분리되고 3일간 세개의 다른 조건에서 생체외 재자극된  $5 \times 10^6$  비세포를 마우스에 주입하였다:  $10\mu\text{g}/\text{ml}$  PLP 단독(흰색 원),  $10\mu\text{g}/\text{ml}$  PLP 및  $10\mu\text{g}/\text{ml}$  동형 대조군 항체(CKO1; 검은색 원), 또는  $10\mu\text{g}/\text{ml}$  PLP 및 항-GITRL 항체(5F1.1; 검은색 사각형). EAE의 발생을 52일(x-축)간 감시하고, 0 내지 5의 척도(y-축)로 평가하였다.

### 실시예

본 발명은 신규한 마우스 cDNA, 지정된 마우스 GITRL cDNA, 마우스 GITR로 지정된 신규한 리간드 폴리펩티드의 코딩 및 GITRL에 대한 신규한 항체에 관해 다음의 실시예로 설명한다. 당업자는 실시예의 기술이 마우스 GITRL의 모든 상동물에 적용될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

다음의 실시예는 본 발명의 이해를 돋기 위한 것일뿐, 실시예로 제한해서 해석되서는 안되고, 본 발명의 범위를 제한하여 해석해서도 안된다. 실시예는 플로우 사이토메트리(예를 들어, FACS), PCR, 노던(northern) 및 인 시츄(in situ) 혼성화, 또는 벡터 제조에 사용되는 방법, 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 벡터 및 플라스미드에 삽입하는 데 사용되는 방법, 그러한 벡터 및 플라스미드를 숙주세포에 도입하는 방법 및 숙주세포에서 그러한 벡터 및 플라스미드를 발현시키는 방법 등과 같은 통상적인 방법에 대해서는 상세한 설명을 포함하고 있지 않다. 이런 방법은 당업계에서 통상의 지식을 가진 사람에게 잘 알려져 있다.

#### 실시예 1

##### GITRL DNA 서열의 동정

실시예 1.1: 마우스 GITRL cDNA 및 계놈 서열의 동정

뮤린 GITRL 상동물을 동정하기 위해 두가지 접근을 하였다. 한 접근방법에서, 인간 GITRL의 아미노산 서열(GenBank Acc. No. AX077015부터 입수)이 div1; div2; div3; div4; gbdv\_cu ; 셀레라(celera) 마우스(cm); 및 드래프트(draft) 마우스-dna 데이터베이스에 대한 Tblastn 탐색에 사용되었다. 게놈 서열 ga\_69772862.cm\_4이 조사 가능성 있는 것중의 하나로 동정되었다. 결손 아미노산 서열은 비마스크된(unmasked) 셀레라 마우스 게놈 어셈블리(cm)에 대한 인간 GITRL의 아미노산 서열(GenBank Acc. No. AX077015)을 가지고 기댓값 (E)=10, 100 및 1000을 이용하여 Tblastn 탐색에서 확인되었다. 게놈 서열 ga\_5j8b7w7wj5\_041.cm\_aa\_2이 결손 아미노산 서열을 함유하고 있는 게놈 유전자로 동정되었다.

다른 접근 방법에서, 인간 GITRL의 아미노산 서열(GenBank Acc. No. NM\_005092부터 입수)이 기댓값 (E)=10 및 1000을 이용하여 비마스크된 셀레라 마우스 게놈 어셈블리(cm)에 대한 Tblastn 탐색에 사용되었다. 게놈 서열 ga\_x5j8b7w7wj5\_041.cm\_aa\_2가 세 개의 하이 스코어링 페어(hight scoring pair, HSP) 영역을 함유하는 게놈 서열로 동정되었다.

잠정적인 마우스 DNA 서열이 상기 Tblastn 탐색에서 얻은 세 개의 HPS 영역에 기초하여 제조되었다. 이 cDNA 서열은 셀레라 (ga\_x2htbl3vud5\_66.ch\_r25h\_1)에서 얻은 대응 인간 게놈 서열을 가지는 세 개의 인간 엑손 서열 및 셀레라 (ga\_x5j8b7w7wj5\_041.cm\_aa\_2)에서 얻은 대응 마우스 게놈 서열을 가지는 세 개의 유도된 마우스 잠정 엑손 서열의 정렬사이의 대비에 기초하여 편집되었다. 이런 편집은 인간 서열에 대한 스플라이스 접합(junction)을 고려하였다. 편집된 마우스 GITRL cDNA 서열은 173개의 아미노산을 가지는 단백질에 대응하는 519bp의 오픈 리딩 프레임(522bp의 코딩 서열)을 함유하고 있다.

프라이머는 마우스 GITRL 게놈 서열의 잠정적 엑손에 기초하여 설계되었고, PCR에 의해 뮤린 티무스 cDNA 도서관으로부터 대응하는 물리적 cDNA 클론을 분리하는데 사용되었다. 포워드(forward)(서열번호:4) 및 리버스(reverse)(서열번호:5) PCR 프라이머는 다음과 같았다:

5'ATGGAGGAAATGCCTTGAGAG 3' (포워드 프라이머), 및

5'GAATGGTAGATCAGGCATTAAGATG 3' (리버스 프라이머).

생성된 단편은 서브클로닝 되었고, DNA 서열은 표준 방법을 이용하여 결정되었다. 생성된 단편은 예측된 세 개 모두의 엑손(뒤를 참조)을 포함하는 마우스 GITRL cDNA의 존재를 확인하였다. 이 단편은 생성된 cDNA 클론의 PCR 증폭에 의해 cDNA의 최종 코딩 세그멘트(두개의 아미노산)를 포함하도록 확장되었다. 이 단계에서 포워드(서열번호:6) 및 리버스(서열번호:7) PCR 프라이머의 서열은 다음과 같았다:

5'TTTAAAGTCGACCCACCATGGAGGAAATGCCTTGAGAG 3' (포워드 프라이머), 및

5'TTTAAAGAATTCTCATTAAGAGATGAATGGTAGATCAGGCAT 3' (리버스 프라이머).

포워드 PCR 프라이머는 SalI 자리, 번역 개시를 위한 Kozak 서열 및 시작 메티오닌을 코딩하는 ATG를 포함하고 있다. 리버스 프라이머는 EcoRI 자리를 포함하고 있다. SalI 및 EcoRI는 방향성(directional) 서브클로닝을 위해 사용되었고, 최종 cDNA 클론의 서열결정이 수행되었다.

풀-렌스 마우스 GITRL cDNA 서열 및 그의 추론된 아미노산 서열이 각각 서열번호:1 및 서열번호:2에 나와 있다. 인간 GITRL cDNA(서열번호:8) 및 마우스 GITRL cDNA 서열의 정렬은 69.6% 동일성을 밝혔다. 인간 GITRL 아미노산(서열번호:9) 및 마우스 GITRL 아미노산 서열(도 1)의 정렬은 54.1% 동일성 및 60.0% 유사성을 밝혔다. 이런 정도의 아미노산 동일성은 다른 TNFR 리간드에 대해 인간 및 마우스 상동물간에 일반적으로 존재하는 동일성과 유사하다(Oshima et al. (1998)Oyat. Immunol. 10: 517-26).

클론된 마우스 GITRL cDNA(서열번호:1) 및 공중이 입수 가능한 뮤린 데이터 베이스간의 비교는 마우스 GITRL 코딩영역에서 단일 뉴클레오티드 폴리모피즘(SNP)을 밝혔다(엑손 3에서 서열번호:1의 470번 위치의 뉴클레오티드에서 A/C 트랜스버전, 이것은 서열번호:2의 157번 위치 아미노산을 아스파라진에서 트레오닌으로의 변경을 야기한다)

마우스 GITRL cDNA 서열 및 위에 기재한 셀레라로부터 입수한 마우스 게놈 서열(ga\_x5j8b7w7wj5\_041. cm\_aa\_2)간의 비교는 마우스 GITRL 로커스가 세 개의 엑손 및 두개의 인트론을 포함하고 있다는 것을 밝혔고(아래 표 2 참조), 엑손 크기 및 위치는 마우스 및 인간 GITRL간에 잘 보존되어 있었다. 마우스 GITRL 게놈 cDNA 서열은 서열번호:3에 나와 있다.

[표 2]

서열번호 : 3 내의 영역	서열 속성	길이 (bp)	서열 번호 : 1 내의 위치
1-255	5'-서열	255	-
256-390	엑손#1	135	1-135
391-6010	인트론#1	5620	-
6011-6044	엑손#2	34	136-169
6045-8990	인트론#2	2946	-
8991-9340	엑손#3	350	170-519
9341-9343	종결	3	520-522
9344-10289	3'-서열	946	-

마우스 GITRL의 게놈 구조(표 2) 및 인간 GITRL의 게놈 구조(아래 표 3 참조)의 비교는 엑손 크기 및 인트론 위치가 인간 및 마우스 GITRL 게놈 DNA 서열간에 잘 보존돼 있다는 것을 보인다. 인간 GITRL cDNA 서열은 서열번호:10에 나와 있다.

[표 3]

서열번호 : 10 내의 영역	서열 속성	길이 (bp)	서열번호 : 8 내의 위치
1-421	5'-서열	421	-
422-577	엑손#1	156	1-156
578-7348	인트론#1	6771	-
7349-7379	엑손#2	31	157-187
7380-9604	인트론#2	2225	-
9605-9948	엑손#3	344	188-531
9949-9951	종결	3	532-534
9952-10331	3'-서열	380	-

### 실시예 1.2 마우스 GITRL의 소수성 프로파일

마우스 GITRL의 소수성 프로파일이 TopPred (Claros and von Heijne (1994) Comput.Appl. Biosci. 10: 685-6)에 의해 결정되었다. 마우스 GITRL의 아미노산 잔기(서열번호:2)에 대한 소수성 점수 도표가 인간 GITRL에 유사하게 약 아미노산 20-50사이에 위치한 하나의 잠정적인 소수성 영역을 밝혔다. 이 소수성 세그멘트는 타입 II 막관통 단백질에 대해 예측되는 막관통 영역에 대응한다.

### 실시예 2

#### 마우스 GITRL의 조직 발현

마우스 GITRL cDNA 서열(서열번호:1)에 기초한 올리고뉴클레오티드 프로브가 노던 혼성화, 인 시추 혼성화 및 실시간 PCR을 이용하여 GITRL 발현에 대해 다양한 뮤린 조직 샘플을 시험하는데 사용되었다(예를 들어, Heid et al. (1996) Genome Res. 6: 986-94; Mullah et al. (1998) Nucleic Acids Res. 26:1026-31 ; Giulietti et al. (2001) Methods 25: 386-401).

노던 혼성화가 심장, 지라, 폐, 림프절, 신장 및 간에서 검출 가능한 전사물을 거의 못 보였지만, 이어진 인 시추 혼성화는 심장, 지라, 폐, 림프절, 및 가슴샘에서 GITRL 발현을 밝혔다. 이런 조직에서 GITRL 발현은 일반적으로 심장의 심장막 및 심장내막 세포, 지라의 백색속질, 림프절의 피질, 부피질 및 수질영역 및 가슴샘의 피질 및 수질 영역에 제한되었다.

가슴샘, 지라 및 림프절에서의 GITRL 발현은 실시간 PCR 분석에 의해 추가로 확인되었다. GITRL은 지라 및 일차적으로는 B 림프구인 리포풀리사카라이드(LPS)-자극 지라세포에서 가장 높은 수준으로 발현되었다. 소실될 정도로 (vanishingly) 낮은 양의 GITRL 발현이 위, 뇌 및 신장에서 검출되었다. 지라 및 LPS 모세포 보다는 낮은 정도이긴 하지만, 실시간 PCR 분석은 또한 간, 활성화된 CD25<sup>-</sup>세포, 활성화된 CD25<sup>+</sup> 세포, 및 콘카나발린 A-활성화된 림프절 세포에서 GITRL 전사물을 밝혔다. GITRL 발현 수가 휴지 CD25<sup>-</sup> 또는 CD25<sup>+</sup> 세포에서 검출되었다. 미성숙 및 LPS-자극 골수-유래 가지세포(DC)에 대한 실시간 PCR 분석은 또한 LPC 자극시에 24시간 동안 증가하지만, LPS 자극 48시간 이후에는 기저선 아래로 감소하는 성숙한 DC에 의해 기저선 GITRL 발현을 나타냈다. GITRL 발현은 또한 시험된 모든 내피 세포주 (bEND3, C166, EOMA, MSI 및 SVEC4-10)에서 다양한 정도로 검출되었고, 세포주가 LPS로 자극된 경우에는 비교적 변하지 않음을 나타냈다. 대조적으로, 다음과 같은 특정 기원의 비자극 뮤린 세포주에서는 GITRL cDNA가 PCR에 의해 검출되지 않았다: E10 T 세포주, T2 태아 가슴샘주, T10 형질세포종, EL4 가슴샘종, BAF3 및 PREB pre-B 세포주, B9 B 세포 하이브리도마, DA1G 단핵세포, M1 단핵세포, FBMD-1 태아 골수, P19 배아 암종, MDF 간, 및 E14 배아 줄기세포주.

### 실시예 3

#### 재조합 마우스 GITRL의 기능적 발현

##### Example 3.1 세포-표면 GITR에 대한 GITRL의 결합

실시예 1에서 분리한 마우스 cDNA가 기능적 GITR 리간드(GITRL)를 코딩하는지 결정하기 위하여, FLAG 에피토프에 융합된 마우스 GITRL을 발현하는 Cos 세포(GITRL-Flag-Cos) 또는 FLAG 에피토프에 융합된 대조군 마우스 IL-21 수용체를 발현하는 Cos 세포(IL-21R-Flag-Cos)가 마우스 GITR을 발현하는 293T 세포(GITR-293T)와 다양한 시간동안 배양되었다. 세포-세포 상호작용이 파이코에리트린-표지 항-Flag 항체 (PE-FLAG) 및 플루오레신 이소티오시아테이트 (FITC)-표지 항-GITR을 이용하여 플로우 사이토메트리에 의해 검출되었다. GITR-293T 및 GITRL-Flag-Cos세포의 공원심분리 1분 후에, ~90%의 GITR-293T 세포(FITC 형광에 의해 검출됨)가 FLAG에 대해 공염색되었으며(PE 형광에 의해 검출됨), 이는 GITR-293T 세포가 GITRL-Flag-Cos 세포에 부착되었다는 것을 나타내고, 이런 상호작용은 전체 60분 간의 실험을 통하여 지속되었다. 대조적으로, IL-21R-Flag-Cos 세포와 함께 배양된 GITR-293T 세포는 공원심분리 후 60분에서도 FLAG에 대해 유의하게 공염색되지 않았다. 이런 데이터는 실시예 1에서 분리된 마우스 cDNA가 세포-표면 GITR에 결합할 수 있는 기능적 GITRL을 코딩함을 나타낸다.

##### 실시예 3.2 GITRL의 수용성 GITR에 대한 결합

GITR과 결합하는 마우스 GITRL의 능력이 마우스 GITRL을 발현하는 Cos 세포(GITRL-Cos) 또는 목-트랜스펙션된 Cos 세포를 인간 IgG의 Fc에 융합된 재조합 GITR(GITR-Fc) 또는 대조군 인간 IgG(HIgG)와 함께 배양함으로써 확인되었다. GITRL에 대한 GITR-Fc의 결합은 FITC에 접합된 당나귀 항인 항체(FITC-Ab)를 이용하여 플로우 사이토메트리로 검출하였다. GITRL-Cos 세포와 GITR-Fc의 배양은 GITRL-Cos 세포 및 대조군 HIgG (7. 9%)의 배양과 비교하여 FITC-Ab 결합(28.8%)이 3.6배 증가하였다. 미염색된 GITRL-Cos 세포, CTLA-4과 함께 배양된 GITRL-Cos 세포: Fc 융합 단백질 및 FITC-Ab, 그리고 FITC-Ab와만 배양된 GITRL-Cos 세포는 형광을 나타내지 않았다. 처리된 및 비처리된 목-트랜스펙션된 Cos 세포는 모두 감지할 수 있는 형광을 나타내지 않았다. 이런 데이터는 실시예 1에서 분리된 마우스 cDNA가 수용성 GITR에 결합할 수 있는 기능적 GITRL을 코딩하는 것을 나타낸다.

### 실시예 4

#### GITR에 대한 마우스 GITRL의 결합은 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 세포의 증식을 야기한다

GITRL:GITR 결합이 세포 증식에 미치는 효과가 다양한 농도의 GITR-결합 단백질의 부존재 또는 존재하에 ~50,000 조사된 T 세포-고갈된 비세포(splenocyte), 및 100IU/ml IL-2로 65-72시간동안 ~50,000 뮤린 T 세포를 자극함으로써 결정되었다. 두개의 GITR-결합 단백질이 이러한 에세이에 사용되었다: 작용성 항-GITR 항체 (예를 들어, McHugh et al.

(2002) Immunity 16: 311-23; U.S. Patent Application 10/194,754를 참조) 또는 수정된 래트 YB2/0 세포의 표면상에 발현되는 뮤린 GITRL(GITRL-YB2/0). 세포증식은 배양 중 마지막 6-12간동안  $1\mu\text{Ci}^3\text{H}$ -티미딘으로 세포를 펄스(pulse)하고, 그 후 섬광계수를 통하여  $^3\text{H}$ -티미딘 편입을 측정함으로써 분석되었다.

도 2a에서와 같이,  $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ T 세포는 어떤 농도의 항-GITR 항체에도 반응하지 않았다. 대조적으로, 항-GITR 항체는 시험된 모든 농도에서  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  T 세포의 증식을 자극하였다. 예를 들어, 시험된 것 중 가장 낮은 역가(~0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )의 항-GITR 항체의 존재하에  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  T 세포 배양은 항-GITR 항체 부존재하에 배양된 세포에 대해  $^3\text{H}$ -티미딘 편입 (~15,000 cpm)이 ~3배 증가하였다. 항-GITR 항체의  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  T 세포 증식을 자극하는 능력은 항체 농도 ~0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 최고치인 ~45,000 cpm에 도달했고, 이는 항-GITR 항체 부존재하에 배양된 세포에 대해  $^3\text{H}$ -티미딘 편입이 ~9배 증가한 것이다.

항-GITR 항체에서 얻은 결과와 유사하게, GITRL-YB2/0 세포는  $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ T 세포의 증식을 자극하지 않았다(도 2b). 대조적으로, GITRL-YB2/0 세포는  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  T 세포의 증식을 뚜렷하게 자극하였다. 예를 들어, ~10,000 GITRL-YB2/0 세포의 존재하에  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  T 세포의 배양은 동일한 수의 비수정된 YB2/0 세포 존재하에 배양된 세포와 비교하여  $^3\text{H}$ -티미딘 편입이 ~4-5배 증가하였다. YB2/0 세포의 수를 ~50,000까지 증가시키자 동일한 수의 비수정된 YB2/0 세포 존재하에 배양된 세포와 비교하여  $^3\text{H}$ -티미딘 편입이 ~15배 증가하였다(도 2b).

#### 실시예 5

GITR에 대한 마우스 GITRL의 결합은  $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ T 세포에 대한  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  T 세포-매개 억제를 반전시킨다

본 실시예에 사용되는 T 세포 억제자 분석은 이미 기재되었다(예를 들어, Thornton and Shevach (2000) J. Immunol. 164: 183-90 ; McHugh et al. (2002) Immunity 16: 311-23; 둘다 참고자료로 포함되어 있다). 요약하면, ~50,000개의  $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ 반응자 T 세포가 ~50,000개의 조사된 T 세포-고갈된 비세포, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  항-CD3 항체, 및 다양한 수의 갓 분리된 억제자  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  T 세포의 존재하에 배양된다. 그 후, ~50,000개의 조사된 GITRL-YB2/0 세포 또는 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$  작용성 항-GITR 항체가  $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$  증식 억제를 반전시키는 능력은 섬광계수를 통하여  $^3\text{H}$ -티미딘 편입을 측정함으로써 분석되었다.

도 3a에 도시한 바와 같이,  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  세포는 투여량-의존 방식으로  $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$  세포의 증식을 감소시켰다. 항-GITR 항체 및 GITRL-YB2/0 세포는 모두 시험된  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  억제자 세포수의 전체 범위에 대해  $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$  증식 억제를 완전히 반전시켰다. 따라서, GITRL과 그의 수용체 GITR의 결합은 GITR에 대한 작용성 항-GITR 항체의 결합과 유사하게  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  세포의 억제 기능을 차단하였다. GITRL-YB2/0 세포의 억제 반전 능력은 투여량-의존 방식으로 발생하였고, ~3,000개의 GITRL-YB2/0 세포는 본 에세이에서 적어도 부분적으로 억제를 반전시키거나 감소시켰다(도 3b). 비수정된 YB2/0 및 GITR을 발현하는 YB2/0 세포는 어느 것도  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  T 세포-매개 억제에 대해 감지할만한 효과를 나타내지 못했다(도 3a).

갓 분리한  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  T 세포에서 얻은 결과와는 대조적으로, GITRL:GITR 결합은 항-CD3 항체, T 세포-고갈된 비세포 및 IL-2에 의해 활성화된  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  T 세포에 의해 매개된 억제에 대해 거의 또는 전혀 효과를 나타내지 못했다(도 4). 항-GITR 항체 및 ~50,000개의 GITRL-YB2/0 세포의 첨가도 ~25,000개의 활성화된  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  T 세포에 의해 매개된 억제를 반전시킬 수 없었다. 더 적은 양의 활성화된  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  T 세포가 본 에세이에 첨가된 경우에도(예를 들어, ~1,500-12,500 세포), 항-GITR 항체 및 GITRL-YB2/0 세포는 억제를 부분적으로 감소시켰을 뿐, 완전히 제거하지는 못했다.

#### 실시예 6

항-마우스 GITRL 항체  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  T 세포에 의해 매개된 억제를 보전한다

### 실시예 6.1 항-마우스 GITRL 항체의 분리

마우스 GITRL에 특이적인 항체가 마우스 GITRL cDNA를 발현하는 래트 YB2/0 세포(GITRL-YB2/0)로 면역화된 래트에 의해 제조되었다. 당업계에 잘 알려진 방법을 이용하여, 항체 하이브리도마가 제조되었고, 마우스 GITRL을 발현하는 피닉스 세포를 플로우 사이토메트리를 이용하여 스크리닝하였다. GITRL-피닉스 세포에 특이적으로 결합하지만, 목-트랜스펙션된 피닉스 대조군 세포에는 결합하지 않는 두개의 항체(5F1 및 10F12)가 동정되었다. 상기 항체 하이브리도마를 어메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(ATCC)에 2003년 6월 22일에 기탁하였고; 하이브리도마 5F1에 대해 ATCC는 기탁번호 PTA-5336을 부여하였고, 하이브리도마 10F12에 대해 기탁번호 PTA-5337을 부여하였다.

### 실시예 6.2 항-마우스 GITRL 항체는 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 억제자 활성에 대한 GITRL의 효과를 차단한다

실시예 5에 기재한바와 같이, 세포 표면에서 GITRL를 발현하는 YB2/0 세포는 갓 분리된 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포에 의해 매개되는 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 세포 증식 억제를 반전시킬 수 있다. 항-GITRL 항체가 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포-매개 억제를 보전할 수 있는지를 결정하기 위해, 실시예 5에 기재한대로 T 세포 억제자 에세이가 5F1 또는 10F12 항-GITRL 항체 또는 대조군 항체의 존재 또는 부존재하에 수행되었다.

실시예 5에서 본 바와 같이, GITRL-YB2/0 세포의 존재하에 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> 반응자 T 세포 및 갓 분리된 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 억제자 T 세포의 배양은 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> 세포 증식 억제를 완전히 반전시켰다(도 5a 및 5b). 에세이에 5F1 항-GITRL 항체를 함유하는 10% 하이브리도마 배양 상청액을 첨가하자 부분적으로(도 5b) 내지 거의 완전히(도 5a) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-매개 억제가 재생되었다. 10F12 항-GITRL 항체의 첨가도 유사한 결과를 나타냈다. 예측된 대로, 대조군 항체("대조군 Ig")의 존재는 억제를 반전시키는 GITRL-YB2/0의 능력에 감지할 만한 효과를 나타내지 못했다. 이런 데이터는 항-GITRL 항체가 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 세포의 억제자 활성을 끄는 GITRL의 능력을 차단하는 것을 나타낸다.

### 실시예 6.3 항-마우스 GITRL 항체는 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 존재하에서만 T 세포 반응을 억제한다

림프절 세포 배양이 다양한 농도의 작용성 항-CD3 항체의 존재하에 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 고갈 전(도 6a) 또는 고갈 후(도 6b)에 자극되었고, 섭광계수를 통하여 <sup>3</sup>H-티미딘 편입을 결정함으로써 증식을 측정하였다. 증식에 대한 항-GITRL 항체의 효과를 결정하기 위해, 5F1 항-GITRL 항체를 함유하는 10% 하이브리도마 배양 상청액을 패러렐(paraller) 배양에 첨가하였다.

도 6a에 도시한 바와 같이, 세포가 ~0.075 $\mu$ g/ml 내지 ~0.75 $\mu$ g/ml의 항-CD3 항체로 자극된 경우에 항-GITRL 항체의 첨가는 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포를 포함하는 림프절 세포의 증식을 억제하였다. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포를 함유하는 림프절 세포가 1.0 $\mu$ g/ml 항-CD3 항체로 자극된 경우에, 항-GITRL 항체의 존재하에서 억제는 관찰되지 않았다. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포를 함유하는 림프절 세포에서 얻은 결과와 대조적으로, 항-GITRL 항체의 첨가는 일반적으로 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포가 고갈된 림프절 세포 배양에 대해 억제 효과를 나타내지 않았다(도 6b). 이들을 고려할 때, 이런 데이터는 항-GITRL 항체가 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포상에 발현된 GITR 및 다른 세포상에 발현된 GITRL간의 상호작용을 차단하고, 이런 GITR/GITRL 상호작용의 차단이 면역억제를 재생하는 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 조절 기능을 증가시킨다는 것을 제시한다.

### 실시예 7

#### 림프조직에서 GITRL-발현 세포의 분포

작용성 항-GITRL 항체가 마우스 조직에서 플로우 사이토메트리에 의한 GITRL의 발현을 조사하기 위해 사용되었다. CD4만, CD8만, 또는 CD4 및 CD8을 모두 발현하는 갓 분리된 CD11c<sup>+</sup> 지라 가지세포 (DC) 서브세트는 구성적으로 저수준의 GITRL을 발현하였다(도 7a). 그러나, GITRL의 표면 발현은 CD11c<sup>low</sup>WB220<sup>+</sup> 플라스마사이토이드 가지세포 중에서 현저히 높다(Nakano et al., 2001). 도 7b에서, 항-GITRL mAb 또는 동형 대조군을 이용한 염색이 BALB/c 마우스에서 갓 분리된 CD11c<sup>++</sup> 지라 DCs의 지시된 서브세트상에 행해졌다.

유사하게, 갓 분리된 B220<sup>+</sup> 지라 B 세포는 GITRL을 높은 수준으로 발현하지만(도 7c, 위), 복막 B-1 B 세포 (perC CD11b+ B220+)과 같이 구성적으로 GITRL을 발현하였다. 휴지 복막 마크로파지(perC CD11b+ B220-)가 또한 이 리간드를 발현하는 것으로 확인됐다(도 7c, 아래).

선택이 진행되는 가슴샘세포 서브세트는 측정할만한 양으로 GITRL를 발현하지 않았다(도 7d). 대조적으로, 도 7e에 도시된 바와 같이, GITRL를 가장 높은 수준으로 발현하는 CD44+ CD25+ (R2) 및 CD44-CD25+ (R3) 서브세트를 포함하여, GITRL의 발현은 CD4-CD8-가슴샘 전구체의 모든 서브세트에서 검출될 수 있다.

GITRL는 비자극된 림프절 세포에서 검출할 수 없다(도 7f). GITRL은 또한 비자극된 지라 T 세포에서 검출할 수 없다(데이터에 나와 있지 않음). 이런 데이터는 GITRL의 발현이 전문 항원 제시 세포(DCs, B 세포 및 마크로파지; 도. 7a-7c) 및 가슴샘 CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> 전구체 세포(도 7e)에 의하고, 선택이 진행중인 T 세포(도 7d) 또는 폐리페리(periphery)에 있는 휴지 T 세포(비자극 림프절 및 지라 세포; 도 7f, 및 데이터에 나와 있지 않음)에 의하지 않음을 나타낸다. 이런 데이터는 실시 예 2(위)에 기재한 바와 같이 노던 혼성화, 인 시츄 혼성화, 및 실시간 PCR에 의해 얻은 데이터와 상관지어진다.

#### 실시예 8

APCs는 TLR 자극 후의 GITRL를 하향조절한다

GITRL에 대한 B 세포 활성화 효과는 틀(toll)-유사 수용체(TLR) 리간드 또는 항-CD40 및 IL-4, 또는 항-IgM 처리후에 실험된다. 지라 B 세포 (B220<sup>+</sup> 비세포) 또는 복막 B-1 B 세포(B220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> PerC)의 자극은 빠르지만 일과성의 GITRL 상향조절을 야기했고, 대부분의 처치에서 4시간 후에 분명했다(도 8a). 자극 48-60시간 후에, 발현은 전자극 수준 밀집으로 감소하였고, 안정화되었다. 복강에서 유래한 polyI:C-처리된 B-1 B 세포는 예외적으로, 실험된 시간 대에 이런 하향조절을 나타내지 않았다. 예측된대로, CD86의 수준은 모든 그룹에서 시험과정을 통해 증가하였고, 관측된 GITRL의 하향조절은 세포 사멸에 이차적이 아니라는 것을 가리킨다(데이터는 나와 있지 않음).

항-CD40 및 IL-4의 처리 후에 B 세포에 의해 발현되는 GITRL의 감소는 발현이 T 세포 도움이 제공된 후에 조절될 수 있다는 것을 제시했다. 전체 비세포중에서 B 세포에 의한 GITRL 발현은 항-CD3 항체와의 배양 후에 평가되었다. 이런 배양 조건에서, B220<sup>+</sup> 비세포 상에서 GITRL의 발현은 또한 48시간 이후에 하향조절되었다(도 8b). 따라서, T 세포 활성의 생리학적 수준이 또한 지라 B 세포에 의한 GITRL 발현의 감소를 일으켰다.

지라 CD11c+ DCs는 마그네틱 비드로 강화되었고, LPS의 존재하에 12 및 36시간 배양하여 GITRL의 발현에 대해 실험되었다. 배지 또는 LPS에서 배양된 DC는 초기 12시간 동안 LPS에 의해 유도된 온화한 상향조절을 가지고 GITRL를 발현하였다. 그러나 36시간까지, LPS-처리 DC 및 단지 배지에서만 배양된 것 모두에서 GITRL의 발현을 검출할 수 없었다. 도 8c는 LPS(0.5 $\mu$ g/ml)의 존재 또는 부존재하의 배양 후에 정제된 CD11c+ DC에 의한 지정된 시간대의 GITRL의 발현(위쪽 히스토그램 패널) 및 CD86(B7.2)의 발현(아래쪽 히스토그램 패널)을 나타낸다. 도시된 바와 같이 CD86 (B7.2) 발현은 예측된대로 상향조절되었다(Banchereau and Steinman, 1998). 배지에서 배양된 지라 DC에 의한 GITRL 발현의 감소는 실험실내 배양 중에 일어난 “자발적” DC 성숙(Vremec and Shortman, 1997)이 GITRL의 발현을 하향조절하는데 충분하다는 것을 제시한다. 이런 이유로, DC를 B 세포에 대해 보인 것과 동일하게 처리 하였지만, LPS 자극 후에 결과만을 나타냈다. 다른 발간된 보고서의 결과와 유사하게(Tone et al., 2003), 골수-유래 DC가 GITRL를 구성적으로 발현하고, 그런 발현은 다양한 TLR 리간드 처리 후에 단지 조금 감소한다는 것이 밝혀졌다(데이터에 나와 있지 않음).

수용성 항-CD3 항체(도 8d)의 부존재 ("+ Med.") 또는 존재("+ aCD3")하에 비세포의 48시간 배양하자, CD4 및 CD8 T 세포는 모두 측정가능 수준으로 GITRL를 발현하였고, 앞선 실시간 PCR로 확인하였다(실시 예 2 참조).

#### 실시예 9

GITR/GITRL 상호작용의 차단은 림프구 증식을 저해한다

GITRL가 APC에 의해 구성적으로 발현되고, GITR/GITRL 상호작용이 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 억제기능을 제거한다고 제안되었기 때문에, 항-GITRL 항체가 제2 림프기관에 있는 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 내인 집단에 의해 매개된 억제를 증가시키는 능력이 시험되었다. 전 림프절 세포(LN), 전 비세포(Sp), 및 CD25<sup>+</sup> 세포( $\Delta$ 25)가 결실된 LN 또는 Sp의 증식 반응을

대조하였고, 이들은 각각 항-GITRL 항체(속이 찬 원) 또는 대조군 항체(Rat IgG; 속이 빈 원)와 배양되었다. 항-GITRL 항체의 첨가는 전 림프절 세포의 증식 반응을 감소시켰고(도 9a, 위의 왼쪽), 전 비세포에 대해서는 덜 감소시켰다(도 9a, 아래의 왼쪽). 그러나, 저해 효과는 CD25<sup>+</sup> 세포가 결실된 배양에서 또한 명백하였고(도 9a, 위의 오른쪽(LN); 아래의 오른쪽(Sp)), GITR/GITRL 상호작용이 CD25<sup>-</sup> T 세포에 대한 공자극 신호를 제공한다는 가능성을 높였다.

이런 가능성을 직접 시험하기 위해, 정제된 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포의 증식 반응이 GITRL를 발현하는 APC 및 YB2/0의 존재하에 시험되었다. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포의 증식은 모두 GITRL-발현 세포의 존재하에 실질적으로 증가하였고(도 9b), 이것은 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 세포에 대한 낮은 농도의 항-CD3에서 특히 명백했다.

항-GITR 항체가 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 세포에 대해 작용함으로써 그의 효과를 매개한다는 것은 휴지 T 세포가 단지 낮은 수준의 GITR을 발현하기 때문에 모순처럼 보일 수 있다. 그러나, 이런 모순은 GITR 발현이 T 세포 활성화후에 급격히 상향조절되어(도 9c) 활성화 후 48 및 72시간 사이에 최고 수준에 도달한다는 설명에 의해서 해결된다. 이런 결과는 GITR/GITRL 상호작용이 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포와 독립적으로 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 세포 활성화에 영향을 준다는 가능성을 뒷받침한다.

### 실시예 10

#### 억제 반전은 CD25<sup>-</sup> T 세포에 의한 GITR 발현을 요구한다

종래의 연구에서 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포에 대한 GITR의 리게이션이 그들의 억제 능력을 저해한다고 제시하였다(McHugh et al, 2002; Shimizu et al., 2002). 그러나, 활성화된 T 세포가 또한 GITR을 발현하기 때문에, 우리는 억제 제거를 야기하는 GITR 채용(engagement)의 관련 세포 표적을 결정하려고 하였다. GITR<sup>+/+</sup> 및 GITR<sup>-/-</sup> 마우스로부터 얻은 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 및 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 세포의 조합을 이용하여 공배양에서 항-GITR mAb (DTA-1)의 존재하에 또는 부존재하에 증식을 측정하였다(도 10). 종래에 보고된 바와 같이(Shimizu et al., 2002), CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 및 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 세포가 GITR을 발현하는 경우에, 공배양에 대한 항-GITR mAb의 첨가는 동형 항체를 받은 공배양과 비교하여 증식 반응을 증가를 야기하였다(도 10a, 패널 a). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>이 아닌, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 세포가 공배양에서 GITR을 발현하는 경우에, 항-GITR 항체의 첨가는 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포가 GITR을 발현했던 경우에 보였던 것과 유사하게 T 세포 증식의 증가를 야기하였다(도 10a, 패널 b). 그러나, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> GITR<sup>-/-</sup> 및 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> GITR<sup>+/+</sup> T 세포의 공배양에서, 항-GITR 항체의 첨가는 증식에 어떤 효과도 없었다(도 10a, 패널 c). 예측된 대로, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> GITR<sup>-/-</sup> 및 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> GITR<sup>-/-</sup> T 세포의 공배양에 대한 항-GITR 항체의 첨가는 또한 T 세포 증식에 효과가 없다(도 10a, 패널 d). 상술한 것과 유사한 결과가 시판되는 폴리클로날 항-mGITR 항체 제제로 얻어 졌다(데이터는 나와 있지 않음).

억제 제거가 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포에 의해 발현된 GITR의 리게이션에 의한 결과라는 가설을 뒷받침하는 강력한 증거가 래트 반응자 및 마우스 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 조절 T 세포를 조합(Shimizu et al., 2002)을 이용하는 기준의 앞의 연구에서 얻어졌다. 본 연구에 사용된 항-GITR mAb (DTA-1)는 래트에서 제조되었고, 결과적으로 래트 세포(id.)에 결합하지 않았다. 위에서 개시된 것과 유사한 실험이 래트 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> 반응자, 마우스 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 억제자 및 조사된 래트 APCs의 공배양을 이용하여 수행되었다(도 10b, 패널 b). 공배양된 마우스 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> 반응자, 마우스 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 억제자 및 조사된 래트 APCs가 대조군으로 포함된다(도 10b, 패널 a). GITR<sup>-/-</sup> 마우스로부터 얻은 데이터와 유사하게, GITR이 반응 CD25<sup>-</sup> 집단에 크로스-링크할 수 없으면 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-매개 억제의 제거는 발생하지 않았다(도 10b, 패널 b).

래트/마우스계를 추가적인 분석이 공배양된 래트 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> 및 마우스 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포에 의한 CFSE의 희석을 플로우 사이토메트리로 조사함으로써 수행되었다. 동형 대조군 항체의 존재하에, 억제자 대 반응자의 비율이 1:8로 배양되는 경우에, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 세포는 마우스 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포에 의해 단지 부분적으로 억제되었다. 그러나, 항-GITR 항체의 첨가는 마우스 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 추가 확장 및 래트 T 세포 억제의 필연적 증가를 유도하였다(도 10c, 오른쪽 히스토그램 패널). GITR 리게이션 후에 이어지는 마우스 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 증가된 CFSE 희석은 차단 항-CD25 항

체의 첨가에 의해 부분적으로 저해될 수 있고, 반응자 T 세포에 의해 초기에 만들어진 IL-2가 또한 이런 확장에 필요하다는 것을 제안한다(데이타는 나와 있지 않음). 이와 함께, 이런 결과는 반응자 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 세포에 대한 GITR의 채용이 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포-매개 억제를 극복하는데 필요하다는 것을 나타낸다.

### 실시예 11

GITR 신호의 발현은 내인 조절 T 세포에 의해 매개되는 억제를 조절하고 극복하는데 필요하다

T 세포의 활성화 동안에 CD28 및 GITR 양자가 공자극 신호를 제공하는 것으로 보이기 때문에, 우리는 그들이 일차 반응 동안에 다른 역할을 하는지 결정하려고 하였다. 우리는 내인 림프절 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 존재 또는 부존재하에, 그리고 외인 IL-2의 존재 또는 부존재하에 GITR 및 CD28C의 T 세포 증식능을 비교하였다(도 11). 증식 연구를 위한 동일한 샘플들이 72시간 배양 기간 후에 CFSE 희석에 대해 동시에 분석되었다. 외인 IL-2의 부재하에, GITR<sup>-/-</sup> 및 CD28<sup>-/-</sup> 동물로부터 얻은 GD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포는 증식에 실패하였다(도 11a, 패널 a). GITR<sup>+/+</sup> 동물로부터 얻은 LN 세포는 야생형 및 GITR<sup>-/-</sup> 동물의 중간 표현형을 나타냈다(도 11a, 패널 a). 야생형 마우스로부터 얻은 반응자 T 세포는 CD25<sup>+</sup> T 세포의 고갈 후에 유의하게 증가되었으며, 이런 배양 조건하의 억제는 정상적인 림프절에 존재하는 CD25<sup>+</sup> T 세포에 의해 매개된다는 것을 나타낸다(도 11a, 패널 a 및 b를 비교). 가장 중요한 것은, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 부재하에, GITR<sup>-/-</sup> 마우스의 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> 림프절 T 세포 반응이 야생형 마우스의 반응에 상당하다는 것이고, <sup>3</sup>H-티미딘 편입(도 11a, 패널 b) 및 CSFE 희석(도 11b, 위쪽 패널 세트)으로 분석되었다. 그러나, 72시간 후에, CD28<sup>-/-</sup> 동물로부터 얻은 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포는 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 부존재하에서도 증식하지 않았다(도 11a, 패널 b).

외인 IL-2가 완전한 림프절 세포 배양에 첨가된 경우에, 매우 다른 패턴의 반응이 관찰되었다. CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포 증식은 GITR의 부존재하에 완전히 저해되었고, <sup>3</sup>H-티미딘 흡수(도 11a, 패널 c) 및 CSFE 희석의 결손(도 11b, 중간 패널 세트)으로 분석되었다. 대조적으로, CFSE 프로파일은 CD8<sup>+</sup> T 세포가 측정된 증식에 대해 주로 책임이 있다는 것을 나타내지만, CD28<sup>-/-</sup>로부터 얻은 T 세포의 측정할 수 있을 정도의 증식이 <sup>3</sup>H-티미딘 편입(도 11a, 패널 c)에 의해 검출되었다. IL-2(50U/ml)의 존재하에, 모든 동물로부터 얻은 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포 결손 림프절은 유사한 수준의 증식을 나타냈고, <sup>3</sup>H-티미딘 편입(도 11a, 패널 d) 및 CSFE 희석(도 11b, 아래쪽 패널 세트)으로 분석되었다. 이를 함께 고려할 때, 이런 결과는 GITR<sup>-/-</sup> 및 CD28<sup>-/-</sup> 마우스에서의 T 세포 활성 결손이 다르다는 것을 나타낸다.

외인 IL-2의 존재하에 GITR<sup>-/-</sup> 마우스의 림프절에 존재하는 완전(total) T 세포의 증식 불능은 높은 친화성 IL-2 수용체의 발현이 이런 동물에서 영향을 받을지 모른다는 것을 제안하였다. IL-2Ra 사슬의 발현은 일차적으로 그의 리간드에 의해 유도되기 때문에(Depper et al., 1985 ;Malek and Ashwell, 1985), GITR<sup>-/-</sup> 마우스로부터 얻은 항-CD3-활성화된 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 세포의 상기 사슬 발현능은 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 존재 또는 부존재하에, 그리고 IL-2의 존재 또는 부존재하에 시험되었다(도. 11c). 조절 T 세포의 존재하에, 공배양에 대한 IL-2의 첨가는 24시간 후에 GITR<sup>-/-</sup>이 아닌 GITR<sup>+/+</sup> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 세포에 의한 CD25의 발현 증가를 나타냈다(도 11c, 아래쪽의 오른쪽 히스토그램 패널). 그러나, IL-2-유도된 CD25 발현을 겪는 GITR<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 세포의 능력은 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포를 제거함으로써 쉽게 재생된다(도 11c, 아래쪽의 왼쪽 히스토그램 패널). 따라서, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 존재하에 GITR<sup>-/-</sup> T 세포에 의한 IL-2 반응성의 장애는 적어도 부분적으로 CD25 발현을 유도하는데 충분한 농도의 외인 IL-2 존재하에서 높은 친화성의 IL-2 수용체를 야생형 세포상에 발현하지 못하는 그들의 능력에 기인한다.

### 실시예 12

CD28-의존 공자극은 GITR 발현 및 반응성을 증가시킨다

위에서 제시된 데이터가 CD25<sup>-</sup> T 세포상에 GITR 또는 CD28의 채용이 반응자 T 세포가 억제를 탈출하게 하는 신호를 제공한다는 것을 제안하지만, 이런 과정에 포함된 신호의 본질은 불명확하게 남아 있다. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 존재하에 IL-2에 의한 CD28<sup>-/-</sup>CD8<sup>+</sup> T 세포의 증식반응의 부분적인 구조는 CD28/B7 신호가 GITR/GITRL 상호작용에 대한 T 세포 감수성을 조절할지 모른다는 것을 제안하였다.

또한, 기존의 연구는 CD28<sup>-</sup>CD80/CD86 상호작용이 일부 TNFR-페밀리 멤버(Gilfillan et al., 1998; Rogers et al., 2001)의 발현을 증가시킬 수 있다는 것을 나타냈다. 따라서, 우리는 GITR에 대해서 이러한 가능성성을 실험하였다. CD28<sup>-/-</sup> 또는 야생형 마우스로부터 얻은 정제된 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포를 비자극 상태로 유지하거나 또는 플레이트-바운드(plate-bound) 항-CD28 항체의 존재 또는 부존재하에 저농도의 플레이트-바운드 항-CD3 항체로 활성화하였다(도 12a). 항-CD3에만 노출된 야생형 T 세포는 GITR을 조금만 상향조절 시켰지만, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포에 의한 GITR의 발현은 항-CD28을 포함함으로써 크게 증가하였다.

유사하게, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 세포에서 GITR 발현의 상향조절은 항-CD80/CD86 (항-B7.1/7.2)의 첨가에 의해 현저히 저해되었다(도 12b, 왼쪽 히스토그램 패널). 항-IL-2/IL-2R mAbs를 함유하는 배지에서 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 세포에 의한 GITR 상향조절이 차단되지 않듯이, 항-CD80/CD86을 함유하는 배지에서 GITR 발현의 저해는 IL-2의 감소된 생산에 벼금가지 않는다(도 12b, 오른쪽 히스토그램).

CD28-유도 공자극 신호에 의해 유도된 GITR의 증가된 발현은 GITR 신호에 대한 증가된 반응과 평행하다(도 12c). 항-GITR 항체의 첨가는 야생형 마우스에서 얻은 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> 작동 T 세포 모두의 증식을 실질적으로 증가시켰다(도 12c, 왼쪽 패널). 그러나, 항-CD80/CD86이 이러한 배지에 첨가된 경우에 항-GITR 항체의 존재는 시험된 항-CD3 농도 범위에 대해 GITR<sup>+/+</sup> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 세포(도 12c, GITR<sup>+/+</sup>, 위의 왼쪽; GITR<sup>-/-</sup>, 위의 오른쪽) 및 GITR<sup>+/+</sup>CD8<sup>+</sup> T 세포(도 12c, GITR<sup>+/+</sup>, 아랫쪽의 왼쪽; GITR<sup>-/-</sup>, 아랫쪽의 오른쪽)의 증식을 조금만 증가시켰다.

항-GITR는 GITR<sup>-/-</sup> 마우스로부터 얻은 정제된 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포의 반응에 영향을 주지 않았다(도 12c, 오른쪽 패널). 이러한 데이터는 IL-2 생산의 공자극과 다른 CD28- 매개 신호가 GITR 발현을 증가시키고 GITR-매개 신호를 촉진한다는 것을 제시하였다.

### 실시예 13

GITR에 대한 GITRL의 결합은 작동 T 세포에게 공자극 신호를 제공한다.

4 만개의 작동 HT-2 조력(helper) 세포(GITR<sup>+</sup>/TCR<sup>+</sup>)가 다음 시약의 부존재 또는 존재하에 배양되었다: 1) 1:1~1:2 비율의 항-CD 코팅된 비드, 2) GITRL 발현을 위한 수정되지 않은(YB2/0 parental) 또는 수정된(YB2/0 muGITRL) 만개의 YB/2 세포, 및 3) 동형(isotype) 대조군 항체 또는 네개의 다른 항-GITRL 항체(5F1, MGTL-10, MGTL-15, 또는 폴리클로날 항-GITRL 항체)의 증가하는 농도. 증식은 44시간의 배양기간 중 마지막 5시간에 대해 <sup>3</sup>H-티미딘 편입에 의해 측정되었다. 도 13a는 GITRL이 항-CD3로 자극된 T 세포의 증식을 증가시킨다는 것을 나타낸다. 추가적으로, GITRL-매개 T 세포의 증식 증가는 5F1 항체에 의해 차단될 수 있지만, 동형 대조군 항체(도 13b) 및 시판되는 MGTL-10, MGTL-15 및 폴리클로날 항-GITRL 항체(도 13c)에 의해서는 차단되지 않았다. 이러한 데이터는 GITRL이 공자극 신호를 제공하고, 또한 5F1이 GITRL에 대한 중화 항체라는 것에 대한 추가적인 증거를 제공한다.

### 실시예 14

항-GITRL 항체를 이용하여 GITR-GITRL의 결합을 막는 것은 PLP 유도 실험 자가면역 뇌척수염의 입양전달을 차단한다.

9주령 암컷 SJL 마우스를 완전 프로인트 항원보강제 중의 150 $\mu$ g PLP 웨티드(아미노산 139-151)[HSLGKWLGHDPDKF(서열번호:12)]로 면역화 시켰다. 면역화하고 10일 후에, 비세포(splenocyte)를 채취하고 생체외에서 3일간 10 $\mu$ g/ml 항체의 부존재(비처리) 또는 존재(항-GITRL 항체 또는 대조군 항체)중의 10 $\mu$ g/ml PLP(아미노산 139-151)로 재자극 시켰다. 재자극 후에, 5X10<sup>6</sup> 비세포를 10주령의 실험 안한 SJL에 입양전달하였고, 마우스를 52일간 실험 자가면역 뇌척수염

(EAE)에 대해 감시하였으며, 0 내지 5의 척도로 측정하였다. EAE는 항체의 부존재하(비처리)에 재자극된 비세포를 받은 마우스 및 대조군 항체(CK01)의 존재하에 재자극된 비세포를 받은 마우스에서 각각 40% 및 80% 발달하였다(도 14). 추가적으로, 비처리된 비세포를 받은 동물과 대조군 항체로 처리된 비세포를 받은 동물 사이의 질병 척도는 유의한 차이가 없었다. 중요한 것은, 항-GITRL 항체(5F1)의 존재하에 재자극된 비세포를 받은 마우스에서는 어느 것도 EAE가 발달하지 않았다( $p = 0.0023$  대 대조군 항체 처리)(도 14). 이런 데이터는 GITR/GITRL 경로의 차단이 CD25-T 세포의 억제 극복 능을 제한하고, 이로 인해 자가면역 반응에 미치는 능력을 하향조정한다는 것을 제시한다.

#### 실시예 15

##### 실험 방법

##### 실시예 15.1: 항체 및 시약

플로우 사이토메트리 또는 기능적 연구에 사용된 모든 항체는 다음을 제외하고는 BD-Pharmingen에서 입수하였다: 삼색 표지된 CD4 (클론 CT-CD4) 및 B220 (클론 RA3-6B2)은 Caltag(Burlingame, CA)에서 입수하고, MGTL-10, MGTL-15, 및 폴리클로날 항-GITRL 항체는 Alexis Biochemicals (San Diego, CA)에서 입수하였다. 염소-항-IgM,  $\mu$ -사슬의 정제된 F(ab')<sub>2</sub> 단편은 Jackson Immunoresearch (West Grove, PA)에서 입수하였다. 항-IL-2(클론 S4B6)은 복수(ascites)로서 사용되었다. 인간 재조합 IL-2은 National Cancer Institute (Frederick, MD)에서 입수하였다. IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-12, 및 T 세포 강화 컬럼을 R & D Systems(Minneapolis,MN)에서 구매하였다. 폴리 I:C 및 LPS는 Sigma에서 구매하였다. CpGs는 InvivoGen (San Diego, CA)에서 구매하였다. 항-GITRL(클론 5F1; 또한 클론 10F12) 및 항-GITR(클론 DTA-1) 및 PLP 웨პ티드는 "회사내"에서 제조되었다. 항-B220, -CD11c, -CD11b, -CD8, -CD4 및 -PE 마그네틱 비드는 Miltenyi(Auburn, CA)에서 구매하였다.

##### 실시예 15.2 : 마우스

BALB/c 및 C57BL/6 마우스(6-8 주령 암컷)을 NCI Frederick animal facility(Frederick, MD)에서 구매하였다. CD28-/- 마우스는 Dr. Alfred Singer (NIH/NCI)에 의해 제공되었다. GITR-배아(Sv129xB6)는 C.Ricarrdi(Perugia University Medical School, Italy)에 의해 제공되었다(Ronchetti et al., 2002). 유도된 GITR+/- 마우스를 C57BL/6 마우스와 역교 배 시켰고, 생긴 자손을 PCR로 변이체 대립 유전자에 대해 스크리닝 하였다. 그 후, 동정된 GITR+/- 자손은 GITR+/- 마우스를 제조하기 위해 상호교배 되었다. 모든 마우스는 SPF(특정 병원균 없음) 조건하에 NIH/NIAID 시설에서 사육 및 수용되었다.

##### 실시예 15.3: cDNA 클로닝 및 발현

인간 GITRL에 대한 아미노산 서열(GenBank Acc. No. NM\_005092)가 mGITRL에 대해 셀레라 데이터베이스를 탐색하는데 사용되었다. 게놈 서열 ga\_x5j8b7w7wj5\_041.cm\_aa\_2은 세 개의 하이 스코어링 페어(HSP) 영역을 포함한다. 이런 영역이 마우스 GITRL의 엑손에 대응한다는 가정하에, PCT 증폭을 위해 프라이머가 설계되었다. 포워드 프라이머(5'-ATGGAGGAAATGCCTTGAGAG-3') (서열번호:4) 및 리버스 프라이머는(5'-GAATGGTAGATCAGGCATTAAAGATG-3') (서열번호:5) 마우스 가슴샘 도서관으로부터 cDNA 클론을 증폭하였다. 생성된 단편은 서브클로닝 되었고, DNA 서열이 결정되었다. 그 후의 풀-렌스 클론은 PCR에 의해 5'-TTTAAAGTCGACCCACCATGGAGGAAATGCCTTGAGAG-3' (포워드) (서열번호:6) 및 5'-TTTAAAGAATTCTCATTAAGAGATGAATGGTAGATCAGGCAT-3' (리버스) (서열번호:7) 프라이머를 이용하여 앞의 구조물로부터 증폭되었다. 생성된 PCR 단편은 GFP-RV 레트로바이러스 벡터로 서브클로닝 되었고(Ouyang et al., 1998), 최종 cDNA 클론의 서열 결정이 수행되었다. 그 후, 이 벡터는 피닉스 세포주로 트랜스펙션 되었다. 트랜스펙션 된 피닉스 세포로부터의 상청액은 YB2/0 세포를 형질전환하는데 사용되었다. 그 후, GFP-발현 YB2/0 세포는 배양에서 FACS 소팅되고 유지되었다. mGITRL의 예측된 아미노산 서열은 그의 서열 중 아미노산 위치 48의 발린이 알라닌으로 치환된 것을 제외하고는 다른 그룹(Kim et al., 2003)의 것과 동일하다.

##### 실시예 15.4: 모노클로날 항체의 생산 및 정제

루이스 레트는 적절한 양의 CFA 중의  $100 \times 10^6$  YB2/0-GITRL 세포로 한차례 면역화 되었다. 2주 후에, 이러한 레트는 적절한 양의 IFA 중의  $100 \times 10^6$  YB2/0-GITRL 세포로 면역화 되었다. 2주 후에, 레트는 PBS 중의  $50 \times 10^6$  YB2/0-GITRL 세포로 부스트(boost) 되었다. 4일 후에, 지라가 채취되었고, 세포 융합이 종래에 개시된 바에 수행되었다(Coligan et al.,

2003). 생성된 하이브리도마로부터 얻은 상청액은 피닉스-GITRL 및 피닉스 세포를 이용하여 플로우 사이토메트리에 의해 스크리닝 되었다. 단백질-G-가 충진된 컬럼을 이용하여 세포 배양 상청액으로부터 항체가 정제되었고, 용출된 항체는 PBS에 대해 투석하였다.

#### 실시예 15.5: 세포 정제

마우스의 말초 림프절로부터 T 세포가 정제되었다. CD25<sup>+</sup> T 세포는 마그네틱 비드로 표지되었고, 자동 MACS(Miltenyi Biotech, Auburn, CA)에서 제조자의 프로토콜에 따라 정제되었다. CD25<sup>+</sup> 세포의 순도는 전형적으로 97 내지 99%였다. 네가티브 분획의 세포 잔유물은 이어서 항-CD4 또는 항-CD8 마이크로비드로 표지되었고, 자동MACS에서 파지티브 선택과정을 이용하여 정제되었다. 순도는 일반적으로 90-95%였다. T 세포-고갈된 지라 혼탁액은 자동MACS를 이용하여 Thy1.2<sup>+</sup>를 고갈시킴으로써 적혈구-용해된 혼탁액으로부터 제조되었다. B220<sup>+</sup> 세포는 항-B220 마이크로비드(Miltenyi Biotech, Auburn, CA)와 유사한 방식으로 정제되었고, 생성된 물질의 순도는 일반적으로 90% 보다 높았다. 복막 세포는 복강(PerC)을 10ml의 찬 HBSS로 씻어냄으로써 제조된다. 지라 DC에 대해, 비세포 혼탁액은 기재된 것과 유사한 방식으로 제조된다(Vremec et al., 2000). 그 후, 지라 DC는 항-CD11c 마이크로비드(Miltenyi Biotech, Auburn, CA)를 이용하여 혼탁액으로부터 정제되었다. 생성된 DC 혼탁액은 일반적으로 85 내지 90% 순수했다. 레트 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>세포는 항-PE 마이크로비드에 의해 수반되는 PE-항-레트 CD25 (OX-39) 항체를 이용하여 CD25<sup>+</sup> 세포의 레트 비세포를 고갈시킴으로써 제조된다. 고갈 후에, CD4<sup>+</sup> 세포는 항-레트-CD4 마이크로비드를 이용하여 고갈된 분획으로부터 선택된다.

#### 실시예 15.6: 시험관내 증식 시험

억제 분석이 기재된 바와 같이 수행되었다(Thornton and Shevach, 1998). 요약하면, 96-웰 플랫-보톰 플레이트에서 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  항-CD3 mAb(2C11)의 존재하에 조사된 (3000R), T 세포-고갈된 비세포( $5 \times 10^4$ )를 가지고 FBS-첨가된 RPMI 1640 (Atlanta Biologicals, Atlanta, GA)에서 ( $5 \times 10^4$ ) 세포를 배양하였다. 일부 배양에 대해서는 GITR 또는 레트 Ig 동형에 특이적인 항체를 최종 농도  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 해서 첨가하였다. 역가된 수의 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 세포가 최종 억제자 대 반응자의 비율이 0:1, 1:2, 1:4, 또는 1:8이 되게 첨가되었다. 배양을 72시간 배양중의 마지막 5-8시간 동안 1uCi의  $^3\text{H}$ -티미딘으로 펄스시켰고, 다르게 지시되지 않는다면 트리플리케이트(triplicate)로 수행되었다. 레트 및 마우스 T 세포 서브세트의 공배양은 조사된 (3000R) CD4-고갈된 레트 비세포가 APC로 사용된 점을 제외하고는 유사한 방식으로 셋업되었고, 레트 및 마우스 T 세포는 항-레트-CD3 ( $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 및 항-마우스-CD3 ( $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) mAbs의 칵테일로 자극되었다.

#### 실시예 15.7: 림프절 세포의 시험관내 배양 및 CFSE 표지

CD25<sup>+</sup>-고갈된 림프절 세포 혼탁액이 상술한 바와 같이 자동MACS에서 수행되었다. 세포는 CFSE로  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 8분간 37°C 워터 배스에서 표지되었다. 그 후, 세포를 완전 RPMI 1640로 세척하였다. 그 후, 세포( $5 \times 10^4/\text{웰}$ )을 rhIL-2 ( $50 \text{U}/\text{ml}$ )의 존재 또는 부존재하에 96-웰 플레이트에서 배양하였다. 뉴플리케이트 웰은 72시간 배양중의 마지막 5-8시간 동안 1uCi의  $^3\text{H}$ -티미딘으로 펄스되거나 또는 CFSE 희석 분석을 위해 사용되었다.

#### 실시예 16 토의

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 기능에서 GITR의 역할은 GITR에 대한 폴리클로날 및 모노클로날 항체 모두가 CD25<sup>+</sup> 및 CD25<sup>-</sup> T 세포의 공배양에 첨가된 경우 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 억제 효과를 반전시킨다는 것으로부터 유추되었다(McHugh et al., 2002; Shimizu et al., 2002). 갓 체외이식된 CD25<sup>+</sup> T 세포가 휴지 CD25<sup>-</sup> T 세포보다 높은 수준으로 GITR을 발현시키고, IL-2과 함께 항-GITR 항체가 TCR 신호의 부재하에 CD25<sup>-</sup> T 세포가 아닌 CD25<sup>+</sup> T 세포의 증식을 유발하기 때문에, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포는 항-GITR 물질의 가능성 있는 타겟인 것으로 보인다. 더욱이, Shimizu et al가 레트 레트 세포에 비반성인 항-mGITR mAb를 마우스 CD25<sup>+</sup> 억제자 및 레트 반응자 T 세포의 공배양에 첨가한 경우에 억제의 반전이 관찰되었다. 이런 결과는 작용성 항-GITR 항체 및 추정컨대 그의 생리학적 리간드에 의한 GITR의 채용이 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 억제 활성을 저해하고, 외인 IL-2에 대한 CD25<sup>+</sup> T 세포의 비반응성을 반전시키는 신호를 생성한다는 가정을 이끌었다.

실험은 마우스 GITRL을 클로닝하고, 그의 조직 분포를 분석하며, 야생형 및  $\text{GITR}^{-/-}$  마우스로부터 얻은  $\text{CD25}^+$  및  $\text{CD25}^-$  T 세포의 혼합물을 이용하여 작용성 항-GITR 항체에 대한 표적을 명확히 결정함으로써 이러한 연구를 확장하고 확인하기 위해 설계되었다. 집합적으로, 이 연구는 항-GITR 항체 및 GITRL이  $\text{CD25}^-$  T 세포에게  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$  T 세포에 의한 억제에 대해 그들의 역치를 높이는 독특한 신호를 제공함으로써  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$  T 세포의 억제 효과를 제거하는 것을 나타낸다. 이 연구는 또한 GITRL이 B-1 B 림프구상의 높은 수준의 발현과 함께 APC의 세포 표면에서 선택적으로 발현된다는 것을 나타낸다; 통상적인 B-2 B 림프구, 마크로파지, 및  $\text{B220}^+$  DCs의 중간 수준; 및  $\text{B220}^-$  DC 서브세트에서 보다 낮은 수준. GITRL은 휴지 APC상에서 발현되고, 그의 발현이 B 세포 수용체, CD40 또는 다른 톨-유사 반응을 유발함으로써 하향조절된다는 점에서 TNF 서브페밀리 멤버 중에서 독특하다. TNF 서브 패밀리의 다른 멤버(4-1BB-L, OX40-L, LIGHT, CD70, CD30-L)는 휴지 APC에서 검출할 수 없고, 그의 발현이 톨-유사 수용체 자극을 통한 APC의 활성화에 의해 상향조절된다(Croft, 2003). 본 연구는 세포 표면으로부터 GITRL의 하향조절이 수용성 GITRL의 분비에 의해 수반된 것인지 말할 수 없지만, Tone et al. (2003)은 DC, 마크로파지 및 B 세포의 LPS 자극이 GITRL mRNA의 하향조절을 야기한다고 보고하였다. 휴지 APC상에서의 GITRL의 발현은 그것이 T 세포 활성화 초기 과정에서 기능한다는 것을 강력하게 제시한다. 내피 세포(Gurney et al., 1999; Kwon et al., 1999)를 포함하는 다른 세포 타입이 T 세포를 활성화하고, DN 가슴샘 세포의 특정 서브세트가 또한 GITRL을 발현하는 것을 보였으며, 이 분자의 후자의 세포 타입에 대한 기능은 결정되어야 할 것으로 남아 있다.

항-GITR 항체 및 GITRL 발현 세포가  $\text{CD25}^-$  T 세포 단독의 활성을 증가시키는 능력 및 항-GITRL이 부분적으로  $\text{CD25}^+$  T 세포의 부재하에  $\text{CD25}^-$  T 세포의 활성화를 저해하는 능력은 이런 물질의 세포 표적에 대한 주의 깊은 재조사를 촉구하였다. 야생형 및  $\text{GITR}^{-/-}$  마우스로부터 얻은  $\text{CD25}^+$  및  $\text{CD25}^-$  T 세포의 공배양에 대한 항-GITR의 첨가는 항체-매개된 억제의 반전의 표적이  $\text{CD25}^-$  T 세포임을 나타냈다. 이러한 사실은 결론적으로  $\text{CD25}^+$  T 세포 서브세트에 대한 GITR 리케이션이 그들의 억제 기능을 제거하지 않는다는 것을 나타내는 공배양에 있는 레트  $\text{CD25}-$ 반응자 및 마우스  $\text{CD25}^+$  억제자 T 세포를 이용한 실험에 의해 더욱 뒷받침 된다. 실제로, CFSE 희석 실험은 GITR 리케이션이 공배양에서  $\text{CD25}^+$  T 세포의 확장을 촉진하고, 최종적으로 레트  $\text{CD25}-$ 반응자의 억제를 증가시켰다. 따라서, Shimizu et al (2002)에 의해 보고된 항-GITR-처리된 레트/마우스 공배양에서의 증식 증가(레트 T 세포에 의한 것으로 추정 되었었다)는 실제로 마우스  $\text{CD25}^+$  억제자 세포의 증식을 반영한 것이라는 것이 가능하다. 이것은  $^3\text{H}$ -티미딘 편입 측정만으로는 명확하지 않다.

종래의 한 보고서는 GITR-결손 T 세포가 TCR 자극에 매우 민감하다고 제시하였다(Ronchetti et al. , 2002). 그러나, 본 판측에 대해 그러한 관찰로부터 외삽법에 의해 추정하는 것은 상기 보고서가 정제된  $\text{CD4}^+$ ,  $\text{CD8}^+$  T 림프구의 반응을 분석하지 않았고,  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$  T 세포의 역할에 대해 평가하지 않았기 때문에 어렵다. 본 연구에서,  $\text{GITR}^{-/-}$  마우스로부터 얻은 고도로 정제된  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^-$  및  $\text{CD8}^+$  T 세포의 반응은 대조군에 비결될만 하다. 그러나, 생리학적 수의 조절 T 세포의 존재하에, GITR $^{-/-}$  동물로부터 얻은  $\text{CD4}^+$  및  $\text{CD8}^+$  T 세포는 모두 CD3 가교에 완전히 비반응적이다. 이 결과는 GITR/GITRL 상호작용의 부존재시에 억제가 우세하다는 것을 분명하게 나타낸다. 실제로, GITR-1 마우스로부터 얻은  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^-$  T 세포의 활성화 억제는 너무 강력해서 정상적으로는 야생형  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^-$  T의 반응에 대한 더 많은 수의  $\text{CD25}^+$  T 세포에 의한 억제 효과를 제거하는 고 농도의 외인 IL-2를 첨가해도 극복할 수 없다(Takahashi et al. , 1998; Thornton and Shevach, 1998).  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$ 의 억제 효과는  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^- \text{GITR}^{-/-}$  반응자 집단에 의한 IL-2 생산 및 CD25의 발현의 저해에 의해 매개되고, 이것은 정상  $\text{CD8}^+$  T 세포 반응에 대한  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$  T 세포의 효과에 대해 종래에 기재된 것과 유사하다(Piccirillo and Shevach, 2001).

GITR 및 CD28에 의해 전달되는 공자극 신호는 다른 것 같지만, 서로 연관되어 있다. 조절 T 세포의 부재하에, GITR $^{-/-}$  마우스로부터 얻은  $\text{CD4}^+$  및  $\text{CD8}^+$  T 세포의 반응은 야생형 마우스로부터 얻은 세포의 것과 동일하다. 대조적으로, 본 연구에 사용된 배양 조건하에서, CD28 $^{-/-}$  마우스로부터 얻은  $\text{CD4}^+$  및  $\text{CD8}^+$  T 세포는 비반응적이다. 역으로, 조절 T 세포를 함유하는 배양에 IL-2가 첨가된 경우에, CD28 $^{-/-}$  마우스로부터 얻은  $\text{CD8}^+$  세포의 반응은 부분적으로 재생되었지만, GITR $^{-/-}$  마우스로부터 얻은  $\text{CD4}^+$  및  $\text{CD8}^+$  T 세포의 반응은 재생되지 않았다. 반면, CD28 및 GITR간의 잠재적인 협력 관계 및 공유된 신호계통은 다음 설명에 의해 뒷받침된다: (1)  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^-$  및  $\text{CD8}^+$  T 세포는 CD28 가교의 부존재하에

GITR을 상향조절하지 못했고 (2) 항-CD80/CD86 항체는 GITR 발현의 상향조절 및 항-GITR 항체에 대한 반응성을 현저히 저해하였다. 따라서, 이 결과는 T 세포 활성화중에 CD28<sup>-</sup>CD80/CD86 신호 경로의 추가적인 중요 기능이 GITR의 발현 및 기능을 증가시킴으로서 CD25<sup>+</sup>-매개된 억제에 대한 T 세포 저항성을 허용하는 것임을 제시하고 있다.

간행된 다른 연구에 의해 제시된 결과(Shimizu et al., 2002; Tone et al., 2003)와 유사하게, 이러한 연구들은 조절 T 세포의 부재하에서 CD25<sup>-</sup> T 세포에 대한 GITR의 리케이션이 어느 정도 공자극을 제공하고 있다는 것을 나타냈다. 그러나, GITR<sup>-/-</sup> 마우스로부터 얻은 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> 및 CD8 T 세포가 야생형 T 세포에 대해 유사하게 반응하는 것처럼, CD25<sup>-</sup> T 세포를 공자극하는데 있어 CD28와 같은 방식으로 GITR 리케이션은 필요하지 않다. 우리는 면역 반응과정의 초기에 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> 및 CD8<sup>+</sup> 작동 T 세포상에서 GITRL에 의한 GITR의 채용이 일차적으로 작동 집단에게 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 억제 효과에 대해 저항성(예를 들어, 덜 민감하게)을 부여한다는 견해를 선호한다. 반응 과정 동안에, 염증 신호가 최종적으로 GITRL 발현의 하향조절을 야기하고, 이로 인해 CD25<sup>+</sup>-매개 억제에 대해 작동 세포의 민감성을 증가시킨다. 감염 제에 대한 면역반응의 CD25<sup>+</sup>-매개 억제가 생체내에서 언제 일어나는지에 관하여 단지 제한된 데이터만이 유용하지만, 일부 연구가 과다 염증에 대해 2차적인 조직 손상을 예방하기 위한 반응 국면인 초기가 아닌 수축기에 작용한다는 것을 제안하였다(Suvas et al., 2003).

IL-2 존재하에서 CD25<sup>+</sup> T 세포상의 GITR의 채용이 그들의 확장을 유도한다는 것은 분명히 강조되어야 한다(McHugh et al., 2002). CD25<sup>+</sup> T 세포상에서 휴지 APC상의 GITRL에 의한 GITR의 생체내 채용이 면역 반응과정의 초기에 작동 T 세포에 의해 분비된 IL-2의 존재하에 조절 T 세포의 비특이적 확장을 야기한다는 가능성은 여전히 남아있다. 이런 비특이적 확장은 반응의 말기에 작동 세포 활성 저해 기능을 하는 항원-특이적 억제자 세포 풀의 순차적 생성에 중요할 수 있다.

기준에 우리는 GITR/GITRL 상호작용의 조작이 생체내에서 조절 T 세포 기능을 조절하는데 유용한 방법일 것이라는 것을 제안하였다(McHugh and Shevach, 2002). 이런 개념이 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포가 항-GITR 항체의 표적이라는 제안에 기초하고 있지만, 이것은 여전히 GITR/GITRL 상호작용이 중요한 치료 표적을 나타내고 있는 상황이다. 따라서, 작용성 항-GITR 항체 또는 작용성 GITRL-Fc를 이용한 치료는 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 억제 효과에 대해 작동 세포에게 저항성(예를 들어, 덜 민감하게)을 부여하고, 암 및 전염병의 치료에, 암에 대한 면역 반응의 증가에(단독으로 사용되거나 종양 백신과 같은 다른 종양 치료 치료와 병용하여) 및 바이러스, 세균등을 포함하는 감염성 병원원에 대한 면역 반응의 증가에(단독으로 또는 감염원에 대해 약한 백신을 위한 백신 보강제와 같이 감염성 병원에 대한 다른 치료와 병용하여) 유용하다. 유사하게, GITR 작용제(예를 들어, 중화 항-GITRL 항체 또는 GITR-Fc를 이용하여)를 이용한 GITR/GITRL 상호작용의 저해가 억제에 대한 작동 T 세포의 역치를 낮추고, 자가면역 질병, 염증성 질병, 이식 (또는 그라프트) 거부, 및 이식-대-숙주 병의 예방 및/또는 치료에 유용하다.

#### (57) 청구의 범위

##### 청구항 1.

서열번호:1 또는 서열번호:3의 핵산서열을 포함하는 분리된 핵산분자.

##### 청구항 2.

제1항에 있어서, 적어도 하나의 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결된 분리된 핵산분자.

##### 청구항 3.

제2항의 핵산분자로 트랜스포메이션 또는 트랜스펙션된 숙주 세포.

**청구항 4.**

서열번호:1 또는 서열번호:3의 뉴클레오티드 서열, 또는 그의 상보적 서열과 고 긴장 상태에서 특이적으로 혼성화하는 분리된 핵산분자.

**청구항 5.**

서열번호:2의 아미노산 서열 또는 서열번호:2의 아미노산 서열의 활성 단편을 포함하는 단백질을 코딩하는 분리된 핵산분자.

**청구항 6.**

제5항에 있어서, 적어도 하나의 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결된 분리된 핵산분자.

**청구항 7.**

제6항의 분리된 핵산분자로 트랜스포메이션 또는 트랜스펙션된 숙주 세포.

**청구항 8.**

체세포 및 배아세포가 서열번호:1 또는 서열번호:3의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DNA를 함유하는 비인간 트랜스제닉 동물.

**청구항 9.**

제4항의 분리된 핵산에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 포함하는 분리된 단백질.

**청구항 10.**

서열번호:2의 아미노산 서열 또는 그의 활성 단편을 포함하는 분리된 단백질.

**청구항 11.**

서열번호:1 또는 서열번호:3의 뉴클레오티드 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 세포내 발현이 GITRL의 생산을 감소시키는 분리된 핵산분자.

**청구항 12.**

제11항에 있어서, 적어도 하나의 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결된 분리된 핵산분자.

**청구항 13.**

서열번호:1 또는 서열번호:3의 뉴클레오티드 서열, 또는 그의 단편을 포함하는 핵산분자에 대응하는 mRNA에 상보적이고, GITRL의 발현을 저해하는 안티센스 올리고뉴클레오티드.

#### 청구항 14.

서열번호:1 또는 서열번호:3의 뉴클레오티드, 또는 그의 단편을 포함하는 핵산분자에 대응하고, GITRL의 발현을 억제하는 siRNA 분자.

#### 청구항 15.

제10항의 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 분리된 항체.

#### 청구항 16.

제15항에 있어서, 항체가 GITRL 활성을 중화시키는 분리된 항체.

#### 청구항 17.

제16항에 있어서, 항체가 ATCC 번호 PTA-5336인 5F1 또는 ATCC 번호 PTA-5337인 10F12인 분리된 항체.

#### 청구항 18.

하기 단계를 포함하는, GITRL과 GITR의 상호작용을 저해할 수 있는 시험 화합물을 스크리닝하는 방법:

GITRL 및 GITR을 포함하는 샘플을 화합물과 접촉시키고; 및

샘플에서 GITRL과 GITR의 상호작용이 상기 화합물과 접촉시키지 않은 샘플내의 GITRL과 GITR의 상호작용에 대해 상대적으로 감소하였는지를 결정하며,

상기 화합물과 접촉한 샘플내의 GITRL과 GITR의 상호작용의 감소에 의해 상기 화합물이 GITRL과 GITR의 상호작용을 저해하는 물질임을 확인한다.

#### 청구항 19.

하기 단계를 포함하는, GITRL과 GITR의 상호작용을 모방하거나 증가시킬 수 있는 시험 화합물을 스크리닝하는 방법:

GITRL 및 GITR을 포함하는 샘플을 화합물과 접촉시키고; 및

샘플에서 GITRL과 GITR의 상호작용이 상기 화합물과 접촉시키지 않은 샘플내의 GITRL과 GITR의 상호작용에 대해 상대적으로 증가하였는지를 결정하며,

상기 화합물과 접촉한 샘플내의 GITRL과 GITR의 상호작용의 증가에 의해 상기 화합물이 GITRL과 GITR의 상호작용을 모방하거나 증가시키는 물질임을 확인한다.

## 청구항 20.

하기 단계를 포함하는, 개체(subject)에서 자가면역 질병, 염증성 질병 또는 이식거부를 진단하는 방법:

개체로부터 얻은 샘플내의 GITRL 유전자 산물의 시험량을 검출하고; 및

상기 시험량을 대조군 샘플내의 GITRL 유전자 산물의 양과 비교하며,

정상적인 양보다 상당히 높은 시험량은 자가면역 질병, 염증성 질병 또는 이식거부에 대한 진단에서 양성 지표를 나타낸다.

## 청구항 21.

하기 단계를 포함하는, 개체에서 암 또는 전염병을 진단하는 방법:

개체로부터 얻은 샘플내의 GITRL 유전자 산물의 시험량을 검출하고; 및

상기 시험량을 대조군 샘플내의 GITRL 유전자 산물의 양과 비교하며,

정상적인 양보다 상당히 낮은 시험량은 자가면역 암 또는 전염병에 대한 진단에서 양성 지표를 나타낸다.

## 청구항 22.

개체에 GITR 길항제를 투여하는 것을 포함하는, 자가면역 질병, 염증성 질병 또는 이식거부로 진단된 또는 위험이 있는 개체를 치료하는 방법.

## 청구항 23.

제22항에 있어서, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 조절 T 세포에 의한 억제에 대해 개체내 작동 T 세포의 감수성이 유지되도록 GITR 길항제를 투여하는 것을 포함하는 방법.

## 청구항 24.

제22항에 있어서, GITR 길항제가 중화 항-GITRL 항체, 중화 항-GITR 항체, GITR을 포함하는 융합 단백질, GITR의 활성 단편을 포함하는 융합 단백질, 길항성 저분자, 안티센스 GITRL 핵산분자 및 siRNA GITRL 핵산분자로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

## 청구항 25.

제22항에 있어서, 자가면역 질병 또는 염증성 질병은 류마티스 관절염, 뇌척수염, 골관절염, 다발 경화증, 자가면역 위염, 전신홍반 루프스, 건선과 다른 염증성 피부병, 타입 I 당뇨병, 천식, 알레르기, 및 크론병과 케양 대장염을 포함하는 염증성 대장 질병으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

## 청구항 26.

제22항에 있어서, 자가면역 질병은 다발 경화증인 방법.

### 청구항 27.

개체에 GITR 작용제를 투여하는 것을 포함하는, 암 또는 전염병으로 진단된 또는 위험이 있는 개체를 치료하는 방법.

### 청구항 28.

제27항에 있어서, GITR 작용제가 개체내 작용 T 세포에 대해 공자극(costimulatory) 신호를 제공하고, 개체내에서 작용 T 세포가 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 조절 T 세포에 의한 억제에 덜 민감하도록 GITR 작용제를 투여하는 것을 포함하는 방법.

### 청구항 29.

제27항에 있어서, GITR 작용제가 GITRL, GITRL의 활성 단편, GITRL을 포함하는 융합 단백질, GITRL의 활성 단편을 포함하는 융합 단백질 및 작용성 GITR 항체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

### 청구항 30.

GITR 작용제를 세포 집단(population)에 투여하는 것을 포함하는 작용 T 세포를 함유하는 세포 집단의 증식을 유도하는 방법.

### 청구항 31.

제30항에 있어서, GITR 작용제가 GITRL, GITRL의 활성 단편, GITRL을 포함하는 융합 단백질, GITRL의 활성 단편을 포함하는 융합 단백질 및 작용성 GITR 항체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

### 청구항 32.

제30항에 있어서, 작용 T 세포가 CD4<sup>+</sup> T 세포 또는 CD8<sup>+</sup> T 세포인 방법.

### 청구항 33.

GITR 길항제를 세포 집단(population)에 투여하는 것을 포함하는, 작용 T 세포를 함유하는 세포 집단의 증식을 저해하는 방법.

### 청구항 34.

제33항에 있어서, GITR 길항제는 중화 항-GITRL 항체, 중화 항-GITR 항체, GITR을 포함하는 융합 단백질, GITR의 활성 단편을 포함하는 융합 단백질, 길항성 저분자, 안티센스 GITRL 핵산분자 및 siRNA GITRL 핵산분자로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

### 청구항 35.

제33항에 있어서, 작용 T 세포가 CD4<sup>+</sup> T 세포 또는 CD8<sup>+</sup> T 세포인 방법.

### 청구항 36.

GITR 작용체를 세포 집단에 투여하는 것을 포함하는, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 조절 T 세포의 존재하에 작용 T 세포를 포함하는 세포 집단의 억제를 차단하는 방법.

### 청구항 37.

제36항에 있어서, GITR 작용체가 공자극 신호를 작용 T 세포에 제공하고, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 조절 T 세포에 의한 억제에 덜 민감하도록 GITR 작용체를 투여하는 것을 포함하는 방법.

### 청구항 38.

제36항에 있어서, GITR 작용체가 GITRL, GITRL의 활성 단편, GITRL을 포함하는 융합 단백질, GITRL의 활성 단편을 포함하는 융합 단백질 및 작용성 GITR 항체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

### 청구항 39.

제36항에 있어서, 작용 T 세포가 CD4<sup>+</sup> T 세포 또는 CD8<sup>+</sup> T 세포인 방법.

### 청구항 40.

GITR 길항체를 세포 집단에 투여하는 것을 포함하는, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 조절 T 세포의 존재하에 작용 T 세포를 포함하는 세포 집단을 억제하는 방법.

### 청구항 41.

제40항에 있어서, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 조절 T 세포에 의한 억제에 대해 개체내 작동 T 세포의 감수성이 유지되도록 GITR 길항체를 투여하는 것을 포함하는 방법.

### 청구항 42.

제40항에 있어서, GITR 길항체는 중화 항-GITRL 항체, 중화 항-GITR 항체, GITR을 포함하는 융합 단백질, GITR의 활성 단편을 포함하는 융합 단백질, 길항성 저분자, 안티센스 GITRL 핵산분자 및 siRNA GITRL 핵산분자로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

### 청구항 43.

제40항에 있어서, 작용 T 세포가 CD4<sup>+</sup> T 세포 또는 CD8<sup>+</sup> T 세포인 방법.

#### 청구항 44.

작용 T 세포의 집단을 얻는 단계, 상기 집단을 GITR 작용제로 치료하는 단계, 및 치료된 집단을 암 또는 전염병으로 고통 받는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 개체로부터 암 또는 전염병을 치료하는 방법.

#### 청구항 45.

제44항에 있어서, GITR 작용제가 GITRL, GITRL의 활성 단편, GITRL을 포함하는 융합 단백질, GITRL의 활성 단편을 포함하는 융합 단백질, 작용성 저분자 및 작용성 항-GITR 항체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

#### 청구항 46.

제44항에 있어서, 개체가 암으로 고통받고, 치료된 집단은 종양 백신으로 사용되는 방법.

#### 청구항 47.

GITR 작용제 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

#### 청구항 48.

제47항에 있어서, GITR 작용제가 GITRL, GITRL의 활성 단편, GITRL을 포함하는 융합 단백질, GITRL의 활성 단편을 포함하는 융합 단백질, 작용성 저분자 및 작용성 항-GITR 항체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 조성물.

#### 청구항 49.

GITR 길항제 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

#### 청구항 50.

제49항에 있어서, GITR 길항제가 중화 항-GITRL 항체, 중화 항-GITR 항체, GITR을 포함하는 융합 단백질, GITR의 활성 단편을 포함하는 융합 단백질, 길항성 저분자, 안티센스 GITRL 핵산분자 및 siRNA GITRL 핵산분자로 구성된 그룹으로부터 선택되는 약제학적 조성물.

#### 청구항 51.

GITR 작용제 및 바이러스 항원, 세균 항원, 진균 항원, 기생충 항원, 암 항원, 종양-연관 항원 및 그들의 단편으로 구성된 그룹으로부터 선택된 항원을 포함하는 백신 보강제(adjuvant).

#### 청구항 52.

제51항에 있어서, GITR 작용제가 GITRL, GITRL의 활성 단편, GITRL을 포함하는 융합 단백질, GITRL의 활성 단편을 포함하는 융합 단백질, 작용성 저분자 및 작용성 항-GITR 항체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 백신 보강제.

청구항 53.

GITR 길항제, 및 자가항원, 아밀로이드 웨타이드 단백질, 동종항원, 이식 항원, 알레르기 항원 및 그들의 단편으로 구성된 그룹으로부터 선택된 항원을 포함하는 백신 보강제.

청구항 54.

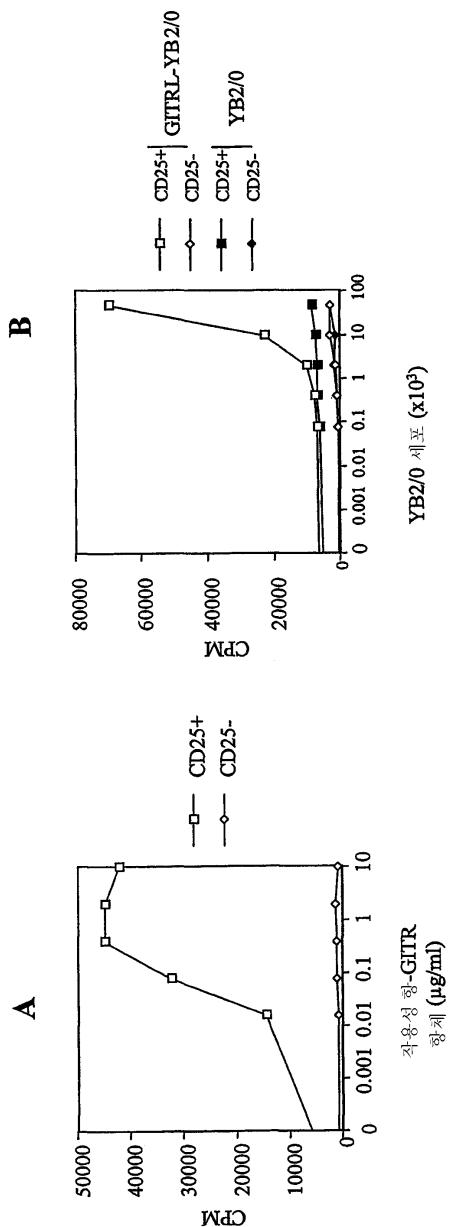
제53항에 있어서, GITR 길항체가 중화 항-GITRL 항체, 중화 항-GITR 항체, GITR을 포함하는 융합 단백질, GITR의 활성 단편을 포함하는 융합 단백질, 길항성 저분자, 안티센스 GITRL 핵산분자 및 siRNA GITRL 핵산분자로 구성된 그룹으로부터 선택되는 백신 보강제.

도면

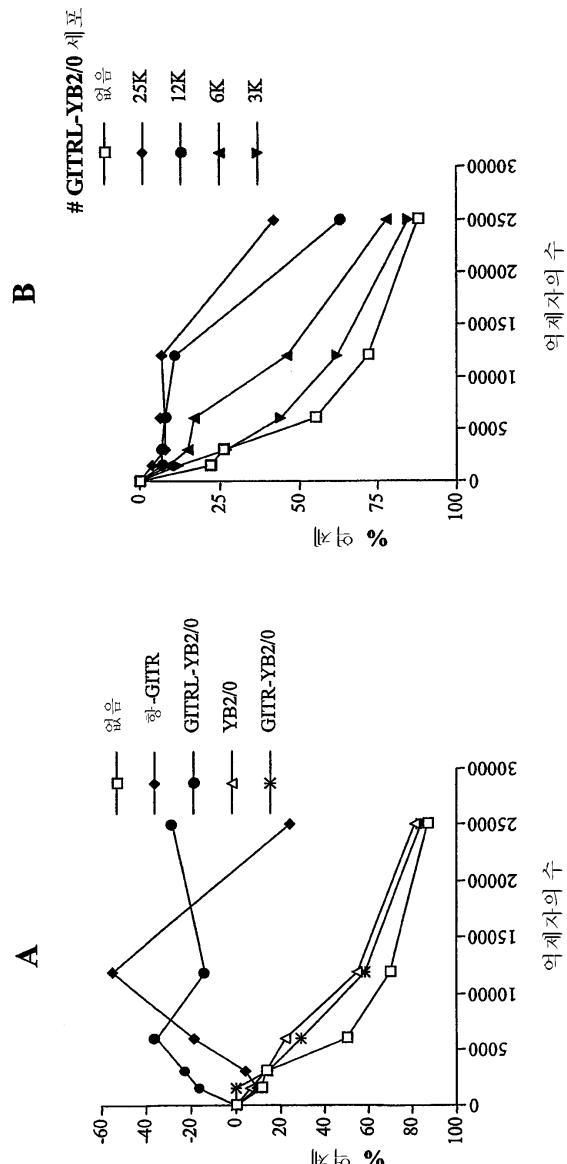
## 도면1

m	1 . . . . .MBEMPLRESSPORERCK.KSWLICVAILMLLCLSLGTTIYTS'L 44
h	1 MCLSHLEMPLSHSRTOGZQRSSWKLWLFCSIVMLL.FLCFSWMLIFIFL 49
m	45 K.PTAIESCMVKFELSSSSKWHMTSPKPCHCVNTTSDGGKLKILQSGCTYLIG 93
h	50 QLETAKEPGMAKEGPLPSKQMASSEPPCVCNKVSDWKLEILQNGLYLIYG 99
m	94 QVIPVDDKKYKDNPAPVVQVKKNDVLQTLMNDFQJLPIPGGVYELHAGDN 14.
h	100 QVAP.NDVAPEFVRLYKKNDMIIQLTNKSQVNQVGTYEHLHVGD'T 14
m	144 IYLFNSKDHIQKNNTYWGJILMPDLPFIS 173
h	148 TDVLTENSTEGOVT.KNNNTYGTILLJANPOETS 177

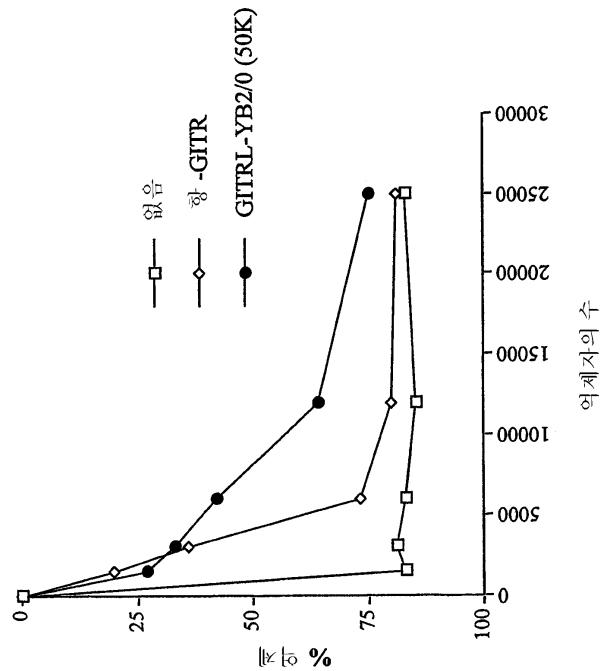
## 도면2



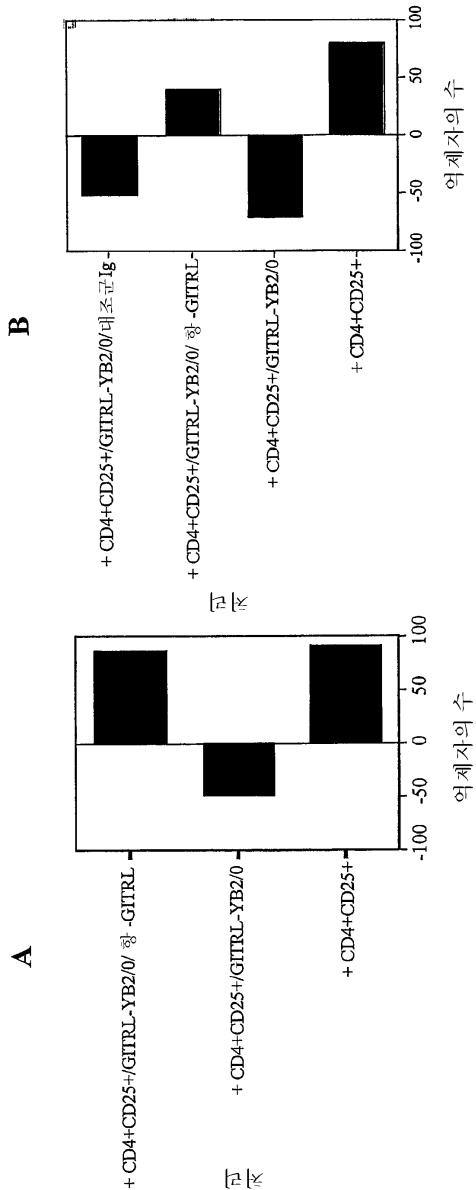
도면3



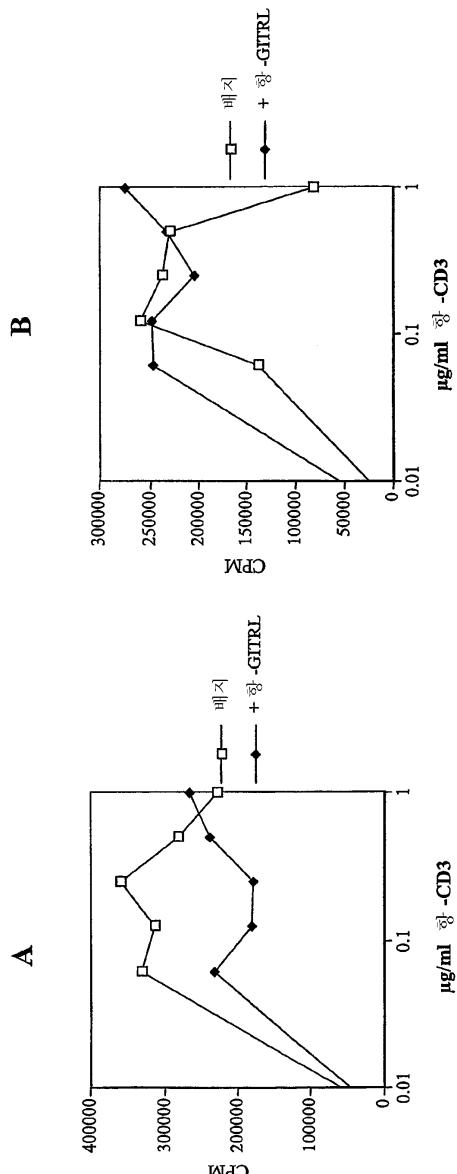
도면4



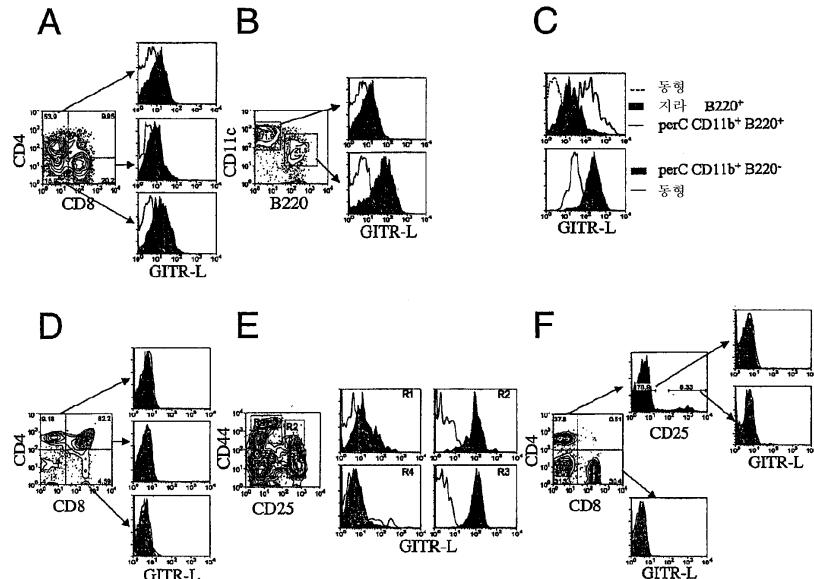
## 도면5



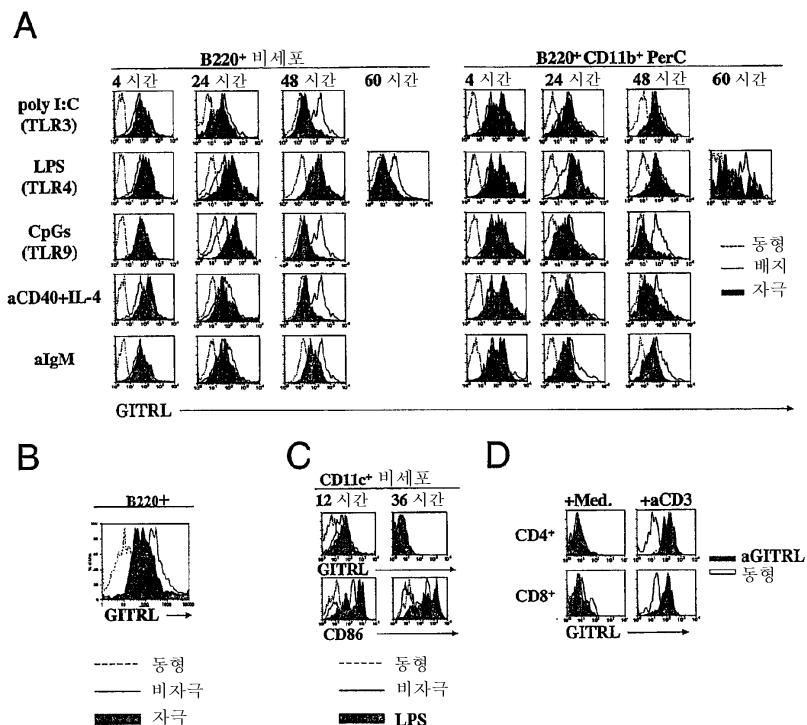
## 도면6



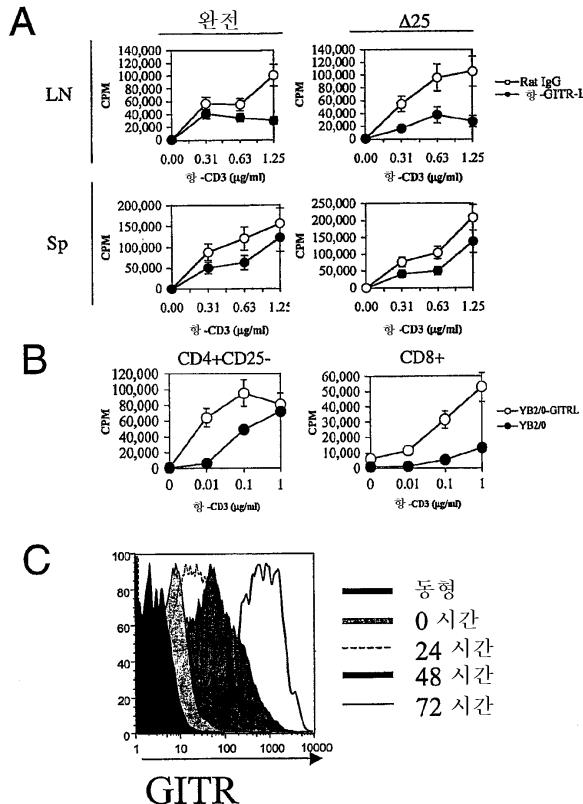
## 도면7



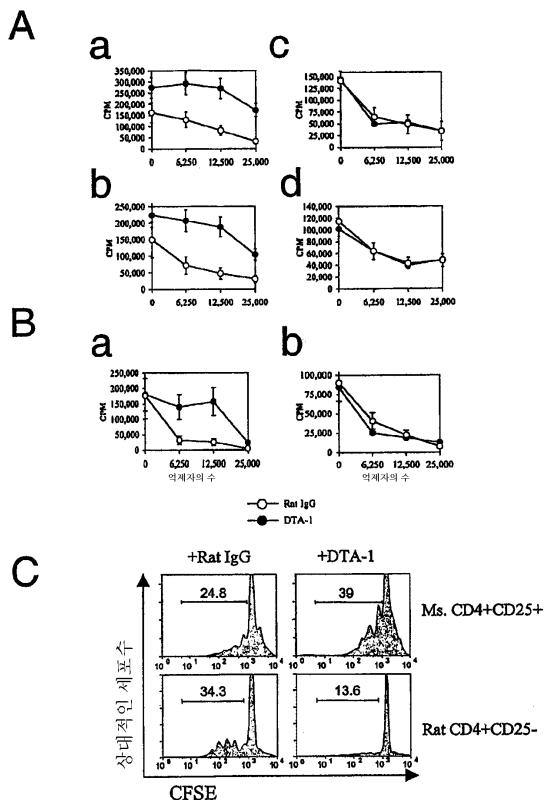
## 도면8



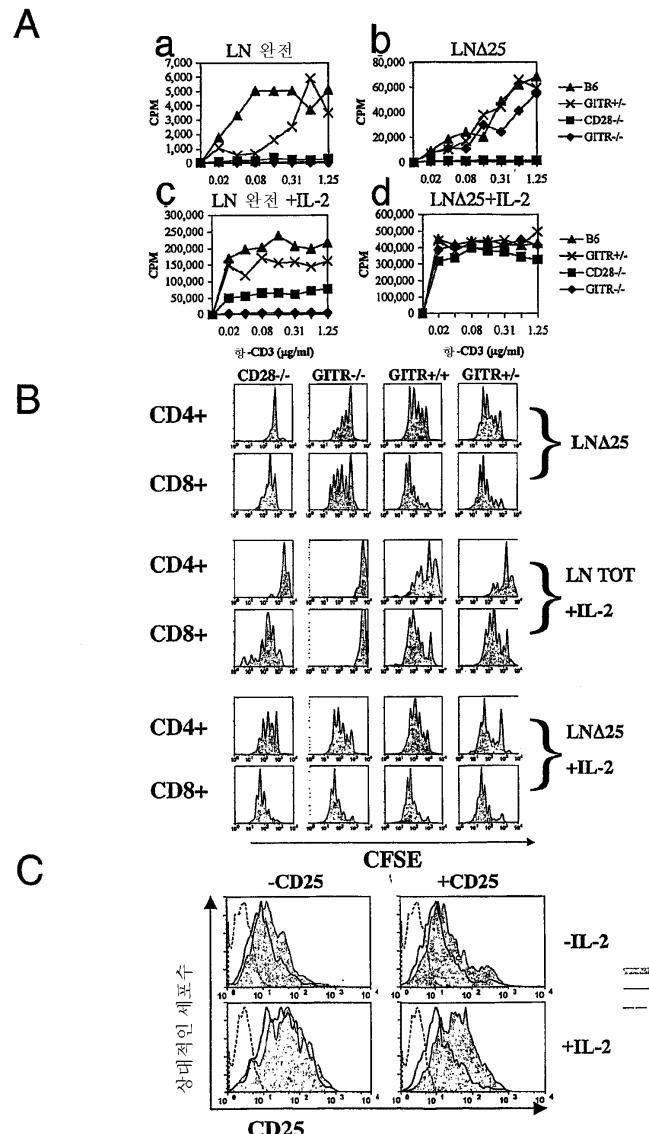
## 도면9



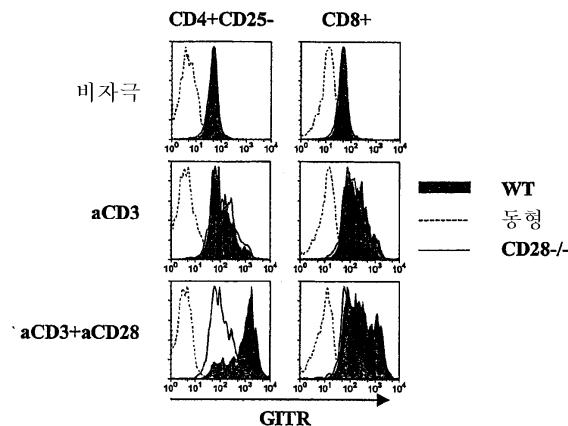
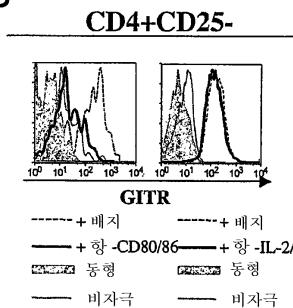
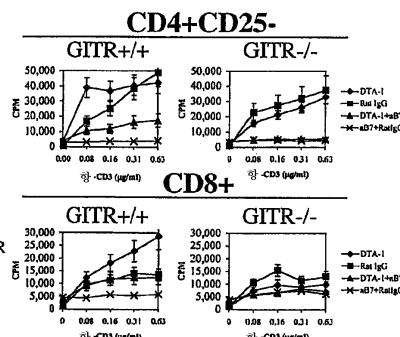
## 도면10



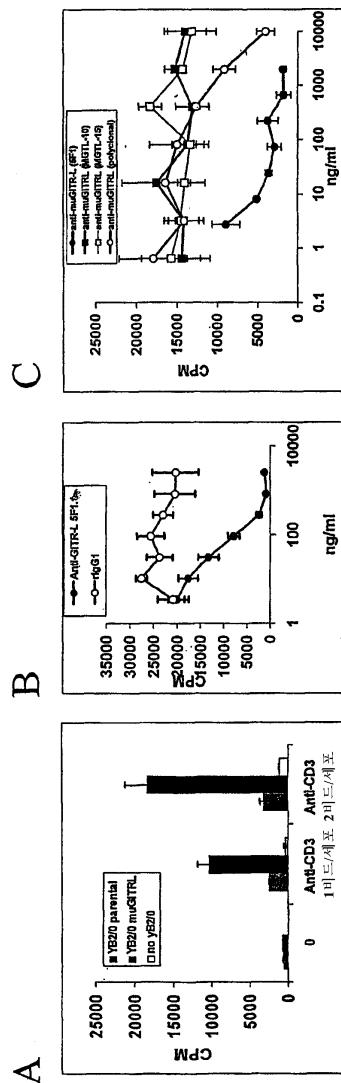
## 도면11



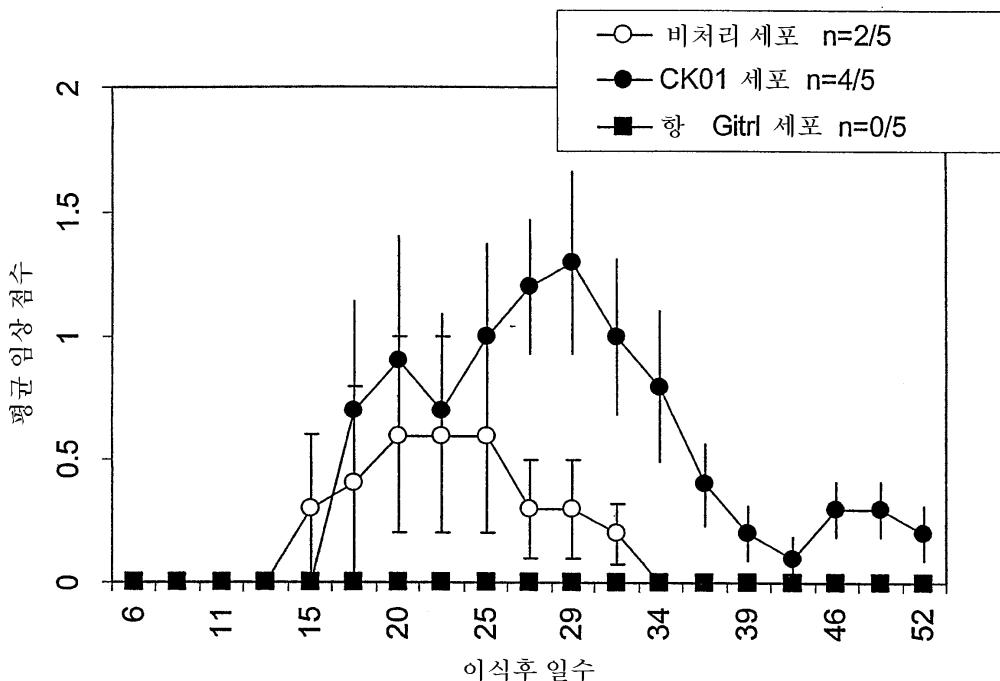
## 도면12

**A****B****C**

도면 13



## 도면14



## 서열목록

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Wyeth

The Government of the United States of America as  
represented by the Secretary of the Department of Health and Human  
Services

Collins, Mary

Shevach, Ethan M.

McHugh, Rebecca S.

Whitters, Matthew J.

Young, Deborah A.

Byrne, Michael C.

Reddy, Padmalatha F.

Stephens, Geoffrey L

Carreno, Beatriz M.

<120> GITR LIGAND AND GITR LIGAND-RELATED MOLECULES AND ANTIBODIES AND  
USES THEREOF

&lt;130&gt; 01997.028500

&lt;150&gt; US 60/472,844

&lt;151&gt; 2003-05-23

&lt;150&gt; US 60/547,975

&lt;151&gt; 2004-02-26

&lt;160&gt; 12

&lt;170&gt; PatentIn version 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 522

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(522)

&lt;400&gt; 1

atg gag gaa atg cct ttg aga gag tca agt cct caa agg gca gag agg	48
Met Glu Glu Met Pro Leu Arg Glu Ser Ser Pro Gln Arg Ala Glu Arg	
1                       5                       10                       15	

tgc aag aag tca tgg ctc ttg tgc ata gtg gct ctg tta ctg atg ctg	96
Cys Lys Lys Ser Trp Leu Leu Cys Ile Val Ala Leu Leu Leu Met Leu	
20                       25                       30	

ctc tgt tct ttg ggt aca ctg atc tat act tca ctc aag cca act gcc	144
Leu Cys Ser Leu Gly Thr Leu Ile Tyr Thr Ser Leu Lys Pro Thr Ala	
35                       40                       45	

atc gag tcc tgc atg gtt aag ttt gaa cta tca tcc tca aaa tgg cac	192
Ile Glu Ser Cys Met Val Lys Phe Glu Leu Ser Ser Lys Trp His	
50                       55                       60	

atg aca tct ccc aaa cct cac tgt gtg aat acg aca tct gat ggg aag	240
Met Thr Ser Pro Lys Pro His Cys Val Asn Thr Thr Ser Asp Gly Lys	
65                       70                       75                       80	

ctg aag ata ctg cag agt ggc aca tat tta atc tac ggc caa gtg att	288
Leu Lys Ile Leu Gln Ser Gly Thr Tyr Leu Ile Tyr Gly Gln Val Ile	
85                       90                       95	

cct gtg gat aag aaa tac ata aaa gac aat gcc ccc ttc gta gta cag	336
Pro Val Asp Lys Lys Tyr Ile Lys Asp Asn Ala Pro Phe Val Val Gln	
100                      105                       110	

ata tat aaa aag aat gat gtc cta caa act cta atg aat gat ttt caa	384
Ile Tyr Lys Lys Asn Asp Val Leu Gln Thr Leu Met Asn Asp Phe Gln	
115                      120                       125	

atc ttg cct ata gga ggg gtt tat gaa ctg cat gct gga gat aac ata	432
Ile Leu Pro Ile Gly Gly Val Tyr Glu Leu His Ala Gly Asp Asn Ile	
130                      135                       140	

tat ctg aag ttc aac tct aaa gac cat att cag aaa aat aac aca tac	480
Tyr Leu Lys Phe Asn Ser Lys Asp His Ile Gln Lys Asn Asn Thr Tyr	
145                      150                       155                       160	

tgg ggg atc atc tta atg cct gat cta cca ttc atc tct taa 522  
Trp Gly Ile Ile Leu Met Pro Asp Leu Pro Phe Ile Ser  
165 170

<210> 2  
<211> 173  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 2

Met Glu Glu Met Pro Leu Arg Glu Ser Ser Pro Gln Arg Ala Glu Arg  
1 5 10 15

Cys Lys Lys Ser Trp Leu Leu Cys Ile Val Ala Leu Leu Leu Met Leu  
20 25 30

Leu Cys Ser Leu Gly Thr Leu Ile Tyr Thr Ser Leu Lys Pro Thr Ala  
35 40 45

Ile Glu Ser Cys Met Val Lys Phe Glu Leu Ser Ser Ser Lys Trp His  
50 55 60

Met Thr Ser Pro Lys Pro His Cys Val Asn Thr Thr Ser Asp Gly Lys  
65 70 75 80

Leu Lys Ile Leu Gln Ser Gly Thr Tyr Leu Ile Tyr Gly Gln Val Ile  
85 90 95

Pro Val Asp Lys Lys Tyr Ile Lys Asp Asn Ala Pro Phe Val Val Gln  
100 105 110

Ile Tyr Lys Lys Asn Asp Val Leu Gln Thr Leu Met Asn Asp Phe Gln  
115 120 125

Ile Leu Pro Ile Gly Gly Val Tyr Glu Leu His Ala Gly Asp Asn Ile  
130 135 140

Tyr Leu Lys Phe Asn Ser Lys Asp His Ile Gln Lys Asn Asn Thr Tyr  
145 150 155 160

Trp Gly Ile Ile Leu Met Pro Asp Leu Pro Phe Ile Ser  
165 170

```
<210> 3
<211> 10289
<212> DNA
<213> Mus musculus
```

gaagtgttct ctcatacaga acagccaggg ctgcagagag agagagagag aaaaaaaaaac	1320
agcaaaaacc aaaccaaaac aaacagacaa aaaaaaaaaa aaacaacaaa acaaaacaaa	1380
acaaaaaaaaaa ccaaaaaaag cattgaccag aaaagccaga aaggaatcaa atattaata	1440
agacattata taattcaagg gttggcctat ttatattaaa atatactaaa tcttggcag	1500
aattaaatga cgcatagctg tgtaagaaag ggttgtatg tgagcccagg aacattttc	1560
taaagagacc aaccagagat ggtcttaaag gtatggttct atattggcaa gatattgaga	1620
aaagatgcag gaggaagtaa tgcactgtt attcgaggtt acttagtatg gtactggcta	1680
aagacttaca taggagccc ttaatctgta gtctgtaact gtacaaatgg atcaaaggca	1740
gagggagttc taaccccagc cccacccttc caaagaatga accaagacac gaactttctg	1800
aagcaatgag tggagagg actctcagca ttctcaaggg tttaaaggag gaaggctgag	1860
gatgcattaa gttcacactg aaaggccttt ttcctcaggc aaacttcctc aagtcttatt	1920
aatcaggtgg ctctgagcat cagttagtct aggtgccgct gactcctgct ggtgaggagt	1980
ggccgaggga aatgccttgc cgagtgacat ctctcccac aatcaaacct tggtaattca	2040
tgattgctga aacttgatt ccaggttggc ctctcaaaag aacacatccc tttcaatgaa	2100
gggttcctct tctaaacgta aaagttatcc caaatttaag gaagtaaaaa gttttggagt	2160
ctctttcct gtcaggatgc ttggcagcgt agttactatg gaaacgacac tggcttcag	2220
ggtagcttc agtattacac ttcccttatt ggctacaaat aaatgtctg agcagagaga	2280
tctgagtggc tggcaggtgc ttagttattg tgaggtggtt gcttccacct tttcatactt	2340
aagaacttag aagtttttt tttctttctt ttttgatgca aatctccatt tttaaaagtc	2400
tcttctaaaa aaagaagact tcccttttt ttttttttt ttttataaat aaccctctt	2460
tgtttaaaag taagatatga agcttggtt ct当地catt tttttttctc tctatctcct	2520
aggagacatc tagttaagag actagactgg agctcaaggc ggttggccaa ctcctccatg	2580
aaagcagctc acaaaaagttg tctctgaagc atccaaatag tcagggaaatg cccttcttc	2640
agtgaggaag ggtgaaattc cagaaggaa aatggaattt gtacaattgt acttgcaaac	2700
agacggagta gatttcttt ccaaacatat gaggttagga ttagcctgga gtctgccttg	2760
gtcattctga gacaaaacaa gtcaatctgg tcttcaacca aagtgagggtt agaagaccaa	2820

ctgatccttc taaataaaaag caaaaactaga gtaaactgaa agctttgtat gtagctttc	2880
gtaacatcaa ttgaattata aatagaaaact gccccagtga gtcgtagggg tgagagagag	2940
agagagagag agagagttt gaataagagt ctgggtgagg atgccagcct ttcttatcat	3000
ccatatgacc ttgggcttat tacttcatca ccgtgctctc atttcctcat ctgcagaagg	3060
aacgtggtaa ttcttacaga gttgccttaa ggaataagga ggcagtaatg tgccgtaccc	3120
tcctgactca tgctaggctc tagatggctg tgattaatat ttatgccacg gttacttata	3180
aggtttacaa tgaatacacaa caacaaggc atttaaaata tacatggctt gtctgaccc	3240
ctttcctcag taaaagacct cttctctcaa ccaaaatgtat aattttccaa ttatatttta	3300
acttatggca atagttatgg atgaactcag tggcatttc taactctaaa tagatattaa	3360
agccactcga aataggctt ctggatgctt ttctctgtca gttcatttgt ctattgattt	3420
agattttctg tgtacttctt acacatggtg atagctggaa caaaatccaa gacatttcta	3480
tttgctggc tacttaattt cttcctatgt atgatcatgt cagtctagct agattacaaa	3540
cttcctgaga gataacaatt gtacattaaa tgtgtcttc ttgcttagaa tgctagtata	3600
atgttgggac tataggtaat taagttgttt atttaacttg ttttataat cagcatcatt	3660
atcaaaatag ctgatattta ctgagaagct tcaggttagcc tgtctggaga aaccctctcc	3720
aagaatcaga gtggtaagt aagaacaaac ggtttagtga ttccccgctc ttactccctg	3780
cttaatagat aagggaaattt gaattctgga agccctgtc ataaccttgt cagttttgt	3840
gctgaactga ctttggacat ctcttttaag aaaacccaaa atgtggatga aataattgca	3900
agagtagagt gggtttcagg aaatccagtg tcttttagtt ttttagagtca tggctctcc	3960
ccttttttat tgcaccgcct tattggataa aaatgctctt attataactt ctaacatatg	4020
tataactagat agtatctcac gtctgagttt aaaaccatgt acacaaaaga tgtgtacaca	4080
cacaagatgg aaagtctaaa agttaataac agatttccc gtctaagtct attttgcttt	4140
agttaagttt ttaagttgtc tataatataat taacattgtat gcaaacataa tacagtaatt	4200
gaaatattgt ttctttgggt ctgatctctt agtcacattc agagccctag tgatttgata	4260
ttatgggtt tatttcctta attttagctt aacattttat aatacagtaa cttgagattt	4320
atattctaat ttatcttgat ttatgatttt gactgtacca attgaaaatt accttcttgg	4380

acttgatgtt cacatataat ttcatgtcta aaagcaatga atcttggcat catatatcta	4440
actacctact tgatatctaa taagcaacac aaacccacac cttcaaaaagt tgtcatggtt	4500
ccccctttac tttctttcta ttagtcttgc gaatttgggt aattaactta attttttca	4560
atgactgcag tcccaaattct tggagttatc tttctttat tgcattgcct catgctagta	4620
ttcatgtcag gaactccagt tacttcttgc ttccttctcc atatagccta gcttgatctg	4680
aaagtcacag ttctccgtct tcaacctaag tgctattaag acaggcgtgc atctctgt	4740
tggaccctct gccagcacct tggtcagagc catgtgcttt ccagttata gactccatcc	4800
agtccatgcc taactgactt cattgctttt accttctgtt ctctttgtt tttttttt	4860
cctagcataa tagctggaaa aatcctttaa aaggatcata gatcagtctc catgcttaaa	4920
aaaagtcttt tgagcacttt gctcccagga aaccaatgca ttctcagtagc ccaaaacttt	4980
aatgtttggg ccttattttt aaccctgaag catttaacag catttaagtg attgtatttg	5040
taaattagcc ataattaatg ttaccttca gcatgtcgca gacatttga aacacttgtt	5100
tctgattctg aaggcattcc atttattata catggcctgt gatttttcta tacattaaat	5160
atttctggag ctaatgctgt tgtttaagt aaagggaaaa caaagataag cagaggtccc	5220
attatttttc ccacatgcaa cagatcatct tggaaatga ttgatggga tatggagact	5280
gctgtttgta gtgaactaga gaggaagaac ccagcttcat cacttgccctt gtgtgtcaaa	5340
ggaaaacgaa caggatgaga caccaaagtc ttggataaaa gacaccctcc aaaaagatct	5400
gctaccttcc ttctcatgat taaatctatc attccatgac accattttaa aaattaaaac	5460
aatgctgctc accaccctta ttcatgcttt ctcccttt ttaagattta tttattat	5520
gtatgtacac tgttagcaatc ttcagacgct ccagaagaag gcgtcagagc tcgttataga	5580
tggttgtgag ccaccaggta gttgctggga tttgaactca ggaccttgg aagagcattc	5640
agtgctctta actgctgaac catcttgc gcccctctt catgctttct tttgtctctg	5700
tatacagcta aattcgtgtg tctaatac ctctgcccac acatccttat tcacttgctt	5760
cctcatgtct tcctaaaact ctcatgtaag tcaaatgtaa aggacagaac cagtcatctg	5820
tagagggaaa tgaagaagta tgtcaggtgt acaggtgtct gtgtttgtgt gttgggagga	5880
ggggcatatt ttggggaggg gtttgggggt tggaaaatag tttgcttcag aaactttaaa	5940

ctctaagtaa ttagtcaagc atgttagcagt ggtgccatca ttctgaccag ttcttctttt	6000
ccttcaacag ccaactgcc a tcgagtcctg catggtaag tttggtgagt aaccatctc	6060
ccatggtttc ct当地t ccttagattc tgaggcaaga aggccagtgc cagtgccctc	6120
ggaaagcccc tgcatccctt agttcacttt cagtgattgt ttattacaat tactcacc	6180
atacttgctg tctgcccagt gagaactgag gctccaggc tgagcccgat tgacaagccc	6240
acaccaggtg acactcttgg caggcataga catcccacta acaagagcct tgtggatctg	6300
catacagcaa tcagcttta gtttggtagt ttattaagga tatttttcag attcctacaa	6360
cctttgtca gagcatttct tatattcat acatgtctag tgtcttagtag agcatatggg	6420
aaccattact gctgttagta agtgcagaga agagaaggaa gaagcgcttc ctcttgctt	6480
ctgagtcact tttcgta gtcacactgat attcgctcg aaaacatgga aaacagtgt	6540
gctgagtgtt ttagttcat ttctgttgct tttataagat accctgtcaa aaaacaactt	6600
ttggagaaaa aggatttgtt ttattcacaa gtgcaaatta tagtccctca accgtggaga	6660
aatcatggcc acaggagttt gaagcatcta gtcacattca gtcaagagca gaggaaaacg	6720
aagtgcactt gcttattgct tgctttttt taattggata ttttatttat ttacattca	6780
aatgttattc ctttcccga ttgccccaca gaacccccc tttccatctc tctccccctg	6840
cttctatgag ggtgtcccc cacccaccca catactcctg cctccctgac ctcacactct	6900
cctacactga ggcatacggc cttcaactgga ccaagggcct cttctccat tgatgcccga	6960
caaggccatc ctctgctaca tatgttagttg gagccatggg tccctccatg tgtactcctt	7020
ggttagtgtt ttagaccctg ggagctctgg ttggttcata ctgttgtct tgctatgggg	7080
ttgcaaatcc cttcagctct ctcattactt tctctaactc ctccattggg gacttcatga	7140
tcaagtcaat ggtggcttc gagcatctgt atttgtgtat gtcaggctct ggcagagcct	7200
ctcaggaggc agttatgtca ggctcctgtt agctcagttc ctttctcta cttcttaca	7260
gttcaggaca tcttgcttag ggaatggcac caaccatagt gggctggatt ttcccatatc	7320
taataactta attaaaatac tctataagac caacttgata tagacaattc tttttgggt	7380
cctcttctct ggtgactata gattgtgtca atttgacaag gaaagctaac taccataccg	7440
agtctcagaa tatttcttag agcacatgaa aaatatcaag tgtatacatt tgtgattgct	7500

tgtaccacat	tttcatttga	cactagacaa	tttcttagt	tcagtttc	acttcctat	7560
cttttgctcc	agttttaaa	aatacttgg	tccccagagg	ttaggacagt	tttgaatgt	7620
gtcccactct	gattttgtgt	tttgcgtttt	cagtaaaaac	aagagagtat	ataatgtgtt	7680
caaatttctc	cttaatgtga	taaaaatcaa	gtgtttta	aaattccata	actggattaa	7740
ataggaaaaa	atagacttcc	ccatggtg	ccaccaagaa	aaaaatgcag	agttcactgg	7800
agatgcagcg	agttttgtt	ttgcttataa	cactccattc	ctctgctca	ttcctctatt	7860
ctcttccagc	atctaccc	aagtcttatac	ctagttattt	tatgtgtgaa	tgagaatcta	7920
agtca	gtt	accc	tttta	ggctatgcc	tctataacta	7980
aacattcaga	taacttgaa	tcaataaaaa	cacctgtgg	gggccttgaa	gttacatagc	8040
tgtacaaaac	cactaacatt	agggaaatat	ttcaatgtaa	tacacaggaa	aagaaatgac	8100
taaatttgt	ta	catatccc	acttccatg	tggcaatatt	agacttagga	8160
taaatacata	tatattaatt	aaattaattt	atagcagtaa	ataattggaa	ataagctaga	8220
taatgttatg	ttaagttgaa	agtgacacag	agaatcatat	tttagataca	aagcatcaaa	8280
atcagaaata	cagacctgtc	aatcaattta	gagctaatta	ctgatactga	gctggaaaga	8340
ttat	ttgaac	tcagcaattt	gagcccagac	agcaatacag	caagactccc	8400
aaaagaaaaa	ag	tttgtgagc	acacacaatt	ctgctagctt	attttaggtga	8460
gcaattggaa	aaaatggaga	atacttatta	tcaaagacac	cacactcaag	tagatgtgag	8520
acactagaaa	aatggccaaa	ttaattgata	acatacttct	tgctaacc	ttacatgaag	8580
aaaattacag	caatgcagag	cacggtagtc	agaggagaac	aatgctgagt	gttattgtc	8640
tatgtatgt	gttattggca	aagcaccata	gagtaaacag	tatttgaata	agaaagatata	8700
ggggacgcct	agattataag	cggttttat	tctagtcttg	tgtgattgt	ctctccattc	8760
cactcccttc	ctcattcata	ttacctgaga	tgagatacag	agttattaag	atctgaagcc	8820
tctcaaaaac	agagagatag	tttattctct	caatagattc	gaaatatgg	ctggaaaaag	8880
tagtatata	agtccaggta	aagaagccac	ctgaaggcag	taaaacatata	agaggatgga	8940
atagtcatgg	aaacatgatc	tttttcttcc	tcttttcaa	tttcttata	aactatcatc	9000
ctcaaaaatgg	cacatgacat	ctccaaacc	tcactgtgtg	aatacgacat	ctgatggaa	9060

gctgaagata ctgcagagtgcacatattt aatctacggcaagtgattc ctgtggataa	9120
gaaatacata aaagacaatg cccccttcgt agtacagata tataaaaaga atgatgtcct	9180
acaaactcta atgaatgatt ttcaaatttt gcctatagga ggggtttatg aactgcattgc	9240
tggagataac atatatctga agttcaactc taaagaccat attcagaaaa ctaacacata	9300
ctgggggatc atcttaatgc ctgatctacc attcatctct tagagatgg gtttggtctc	9360
ctcatcttct tctttgtatcccgagatgct ggtgggtggg ttggaggggg atgattgatg	9420
gcaatgcaca cagtttgtga gggcttacaa attgacacaa tcagagcctc ttggcatata	9480
aaatttttagc cctcatatct gtctgaagag gactcagcaa atgggcaat ccctaattgtt	9540
gggtctgcaa atggacttgt acaatccatg ataaaaagga gtatggcca cagaagacag	9600
aaactcttcc aaagaatgtc tttctaacct tgatccctgg gttagaatgag atcctgtttc	9660
catggggagtc ttacttggct tgcaaaaaag ggtgttagggc agtagctgg cctttttcc	9720
atcataattt ctttgagctg ttttaccta atccctccaa actctcacct tctgagagcc	9780
tcctaattgaa acattgttag actgggtggg tggccaagac atgccaacaa cacccttctt	9840
tagaggtggt gtttttagag gacagagaac attatgaagc ctagagcagc agaggtcaag	9900
atgccacgaa atggaattga tctggaaatt ttttttttt ttcattctca ggatgcaggt	9960
tcattctgaa ctttcccta ggccttcatt gctttgtgt gtatgtgtgc ataaattctg	10020
caaataaaaaaa aatgagagtt tgcaccagta ctcactagat ttaacaccag aaagtggtag	10080
ttttctggct gtattatgcc atgatagcac attttctgtt ggtgtccct aactgacaag	10140
tataacagtt ttccctaaacc acacaacaat gctatgtatgt taatgggta gatatttttg	10200
aaaaaaaaattt gcacagttag aacatgggta gatgaaccct aagactctta cctcaattca	10260
gaactcgcaa ggagttaagt gagtgggg	10289

<210> 4  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Mus musculus GITRL forward PCR primer

<400> 4  
atggaggaaa tgcctttgag ag

22

<210> 5  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Mus musculus GITRL reverse PCR primer

<400> 5  
gaatggtaga tcaggcatta agatg 25

<210> 6  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Mus musculus GITRL forward PCR primer containing SalI site

<400> 6  
tttaaagtgc acccaccatg gaggaaatgc ctttgagag 39

<210> 7  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Mus musculus GITRL reverse PCR primer containing EcoRI site

<400> 7  
tttaaagaat tctcatthaag agatgaatgg tagatcaggc at 42

<210> 8  
<211> 534  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(534)

<400> 8  
atg tgt ttg agc cac ttg gaa aat atg cct tta agc cat tca aga act 48  
Met Cys Leu Ser His Leu Glu Asn Met Pro Leu Ser His Ser Arg Thr  
1 5 10 15

caa gga gct cag aga tca tcc tgg aag ctg tgg ctc ttt tgc tca ata Gln Gly Ala Gln Arg Ser Ser Trp Lys Leu Trp Leu Phe Cys Ser Ile	20	25	30	96
gtt atg ttg cta ttt ctt tgc tcc ttc agt tgg cta atc ttt att ttt Val Met Leu Leu Phe Leu Cys Ser Phe Ser Trp Leu Ile Phe Ile Phe	35	40	45	144
ctc caa tta gag act gct aag gag ccc tgt atg gct aag ttt gga cca Leu Gln Leu Glu Thr Ala Lys Glu Pro Cys Met Ala Lys Phe Gly Pro	50	55	60	192
tta ccc tca aaa tgg caa atg gca tct tct gaa cct cct tgc gtg aat Leu Pro Ser Lys Trp Gln Met Ala Ser Ser Glu Pro Pro Cys Val Asn	65	70	75	240
aag gtg tct gac tgg aag ctg gag ata ctt cag aat ggc tta tat tta Lys Val Ser Asp Trp Lys Leu Glu Ile Leu Gln Asn Gly Leu Tyr Leu	85	90	95	288
att tat ggc caa gtg gct ccc aat gca aac tac aat gat gta gct cct Ile Tyr Gly Gln Val Ala Pro Asn Ala Asn Tyr Asn Asp Val Ala Pro	100	105	110	336
ttt gag gtg cgg ctg tat aaa aac aaa gac atg ata caa act cta aca Phe Glu Val Arg Leu Tyr Lys Asn Lys Asp Met Ile Gln Thr Leu Thr	115	120	125	384
aac aaa tct aaa atc caa aat gta gga ggg act tat gaa ttg cat gtt Asn Lys Ser Lys Ile Gln Asn Val Gly Gly Thr Tyr Glu Leu His Val	130	135	140	432
ggg gac acc ata gac ttg ata ttc aac tct gag cat cag gtt cta aaa Gly Asp Thr Ile Asp Leu Ile Phe Asn Ser Glu His Gln Val Leu Lys	145	150	155	480
aat aat aca tac tgg ggt atc att tta cta gca aat ccc caa ttc atc Asn Asn Thr Tyr Trp Gly Ile Ile Leu Leu Ala Asn Pro Gln Phe Ile	165	170	175	528
tcc tag Ser				534

<210> 9  
<211> 177  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Cys Leu Ser His Leu Glu Asn Met Pro Leu Ser His Ser Arg Thr  
 1 5 10 15

Gln Gly Ala Gln Arg Ser Ser Trp Lys Leu Trp Leu Phe Cys Ser Ile  
 20 25 30

Val Met Leu Leu Phe Leu Cys Ser Phe Ser Trp Leu Ile Phe Ile Phe  
 35 40 45

Leu Gln Leu Glu Thr Ala Lys Glu Pro Cys Met Ala Lys Phe Gly Pro  
 50 55 60

Leu Pro Ser Lys Trp Gln Met Ala Ser Ser Glu Pro Pro Cys Val Asn  
 65 70 75 80

Lys Val Ser Asp Trp Lys Leu Glu Ile Leu Gln Asn Gly Leu Tyr Leu  
 85 90 95

Ile Tyr Gly Gln Val Ala Pro Asn Ala Asn Tyr Asn Asp Val Ala Pro  
 100 105 110

Phe Glu Val Arg Leu Tyr Lys Asn Lys Asp Met Ile Gln Thr Leu Thr  
 115 120 125

Asn Lys Ser Lys Ile Gln Asn Val Gly Gly Thr Tyr Glu Leu His Val  
 130 135 140

Gly Asp Thr Ile Asp Leu Ile Phe Asn Ser Glu His Gln Val Leu Lys  
 145 150 155 160

Asn Asn Thr Tyr Trp Gly Ile Ile Leu Leu Ala Asn Pro Gln Phe Ile  
 165 170 175

Ser

<210> 10  
 <211> 10331  
 <212> DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 10

attaatctca aactttat	tttcttataa aaagtgatt	tcttatctg aaataatctg	60
gaataactttc ttagatgaga	gcacaccact ttattctccc	aagcctcctc tacacgtgca	120
ctgtactgcc gtttgattta	ggaaagaaat tttttcccc	tctgaacttc ccttgtgctt	180
tttttttat gttctgagtt	tgtgttggt ttcagccttc	cgttccttt gttgtat	240
atctggtgcc aaatgagagt	cagcacttaa gttataagta	tcattttcta acacagtgac	300
agaaggaaaa ctccgccttc	cacacccact actaattacc	atattgctac aaaacatgac	360
attgcac	tcacccatca cttgtgaatt	tttgtttcc acagctctca tttctccaaa	420
aatgtgtttg agccacttgg	aaaatatgcc tttaagccat	tcaagaactc aaggagctca	480
gagatcatcc tggaagctgt	ggctctttg ctcaatagtt	atgttgctat ttcttgctc	540
cttcagttgg ctaatctta	ttttctcca attagaggta	aggaggcaat tgtacctaag	600
gttactattt gctataatcc	tctatttatt tgttttcta	gttgttatca ttgtcactca	660
gtattgttag caatagttgg	aaggaagaga tgtgtataca	taatgtaaat acaattctaa	720
tattgtcatg acatggcg	tgaagttat ctaaagg	ttt tgagataaaa ggtatcagaa	780
aatgctaaat gttagctgca	gaactctgtt agatagagag	aactggtaa gccaaattgac	840
aggggcctgt ggagtat	ttt tcctccctc tgctatagct	cttggtggaa taaaaaaggt	900
aaaaatatga atgaatatca	aggaatggta tgcaagctat	agtcttattt atggaaaaga	960
cttaaaaaaaa tagtgaaga	caggattaag taaatgacag	gtggtttg	1020
gagggaaagtg gccctgagct	aggtgtaaga agatctggat	tctggttctg ggtctcctaa	1080
taaccagctg tataaattt	gat ataaagacat ttaatcttc	tagttgcag ct	1140
taaaaaaaact ggtggtaggg	gaatggattt attatgatgt	ttcttctagc tataaaatgt	1200
catgatcaag aatttattt	aggtagtat gaagaataaa	tgcctaagtc actcaaaagc	1260
agggacaat gactttagat	tgagttgatc agggagact	tcatggagga atgagaaagc	1320
ccatatctat ttggaaagcc	cctgatgctt gtcaggaatt	tcccattgag atgcaggcca	1380
agctgtggc ctagagaatg	ggatggtaca ctggaaatgg	agattagttt tg	1440
taaaaaatct ttccacag	ttaactacgt agcactgatc	aaaaagaaaa taagaaatgc	1500

tttatattt tcaggattta gcctatttct ggctaaattt gaagactcta agtttgaaa 1560  
 agaataaaagt ggcatatgtc catctgagaa agagttgaaa tgtgactgca gaaacacttt 1620  
 tcttaaggga actgaccagc aaagatttca aagatatagt tctaccactt aagataagta 1680  
 aaagtaattt agaaaagatg caggaggaag cagtccttta ttgatattaa ttttagatgt 1740  
 gtatacgctt ggccaatttt tccacagtag cccattaatt tgtattccat aactgtatac 1800  
 aaggctttag tgcaacagag gcatttctaa ttacaaccct gctctctcaa gaaatgtatg 1860  
 aagcagaagt gtgaactttc tgggtcagtg aagttgaaag aaagaattgt cagaaattct 1920  
 tagtgtctag atttctgaag aagaggaagg gtgagaatag caataactta aatttggaaag 1980  
 tgcttcattt ttctaaaaat tataagattnn attagccaga taaccctgaa gaacactgaa 2040  
 tataaggcatc atcagttcct acatatgact caggaatgaa tacacagaag ctttcccaa 2100  
 aggcacccag cagttcttgc aaaggaaag agaaagtcta ataatgccag atcatctggg 2160  
 acacctctct tcagaatcaa actggattaa tccatgtgt ttgagctctg attctggttt 2220  
 ctctctccta gatccagttt ctcaatgaaa tggctcacct ctaaagataa cccagagttt 2280  
 gtttcaaatt tggggaaagta taaaatgttt ttagaatatt gttctgacag gacacttgca 2340  
 ggatttggttt ctatggaaa agccagtggc ctggccaaacc atacatgata ttagctctg 2400  
 catttcactt tccacttacc tgtacttccc tttccctatt ggccacaaat aaatatctct 2460  
 ggaaaagaag tctgagaggc tggcagatag tgattcatta tgatgtggcc acttccacat 2520  
 tgtcacaata cccatgaacc gtgaagttt attttggctt ccactctgtt ttttacatac 2580  
 aaagtccccac tttccagatt gtctagacac tactttaaa agtgtacact taaaagaaaag 2640  
 tgtaacactt taaaaagtgt tagatggaa gcttggctcc ttgggtcaat tttttcttt 2700  
 ttttctctct tctttgagaa aatatttaac taaaaggata gctgtgagtc caaggagttt 2760  
 ggtcaatccc tcagtgaaaa taatctcaca ggaattatca ctaagaaatc aaatgttcag 2820  
 cagagtctga acttcagcaa aatgaaggat actttcagaa ggggaagttg tacttatact 2880  
 taaaagcaga gcagattta ttttactga tgatttgatt aggggtgggtt tggagagaga 2940  
 atgattgttt tggccatttt gagccgaact acgtaaatct agccttaaat caagaagagg 3000  
 ttacaaaagc aactgatcct tctaagcaaa aataacgaac ccatatgtgt cttaaaaagt 3060

gggtatccac tacttccaaa catcagcaga attataaata gaaacttacc ccacagagt 3120  
 gtagagggtga gagtggtgac ccagacagggc tgggtgtaga tctcattctt gcctttatt 3180  
 ggctgcata ccttaggcta gttacttaat ccctctcatc ctcatttctt catctgcaaa 3240  
 atgagcaacc taattttgt agagttgtgc taaggattaa tgagacagta gagtatctga 3300  
 cataaagtag ctcccagtag aggggagtga ttaatatttgc ccccattact attaatgaga 3360  
 taataatggg caaaaattta acaagaccat ttaacaatat ggatagtctt tgcc taccta 3420  
 tatcactctc tcaatcaaac actatatctc agagccaaat ttatgattt gcaatttagat 3480  
 gatTTTtag tggtggcaat aatttagagag tatcacagtg atggctctg tagcgctaaa 3540  
 tagacataaa gcagcctgca gtatattata cggaatttct gactctggaa attagttgg 3600  
 acttaggttgc tctatagctt aggttctct gagcacatct catacatgct agtagatgg 3660  
 gcagatacta tctgtggcac gtatTTTggc actcattcat atttagatttgc ttaccaaatt 3720  
 gctttgggtg tgtaatcatg tctttctaga aagattataa acttcttgag aagcaaggac 3780  
 caaaaattac atttgggttct catgcttaca atgctgtaca atggtggaaa tatggatgct 3840  
 taaattgttag ttcaattctt cattacaatc accatcatca cccaaacagc taatatttgc 3900  
 tgaacaggtc caggcaggat atctaggcaa agcccttatt aaaaacgacc tcatttaacc 3960  
 ccaacaactt caacaagcta ggtgcttattt tttctccat tttatagatg agggaaattgg 4020  
 ggttaaggga gtctttgtca cgtccctatc atgggttgaa ctaaattgaa tttcaacatc 4080  
 tcctccagga aacaccaaaa tgaggatgaa ataattgcaa gaggccaggc acagtggctc 4140  
 acgcctataa tcccagcact ttgggaggct gaggcgggta gattgcttgc ggtcaagagt 4200  
 ttgagaccag cctgggcaac atggcaaaaac cctgtctcta caaaaaaata caaaaaaaaaat 4260  
 agctgggctt ggtggcatgc acctgttagtc ccagctactc agggggctga cgtggagaa 4320  
 ttgggttagt ccaggaggat gaggctgttag tgaactgaga taacaccact gcactccagc 4380  
 ctgggcaacg gaatgagacc ctgtctcaa aaacaacaac aacaacaaca acaacaaaaaa 4440  
 aaaacaagtg taggaatca aaaaatttat ttcctagaat agtggcttgc agactttta 4500  
 attgcacctc ctttcaata acatattatc agtataattc ccaacatttgc tatgctaatt 4560  
 attataactat atacaagtac taataatatg tacactaaag agatacacaa aatataattt 4620

tataagggtg agccaaataa tatattcaat gtaactctca caatgc当地 ccattttgct	4680
ttcaccaaaa tgttatatattt tctataatca ttaatatgtc ataaacatta ctaaaataag	4740
taaaatattt taataacgtg gtgaatgcat ttatTTTatt tttaatctg agcttaaacac	4800
tatgtgatac agcaatttga agtttgatat gttaatttac cttgtttcat gatTTTgacc	4860
atcatgactg aaaaattacc cgacaaacaa atatagatta aaatggaga acacatctt	4920
ggatattctt atcatgtcat accacttaat tttcaatcca tcattcaatg atggatgcct	4980
ctcttcctt cttccacaa ctaaattcca agatctatag cttaacacc tccctcgcat	5040
aaactcactc acttgcttct ctctatctc attatactct aatgacaaaa gctcgactat	5100
ggaaaacctc caatgctgat taaatccaac tgctctgtct ctTTTactgt tgaatatac	5160
tgaagaaaaa cataaaattt tttgaaaggt cttaacttta attcacagcc actgccttca	5220
agtggatttc attgttgctc tggaaacagc ccatgTTTcc ccagtccatt cacttcctc	5280
tactggatga ttTCatacct ttagcttctc ttcaaacatc taataactct tccccattct	5340
cactctccac tgataacggt gcctccatAT tttaagagaa aatagaagta cggaggaaag	5400
aagttccaat atcaacaact cattggcatt tgtgtccagg tataactgttA ttctgtctt	5460
tcactatgga taaattgtcc atgcatactat ccaagccatc tatgaactaa atcttatacct	5520
ctcttgccTA ctcagggaca ttgctgcaac agttctctcc tcgctcttac atattatgcc	5580
tcatccattt tacagaaaca ttTCCatcaa atggaaatAG aaaaacgtgt tgtcatttct	5640
ctcacattaa aacgtaacaa caacaacaac aacaacaaca aaaaaaaaaacc tctttgatct	5700
ctcatcctca tccaaactcc actcatttt ttctgctctc cctacagcaa aattcctcca	5760
acttctcttG tcccatttac cttAAattt atttaacta agttctGCC ctcttcacat	5820
atcacagaaa ctaattttgt caagaactcc agtgactacc atgttgctca atctatcagt	5880
caatttcactg tactcttctt acttgatcta tcaacagcat ttgacaccag ctgatcactc	5940
gtccttcatg aaatacttcc ttTCTTGGC ttccaaacat cagactctcc tagTTTcTT	6000
tcagactcag ctTTTcTTT ctattgtccc ttgcttggc tttctcatttcc tccgacctct	6060
aaacatcaca acgccccagt gttcctctcc atctacaccc actaacatga tggcctcata	6120
caatctcaca gcttaaaaaca tcaactatga gcttaagact cttaaatgttA tatcaccaga	6180

gctccttaaa	tttcagcctg	cttgacacac	ttacttggat	ttataataag	catcacaaac	6240
taatatgtcc	acaaccaaac	tcatcattgt	tcccctcccc	atttattcct	cttacatctt	6300
atccatttta	gtgaataaca	actttatctt	tccaattatg	caggcctaaa	atactggagt	6360
catcttgg	tcttctcatt	ccctacccca	tatccatgtc	aggaacttct	gttggctcta	6420
ttttccaacc	aagtatcacc	atctacagag	ctagcacctt	ggtcagagac	accatgctct	6480
cttgcctaga	tgaatgactg	taatgatctc	ttagctagtc	tcactacatt	tgccttgcc	6540
tctgttaat	ttgttcctag	catagcagcc	agagaaatcc	tacaaaagga	aagtgtgcaa	6600
cacgttaag	ttcaaaaagt	cttttaagca	cttgccatt	aggaaaccaa	taaccttgg	6660
gtgatacaaa	aatgtttgt	ggttatgcct	gaatttacta	caacgtattt	ttgagcattt	6720
agcattaact	acttgtgttt	gtaaaattaa	ccacacactg	atggcatctt	gtagcatgtg	6780
aactgccgta	cattgcagta	gtctgaaact	tggaactgtt	tttcagggtt	tctcagatac	6840
tgtatatgac	atgttagttat	ctgaatatta	tacatgggtt	gtttcatcaa	tctgagttgt	6900
aaatatttct	agggcttaat	ttactgtttt	aaataaaata	aacataaata	gaagcttcac	6960
tattttcctt	tcacatgcca	acagatcacc	ttgtgcagtc	actgggggtgt	ggaaactgct	7020
attttggta	aaaactttta	gagcccaagg	ttgggggggg	ggtccgatat	caaatagttg	7080
tcctgttaggt	atagattagg	taatggaatg	agatcttgc	ctttgtctaa	aagacctaaa	7140
agggaaagcta	ggtataaaaa	ggtaaaggat	ggagccactc	aactttaaag	ggaggctgag	7200
agggctgaga	catggtgaag	ggaaggattt	tttttatgg	tatagaacac	tagttgctt	7260
caggaattca	aagctctaaa	taaatcaatc	aaaaaaatta	atgacactgt	catcatccta	7320
atcaattcat	cttttatttc	cccaacagac	tgctaaggag	ccctgtatgg	ctaagttgg	7380
tgagtaacct	atcttgcatt	tctttactt	ttcttagttt	ttgatgcaag	aaggcaggtt	7440
tcagtatct	caagaaaaacc	tgtatttct	tttattcatt	tctgagctac	tatgtataat	7500
tacttatcat	gtactggca	gttgc当地	agctgaggct	ttcagaggtt	aaccaggcaa	7560
aagaagccca	tgccctgata	aagcttatgt	tgaaggctgc	atctctggcc	aggaatgagc	7620
atctctctta	ctggcctatg	aatctgagat	ccggaaatct	ccttttaatt	ctgtgtttta	7680
ataaacacaa	caagttcag	atttctacaa	ccttcctta	aagtcttct	catgtttcac	7740

atattgctaa	tgtccaatgg	agtatgtgag	agagtgccat	tgttgtttct	aatgtata	7800
aagagcaatg	agagttggaa	aagtggccac	ttcctctact	attttctctt	ctaagcttag	7860
cttctgagtc	atttccctt	gtggtcacct	gatatttgct	tagaaaacac	accagttac	7920
agttacactg	agccttagat	tcttagaata	catggaaaat	ttcagataaa	tacat	7980
ttaaagttgt	ttataggttt	caggccaaac	atacatttc	agttgagaac	agaccatttc	8040
tagagttaac	tctgcaaccc	ctgtgttcct	atatagttta	aaccagtagg	tttccttggc	8100
tttgtggaaat	tagaaaatgt	cctttgcct	gtctctttct	ttgtgttttg	ttttgtttt	8160
gcccataagt	ggaatggaat	gcatggcatg	tgtgaaatta	tgccttgatg	tggtaaaagt	8220
tgagaaactc	aagtgatgct	aaggtggtct	ttaaatgacc	cccttcaca	gaattaaatg	8280
ggagaaccaa	tgacacttct	tcctggtgac	ctgccttattg	cctattacat	gtcaaggaag	8340
aagaaattta	ctgggctccg	agctcattgg	cgatactggg	tggctttgtc	ttttgttcta	8400
tgatcgctc	tttcattctc	ctccagaatc	taccttcaga	gtcttatatt	agtcat	8460
atgaatgagc	attgaagtaa	aatgttacc	tcttccaggg	tgtttcctca	tcaagt	8520
ttttaattta	tgggacaaag	gacaaaaatt	atggagaatt	gcagaacaga	taagcattct	8580
gggtggtaaa	agcacccccc	ggggctgtga	gatcacactg	ctgtgcaaaa	ccaagtaatg	8640
ttaggcaaac	atctaagttt	catatgtgct	aatgaaaatg	aatgattagg	tcttacctt	8700
ttctttacca	tttggacag	tattgcacta	gggatcctta	tattaaata	gtcaagttat	8760
ttctat	aaactcataa	attacaatt	agctat	gggggat	ttaatgaat	8820
cctaagtagg	tcttaaatga	tatataccta	caaactgagg	agaacagcca	taat	8880
acaaagcacc	taattcagga	acatggaagt	atcattcaat	caataaata	ttatggaaca	8940
tctaccaggt	accagggact	tttcaggtg	ctgaaaatac	aagaatgaac	aaaatagaga	9000
tatatttgc	ctaaaaaattt	ttacattcaa	agtgatacaa	gatggacaat	aaacaaatga	9060
acaat	ttataacatc	ctagacactg	acacacttta	tgaagaaaac	tcaagcaagg	9120
taaaatgagg	gaatgatagg	agaacacttt	ttaatata	ataattaagg	aaagccacac	9180
tgataaaagt	ataaacagcc	agtggat	acaccgaaaa	tgcctggaaa	ggcatggact	9240
gccaaccctg	gtttcaaaa	tttggcttg	tgatttctt	ctccattag	ctttcttct	9300

cctttctttt	tcccacaaat	attaatcaac	aagagatgcg	aagtcactta	agtcattttt	9360
ctattccaaa	ttctttcct	tagaattcct	gctccaagca	agaaatactc	tttggatttg	9420
caatttctct	aaaacaagga	gtagataggt	acttaaaata	aaaaaattct	gcttgaagag	9480
aactagtgt	gatcaggtaa	agaaacaaca	tgtatgtggt	aaataatcaa	ctacaatctg	9540
gaaaaggatg	aaataatgaa	ataactatgc	tttcatctt	tttatccttg	tatatttctt	9600
ataggaccat	taccctcaaa	atggcaaatg	gcatcttctg	aaccccttg	cgtgaataag	9660
gtgtctgact	ggaagctgga	gatacttcag	aatggcttat	attnaattna	tggccaagtg	9720
gctcccaatg	caaactacaa	tgtatgtact	cctttgagg	tgcggctgta	taaaaacaaa	9780
gacatgatac	aaactcta	aaacaaatct	aaaatccaaa	atgtaggagg	gacttatgaa	9840
ttgcatgttg	gggacaccat	agacttgata	ttcaactctg	agcatcaggt	tctaaaaat	9900
aatacatact	ggggtatcat	tttacttagca	aatccccat	tcatctccta	gagacttgat	9960
ttgatctcct	cattcccttc	agcacatgta	gaggtgccag	tgggtggatt	ggagggagaa	10020
gatattcaat	ttctagagtt	tgtctgtcta	aaaaatcaa	cacaaacaga	actcctctgc	10080
acgtgaattt	tcatctatca	tgcctatctg	aaagagactc	aggggaagag	ccaaagactt	10140
ttggttggat	ctgcagagat	acttcattaa	tccatgataa	aacaaatatg	gatgacagag	10200
gacatgtgct	tttcaaagaa	tctttatcta	attcttgaat	tcatgagtgg	aaaaatggag	10260
ttctattccc	atggaagatt	tacctggat	gcaaaaagga	tctggggcag	tagcctggct	10320
ttgttctcat a						10331

<210> 11  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Apis mellifera

<400> 11

Met	Lys	Phe	Leu	Val	Asn	Val	Ala	Leu	Val	Phe	Met	Val	Val	Tyr	Ile	
1																15
		5														

Ser	Tyr	Ile	Tyr	Ala
		20		

<210> 12  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<223> synthesized PLP peptide

<400> 12

His Ser Leu Gly Lys Trp Leu Gly His Pro Asp Lys Phe  
1 5 10